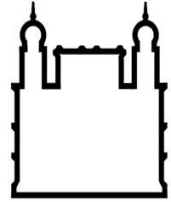




**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**VIA HEDGEHOG EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA:
ASSOCIAÇÃO COM MACRÓFAGOS CD163+, ANGIOGÊNESE,
PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR**

LUDMILA DE FARO VALVERDE

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

**VIA HEDGEHOG EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA:
ASSOCIAÇÃO COM MACRÓFAGOS CD163+, ANGIOGÊNESE,
PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR**

LUDMILA DE FARO VALVERDE

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

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

Salvador-Bahia-Brasil

2015

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

Valverde, Ludmila de Faro
V215v Via Hedgehog em carcinoma escamocelular de boca: associação com
macrófagos CD163+, angiogênese, proliferação e diferenciação celular. /
Ludmila de Faro Valverde. - 2014.
91 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: 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, 2014.

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

CDU 616-006.6

A minha mãe,

Por sempre me incentivar a querer ir mais além. Por estar sempre ali, torcendo por mim e me apoiando em todas as minhas decisões. Ser sua filha é um privilégio pelo qual eu agradeço todos os dias. Te amo incondicionalmente.

A meu pai (*in memoriam*),

Pela presença constante em minha vida, mesmo diante da ausência física. Este é mais um dos incontáveis momentos que eu gostaria de dividir com você. O meu amor e saudade são eternos.

A minha orientadora, professora e amiga “Clara”,

Por despertar em mim a minha verdadeira paixão: a pesquisa e a docência. Foi você quem sempre soube o caminho que eu iria seguir, mesmo quando eu mesma ainda tinha dúvidas; quem enxergou o meu potencial e me fez acreditar que eu era capaz de ir muito longe; quem me apresentou a este mundo desafiador e apaixonante da ciência.

AGRADECIMENTOS

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes.” (Martin Luther King)

À Deus,

Por me proporcionar tantas oportunidades, colocar no meu caminho pessoas maravilhosas e por me motivar todas as vezes que eu pensei em fraquejar.

Ao meu pai Raimundo (*in memoriam*),

As lembranças são doces e a saudade é uma companhia constante. Obrigada pelos valores transmitidos e pela lição de que o que deixamos da vida é apenas o que plantamos de bom. A minha eterna gratidão e o meu amor.

A minha mãe Marileide,

Minha maior inspiração e exemplo de vida. Só tenho a agradecer muito por tudo o que você sempre fez por mim, por nunca ter medido esforços para realizar os meus sonhos e, ao mesmo tempo, me ensinando que para alcançarmos os nossos objetivos, temos que ser persistentes e ter paciência.

Aos meus avós Tonha e Lila (*in memoriam*),

Pela lição do que é um amor incondicional. Obrigada pela família linda que vocês construíram.

As minhas irmãs Lara e Lô,

Pela amizade, cumplicidade e por serem as melhores irmãs que eu poderia ter. Obrigada por vocês, a todo momento, me darem apoio e vibrarem a cada conquista minha. Vocês são as minhas companheiras de toda a vida.

À Daniel,

Esta trajetória seria infinitamente mais difícil sem você ao meu lado. Não tenho como agradecer por todo o amor, carinho, compreensão e incentivo que você me deu. Incontáveis foram os momentos que precisei da sua tranquilidade e do seu otimismo.

A minha orientadora Profa. Dra. Clarissa Gurgel,

Durante esses 5 anos de convivência, você me ensinou a crescer e amadurecer enquanto profissional e ser humano. Me transmitiu lições valiosas que eu aprendi sem hesitar. Obrigada por me inserir numa equipe que se torna cada vez mais sólida e ética, da qual eu me orgulho e quero continuar fazendo parte. Impossível explicar toda a sua importância na minha trajetória.

Ao Prof. Dr. Eduardo Antônio Gonçalves Ramos,

Pela extrema disponibilidade a ajudar sempre que solicitado, de maneira gentil e paciente. Obrigada por me transmitir um pouco da sua enorme experiência e sabedoria.

Ao Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos,

Por ser o nosso parceiro e colaborador, além do auxílio prestado todas as vezes que precisei.

Ao Dr. Fernando Augusto Soares,

Por deixar a Patologia Investigativa de portas abertas, facilitando o nosso trabalho.

À Profa. Dra. Deise Vilas Boas,

Pela parceria junto ao Hospital Aristides Maltez, contribuindo para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Águida Cristina Gomes Henriques Leitão,

Por me acolher de braços abertos na Histologia e por aumentar a minha paixão pela vida acadêmica.

À Profa. Dra. Flávia Caló de Aquino Xavier,

Por dividir comigo os meus primeiros momentos na docência, de maneira tão doce e carinhosa.

À Profa. Dra. Iêda Margarida Crusoé-Rebello,

Um exemplo de profissional e de ser humano. Obrigada por me inserir no mundo da Radiologia, despertando novos aprendizados e sonhos para o meu caminho.

À Profa. Dra. Marianna Torres,

Pela convivência na Radiologia e por sempre me incentivar e torcer por mim.

À Thiago,

Praticamente meu co-orientador, foi fundamental em diversas etapas deste trabalho. Obrigada pelas idéias e pela empolgação sempre que te procurei para discutir algo novo.

À Carolzinha e Rô,

Ter vocês como parceiras de trabalho é muito bom, torna tudo mais fácil. Obrigada pelos conselhos, ajuda e apoio em todos os momentos.

À Manuela,

Por tornar esta caminhada mais fácil e prazerosa, dividindo comigo os inúmeros momentos de alegria e também os de agonia e desespero.

À Andréia,

Por trabalhar junto comigo, tornando as horas na bancada mais produtivas e descontraídas.

À Marina,

Pela receptividade em São Paulo e por tanta boa vontade em ajudar. A minha análise não seria a mesma sem você e o Aperio.

À Leonardo Melo,

Pela contribuição com este trabalho, mediante a coleta das mucosas não-neoplásicas.

As minhas amigas Vieirenses, Babi, Xú, Jô e Carol,

Pela compreensão em todos os meus momentos de ausência. Obrigada por fazerem parte de minha vida há tantos anos e compartilharem comigo todos os meus momentos.

Ao eterno grupo “Meninócas”,

É incrível como pessoas tão diferentes podem se entender e formar uma verdadeira família, um porto seguro. Obrigada por tanta confiança depositada em mim, por entenderem as minhas angústias e, principalmente, por acreditarem nos meus sonhos e objetivos de vida.

À Roseira,

Por dividir comigo a paixão pela vida acadêmica. Só nós que vivemos neste mundo científico sabemos do quanto precisamos abdicar, mas que no fim tudo vale a pena.

À Dilton,

Por sempre me auxiliar nas diversas formatações gráficas.

A minha família,

Obrigada, a cada um de vocês, pelos momentos maravilhosos que passamos juntos, que renovam as minhas energias.

A todos os bolsistas de Iniciação Científica,

Em especial, Vanessa Guimarães, pela dedicação e prazer em nos ajudar.

A todos os meus colegas de Mestrado,

Em especial, Manuela Andion e Martha Suarez, por dividirem comigo esta jornada.

Aos Professores da Pós-Graduação em Patologia Humana,

Por todo conhecimento e ensinamentos transmitidos.

Ao LPBM,

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

A toda equipe da Histotecnologia do CPqGM,

Em especial à Márcio, pelo apoio indispensável para a realização dos meus experimentos.

A toda equipe da Microscopia Eletrônica do CPqGM,

Em especial à Cláudio, pela ajuda na aquisição das minhas imagens de co-localização.

À Biblioteca do CPqGM, especial à Sra. Ana Fiscina,

Pelo auxílio na formatação deste trabalho.

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

Pela imensa contribuição na obtenção dos casos, sem os quais este trabalho não existiria.

Ao Hospital AC Camargo,

Por permitir a utilização do Aperio, utilizado no meu trabalho.

Aos Professores da Faculdade de Odontologia da UFBA,

Verdadeiros Mestres que contribuíram imensamente na minha formação profissional.

À Faculdade de Odontologia da UFBA,

Por ser, além da minha segunda casa, o lugar que iniciei a minha experiência docente.

À Coordenação de Ensino,

Em especial à Ana Carolina Sodré, pela prestreza em auxiliar e resolver os nossos problemas.

À CAPES e CNPq,

Pelo apoio financeiro durante a realização do Mestrado.

À FAPESB,

Pelo financiamento deste projeto.

Ao CPqGM,

Por contribuir imensamente na minha formação pessoal e acadêmica. É uma honra fazer parte, de alguma forma, desta instituição.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Tereza de Calcutá

VALVERDE, Ludmila de Faro. Via Hedgehog em Carcinoma Escamocelular de boca: associação com macrófagos CD163+, angiogênese, proliferação e diferenciação celular. 91 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

RESUMO

INTRODUÇÃO/OBJETIVO: O Carcinoma Escamocelular de Boca (CEB) corresponde a mais de 95% dos casos de câncer diagnosticados na cavidade bucal e consiste numa neoplasia invasiva e agressiva. Sabendo-se que a via Hedgehog (HH) está envolvida na patogênese de diversos tumores, o presente trabalho propôs-se a avaliar a expressão de componentes desta via em CEB, associando a expressão destas moléculas com aspectos clínicos, angiogênese, graus de diferenciação tumoral, potencial proliferativo e macrófagos CD163+. **MATERIAL E MÉTODOS:** Vinte e oito casos de CEB, 9 casos de margens tumorais (MAT) e 4 casos de mucosa bucal não neoplásica (MNN) foram submetidos à reação imuno-histoquímica para as proteínas MCM3, SHH, IHH, GLI1, CD163 e CD105 utilizando o sistema polimérico AdvanceTM. A co-localização das proteínas IHH/CD163 e GLI1/CD105 foi avaliada através de dupla marcação imuno-histoquímica. As análises das proteínas MCM3, SHH, IHH e GLI1 foram realizadas em 5 áreas coincidentes de cada caso, de acordo com os parâmetros semi-quantitativos descritos por Gurgel et al. (2008). A densidade de macrófagos (DM) e microdensidade vascular (MDV) foram mensuradas considerando-se a população destas células e vasos neoformados em 5 áreas e os resultados expressos em cel/mm² e vasos/mm². A análise estatística foi realizada utilizando *GraphPad Prism* versão 6.03. **RESULTADOS:** Todos os casos de CEB foram positivos para a proteína MCM3, em citoplasma e núcleo de células do parênquima tumoral, sendo o escore 4+ predominante (n=19; 67,85%). Em parênquima tumoral, a proteína SHH estava presente no citoplasma de células neoplásicas e foi positiva em 25 casos (89,28%) de CEB, sendo o escore 4+ predominante (n=17; 68%). Vinte e dois casos (78,57%) apresentaram marcação citoplasmática da proteína IHH no parênquima tumoral, predominando os escores 4+ (n=7; 31,82%) e 3+ (n=7; 31,82%). A proteína GLI1 apresentou marcação citoplasmática e nuclear em 24 (85,72%) casos de CEB, predominando, no parênquima do tumor, o escore 4+ (n=15; 62,5%). Vinte e três casos de CEB (82,14%) apresentaram imunexpressão de CD163, enquanto 24 (85,72%) exibiram positividade para a proteína CD105. Foi observada uma tendência de maior imunexpressão de SHH e IHH nos grupos com alto perfil proliferativo. Foi observada uma tendência de maior expressão das proteínas MCM3 (p=0.11), SHH (p=0.21) e IHH (p=0.07) em tumores menos diferenciados. Uma forte correlação positiva foi observada entre a DM e a MDV em CEBs e correlação positiva perfeita em MATs. Quando comparado à MAT e MNN, os casos de CEB apresentaram maior imunexpressão de MCM3 (p=0.0003), SHH (p=0.01), IHH (p=0.39), GLI1 (p=0.03), DM (p=0.0002) e MDV (p=0.0002). **CONCLUSÕES:** Nossos resultados sugerem a participação da via HH em CEBs, através de uma sinalização autócrina e parácrina e com participação de ambos ligantes, SHH e IHH, os quais parecem contribuir para a proliferação e diferenciação do CEB. Demonstramos que células endoteliais também exibem positividade para componentes da via HH e que essas moléculas podem contribuir na angiogênese tumoral, ao mesmo tempo que macrófagos CD163+ expressam IHH, ligante da via, e estão associados com a neo-vascularização tumoral. Em adição, nossos achados sugerem que a proteína MCM3 pode despontar como um bom marcador de proliferação celular em CEB.

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

VALVERDE, Ludmila de Faro. Hedgehog pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma: association with CD163+ macrophages, angiogenesis, cell proliferation and differentiation. 91 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2015.

ABSTRACT

INTRODUCTION/OBJETIVE: The Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) accounts for over 95% of all cancers diagnosed in the oral cavity and it consists on an invasive and aggressive type of tumor. The Hedgehog pathway (HH) has been involved in the pathogenesis of different tumors. The aim of this study was to evaluate the components of the HH pathway in OSCC, correlating the results with clinical aspects, angiogenesis, tumor differentiation, proliferative potential and macrophages CD163+. **MATERIAL AND METHODS:** Twenty-eight cases of OSCC, 9 cases of tumor margins (TM) and 4 cases of non-neoplastic oral mucosa (NNM) were submitted to immunohistochemical reaction for MCM3, SHH, IHH, GLI1, CD163 and CD105 proteins using the AdvanceTM polymer system. Co-localization for IHH/GLI1 and CD163/CD105 proteins was evaluated using double staining method. The analysis of MCM3, SHH, IHH and GLI1 proteins were conducted in 5-matching areas and data described using the semi-quantitative parameters described by Gurgel et al. (2008). The density of macrophages (MD) and microvessel density (MVD) were measured considering the population of these cells and newly formed vessels in 5-matching areas and the results expressed in cells/mm² and vessels/mm², respectively. Statistical analysis were performed using *GraphPad Prism* v. 6.03. **RESULTS:** All cases of OSCC were positive for MCM3 protein on the cytoplasm and nucleus of tumor cells, and 4+ was the main score (n= 19; 67.85%). In tumor cells, the SHH protein was observed in the cytoplasm and it was positive in 25 OSCC cases (89.28%), with a 4+ score predominant (n= 17; 68%). Twenty-two cases (78.57%) presented with cytoplasmic IHH protein in tumor cells and scores 4+ (n=7; 31.82%) and 3+ (n=7; 31.82%) were more common. The GLI1 protein was positive in 24 OSCC cases (85.72%) and detected in tumor cells on cytoplasmic and nuclear patterns, with score 4+ (n=15; 62.5%). Positive staining for CD163 and CD105 were described in 23 (82.14%) and 24 OSCC, respectively. In groups with high proliferative profile, we observed a larger amount of SHH and IHH proteins. In addition, on OSCC with a lower differentiation, we observed a tendency to increased levels of MCM3 (p=0.11), SHH (p=0.21) and IHH (p=0.07) proteins. A strong and a perfect positive correlation was observed between MD and the MVD in OSCC and TMs, respectively. A higher expression of MCM3 (p=0.0003), SHH (p=0.01), IHH (p=0.39), GLI1 (p=0.03), MD (p=0.0002) and MVD (p=0.0002) were founded in OSCC by comparing to TM and NNM. **CONCLUSIONS:** Our results suggest that the HH pathway may participate in OSCC through an autocrine and paracrine mechanisms, with participation of both ligands, SHH and IHH. These ligands seem to contribute to the proliferation and differentiation of the OSCC. We demonstrate that endothelial cells also display positivity for HH pathway components, which may contribute to the tumor angiogenesis. Moreover, CD163+ macrophages are positives for IHH ligand and highly associated with tumor-vessels. Additionally, our findings suggest that MCM3 protein could emerge as a good marker for cell proliferation in OSCC.

Key words: Carcinoma, Hedgehog proteins, Immunohistochemistry

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Componentes e funcionamento da via Hedgehog em humanos	24
Figura 2. Macrófagos associados ao tumor (TAM)	34
Figura 3. Método de seleção de áreas coincidentes para a análise dos marcadores	45
Figura 4. Esquema da metodologia adotada para a análise imuno-histoquímica	47
Figura 5. Imunoexpressão da proteína MCM3 em CEB, MAT e MNN	52
Figura 6. Imunoexpressão da proteína SHH em CEB, MAT e MNN	53
Figura 7. Imunomarcção de MCM3, SHH e IHH em CEB, MAT e MNN	55
Figura 8. Imunoexpressão das proteínas SHH e IHH com relação ao perfil proliferativo	56
Figura 9. Imunoexpressão das proteínas SHH, IHH e MCM3 com relação à diferenciação tumoral	56
Figura 10. Imunomarcção de SHH e IHH de acordo com o perfil proliferativo	57
Figura 11. Imunomarcção de SHH e IHH de acordo com a diferenciação tumoral	57
Figura 12. Imunoexpressão da proteína GLI1 em CEB, MAT e MNN	58
Figura 13. Imunomarcção da proteínas GLI1 em CEB, MAT e MNN	60
Figura 14. Co-localização das proteínas GLI1 e CD105 em CEB	60
Figura 15. DM e MDV em CEB e MAT	61
Figura 16. Imunomarcção de CD163 e CD105 em CEB, MAT e MNN	62
Figura 17. Imunoexpressão das proteínas da via HH em MAT-DEO e MAT	63
Figura 18. DM e MDV em MAT-DEO e MAT	63
Figura 19. Correlação entre DM e MDV em CEBs	66
Figura 20. Correlação entre DM e MDV em MATs	66
Figura 21. Imunomarcção da DM e MDV em CEB	67
Figura 22. Imunomarcção da DM e MDV em MAT	67
Figura 23. Co-localização das proteínas CD163 e IHH em CEB	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios utilizados para gradação de DEOs e CEBs	40
Tabela 2. Dados do fabricante, clone, recuperação antigênica e diluição dos anticorpos	42
Tabela 3. Características clínicas e histológicas dos pacientes com CEB	51
Tabela 4. Imunoexpressão das proteínas para os parâmetros clínicos e histológicos de CEB	64
Tabela 5. Comparação da imunoexpressão das proteínas entre CEB, MAT e MNN	65

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AP	Alto perfil proliferativo
BD	Bem diferenciado
BP	Baixo perfil proliferativo
CEB	Carcinoma Escamocelular de boca
CTT	Células-tronco tumorais
DEO	Displasia epitelial oral
DHH	Refere-se ao gene ou proteína <i>Desert Hedgehog</i>
DM	Densidade de macrófagos
FU	Refere-se ao gene ou proteína <i>Fused</i>
<i>GLI1</i>	Refere-se ao gene <i>GLI family zinc finger 1</i>
GLI1	Proteína codificada pelo gene <i>GLI1</i>
<i>GLI2</i>	Refere-se ao gene <i>GLI family zinc finger 2</i>
GLI2	Proteína codificada pelo gene <i>GLI 2</i>
<i>GLI3</i>	Refere-se ao gene <i>GLI family zinc finger 3</i>
GLI3	Proteína codificada pelo gene <i>GLI3</i>
HH	Hedgehog
HRP	Do inglês, <i>Horse Raddish Peroxidase</i>
IHH	Refere-se ao gene ou proteína <i>Indian Hedgehog</i>
Ki-67	Refere-se ao antígeno Ki-67 ou anticorpo de mesmo nome
MAT	Margem tumoral
MCM3	Minichromosome maintenance complex component 3
MD	Moderamente diferenciado
MDV	Microdensidade vascular
MIF	Fator inibitório de migração de macrófagos
MNN	Mucosa não-neoplásica
PTCH1	Refere-se ao gene ou proteína <i>Patched 1</i>
SCBCN	Refere-se a Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide
SHH	Refere-se ao gene ou proteína <i>Sonic Hedgehog</i>
SMO	Refere-se ao gene ou proteína <i>Smoothened</i>

SUFU	Refere-se ao gene ou proteína <i>Supressor of Fused</i>
TAM	Macrófagos associados ao tumor
VEGF	Refere-se ao gene ou proteína <i>Vascular endotelial growth fator</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA	19
2.2 VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG	22
2.3 VIA HEDGEHOG E A PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR	26
2.4 VIA HEDGEHOG E A ANGIOGÊNESE	29
2.5 MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR	31
3 OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	39
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	39
4.3 ESTUDO HISTOLÓGICO	40
4.4 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO	41
4.5 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA	44
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS	49
5.1 ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS DO CEB	49
5.2 IMUNOEXPRESSÃO DE MCM3	52
5.3 IMUNOEXPRESSÃO DE SHH	53
5.4 IMUNOEXPRESSÃO DE IHH	54
5.5 ASSOCIAÇÃO DE SHH E IHH COM PERFIL PROLIFERATIVO E DIFERENCIAÇÃO TUMORAL	56
5.6 IMUNOEXPRESSÃO DE GLI1	58
5.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE VASOS GLI1 POSITIVOS/CD105 POSITIVOS	59
5.8 DENSIDADE DE MACRÓFAGOS E MICRODENSIDADE VASCULAR (CD163 E CD105)	61
5.9 IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS MCM3, SHH, IHH, GLI1, CD163 E CD105 EM MAT	63
5.10 MACRÓFAGOS CD163+ E ANGIOGÊNESE	66
5.11 IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA IHH EM MACRÓFAGOS CD163+	68
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÕES	78
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

As neoplasias malignas configuram-se como uma das principais causas de morte da população brasileira, ultrapassadas apenas pelas doenças cardiovasculares (BRASIL, INCA, 2014). O câncer de boca está entre os 10 tumores mais frequentes no mundo, sendo o Carcinoma Escamocelular de Boca (CEB) o tipo histológico predominante, correspondendo a mais de 95% dos casos diagnosticados (BHARGAVA; SAIGAL; CHALISHAZAR, 2010; JEMAL et al., 2011). Quando diagnosticada tardiamente, a morbi-mortalidade desta doença é elevada, sendo a taxa de sobrevivência dos pacientes menor que 50% em 5 anos (ADRIEN et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014).

Diante da evolução conceitual sobre o desenvolvimento de neoplasias malignas, especialmente relacionada às células-tronco tumorais, o estudo de vias de sinalização embrionárias destaca-se como um campo promissor, representando uma importante estratégia para a identificação de biomarcadores, além de contribuir para o desenvolvimento de novos métodos terapêuticos.

A via de sinalização Hedgehog (HH) participa do desenvolvimento embrionário de diversos órgãos (HARDCASTLE et al., 1998; INGHAM; MCMAHON, 2001; CHARI; MCDONNELL, 2007; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013). A desregulação desta via está associada ao desenvolvimento e progressão de diversos tumores humanos e, mais recentemente, Cavichioli Buim, Gurgel et al. (2011) demonstraram a participação da via HH em CEB. Uma das formas que a via HH pode participar da progressão tumoral é através do estímulo à angiogênese (SALES et al., 2012). Neste sentido, ligantes da via parecem atuar na modulação positiva da expressão de fatores angiogênicos e na ativação de células endoteliais (OLSEN et al., 2004).

As proteínas homólogas Sonic Hedgehog (SHH), Indian Hedgehog (IHH) e Desert Hedgehog (DHH) são responsáveis pela ativação da via HH. Enquanto a proteína DHH tem participação restrita no desenvolvimento de células germinativas, os morfógenos SHH e IHH participam do desenvolvimento embrionário de diversos órgãos e sistemas (HUANGFU; ANDERSON, 2006). Alguns trabalhos indicam que os diferentes ligantes da via HH tem propriedades biológicas similares, enquanto outros estudos já demonstraram que cada um destes ligantes tem funções distintas (BITGOOD; MCMAHON, 1995; PATHI et al., 2001; ADOLPHE et al., 2004; VAN DEN BRINK et al., 2004) e, desta forma, os níveis de expressão de SHH e IHH poderiam ter uma função importante no equilíbrio entre a proliferação e diferenciação tumoral.

Evidências apontam que células da resposta imune inata, como macrófagos, estão envolvidas em diversos processos com reflexos na progressão tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Sabe-se que existem dois tipos de macrófagos, M1 e M2, sendo que o perfil M2, também chamado de “alternativamente ativado”, pode ter uma atividade pró-tumoral, devido à capacidade de promover imunossupressão e angiogênese (SICA et al., 2006). Recentemente, Pereira et al.(2013) demonstraram a importância dos ligantes HH na resposta imune relacionada a este tipo celular, sugerindo que isto possa ter implicações terapêuticas.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão de componentes da via HH (SHH, IHH e GLI1) em CEB, associando a imunoexpressão dessas moléculas com aspectos clínicos, angiogênese, graus de diferenciação tumoral, potencial proliferativo e macrófagos CD163+.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA

O câncer de boca é considerado um problema de saúde pública mundial, especialmente pela alta incidência, apesar da sua fácil prevenção e detecção precoce. 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 bucal 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 em todo o país (BRASIL, INCA, 2014).

Com relação ao câncer de boca, o CEB é o subtipo histológico mais comum e corresponde a mais de 95% dos casos diagnosticados neste sítio anatômico (BHARGAVA; SAIGAL; CHALISHAZAR, 2010; RODRIGUES et al., 2014). De acordo com a classificação de tumores da cavidade bucal e orofaringe da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005), o CEB é uma neoplasia invasiva, de caráter agressivo, apresentando uma propensão à invasão metastática precoce e extensa em linfonodos. Acomete principalmente adultos na faixa etária da 5ª a 6ª década de vida, sendo os principais fatores de risco o tabaco e o álcool, além de infecções pelos

subtipos 16 e 18 do Papiloma Vírus Humano (HPV) e fatores genéticos (OMS, 2005; ADRIEN et al., 2014).

Indivíduos tabagistas e etilistas possuem um risco significativamente maior de desenvolver CEB do que a população em geral, evidenciando a existência de uma sinergia entre o tabagismo e o etilismo. O aumento no risco também está relacionado com o tempo que a pessoa fuma, número de cigarros fumados por dia e frequência de ingestão de álcool (BRENER et al., 2007; HASHIBE et al., 2011). Os pacientes acometidos pelo CEB e que não possuem histórico de exposição ao tabaco e/ou álcool devem ser avaliados quanto à presença de outros fatores de risco, como, por exemplo, deficiências nutricionais e história familiar (HASHIBE et al., 2011; SEBASTIAN et al., 2014).

Clinicamente, o CEB pode se apresentar como um nódulo, uma placa eritematosa ou úlcera, podendo ou não estar associado à dor, disfagia, odinofagia, dificuldades da fala, sangramentos, perda de peso ou odor bucal (OMS, 2005). Os sítios anatômicos mais acometidos por esta neoplasia são os dois terços anteriores da língua, assoalho bucal, palato duro, mucosa jugal, região retromolar e gengiva, nesta ordem (OMS, 2005; LAMBERT et al., 2011). Muitas lesões de CEB são assintomáticas ou podem apresentar 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. Nos estágios terminais, os pacientes apresentam fístulas orocutâneas, sangramento contínuo, anemia grave e caquexia (OMS, 2005).

O CEB tem um aspecto histológico amplo e, a depender das alterações arquiteturais e citológicas, são utilizadas classificações histopatológicas para caracterizar a diferenciação dos tumores (LOURENÇO et al., 2007). A classificação histopatológica proposta pela OMS, em 2005, baseou-se no grau de diferenciação celular e organização tecidual e permitiu o

agrupamento do CEB em três categorias: bem, moderadamente e pouco diferenciado. Os tumores bem diferenciados possuem a arquitetura tecidual semelhante ao epitélio escamoso. Já aqueles pouco diferenciados, caracterizam-se pelo predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, bem como mínima ceratinização. Os CEBs moderadamente diferenciados apresentam grau intermediário de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e ceratinização.

Apesar do grau histológico atribuído ao tumor poder estar associado ao prognóstico do paciente, a OMS destaca que o tamanho do tumor e o envolvimento dos linfonodos são fatores prognósticos mais importantes. Dessa forma, além da gradação 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.

O sistema de estadiamento mais utilizado é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. Desenvolvido por Pierre Denoix, o sistema TNM baseia-se na extensão anatômica da doença, levando em conta as características do tamanho do tumor primário (T), as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N) e a presença ou ausência de metástases à distância (M). Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, N0 a N3 e M0 a M1. Dessa forma, os tumores são agrupados em estádios clínicos, que podem variar do 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).

Dependendo da localização, da extensão do tumor primário e do envolvimento dos linfonodos cervicais, o tratamento do CEB pode ser cirúrgico e/ou associado à radioterapia e quimioterapia. A cirurgia para ressecção dos tumores primários deve sempre incluir toda lesão tumoral e margem de tecido livre de tumor em todas as dimensões (mínimo de 1,0cm de margem), confirmada no ato cirúrgico por exame de congelação. Em casos de lesões localizadas na língua, sítio mais acometido pelo CEB, deve-se associar, ao tratamento do tumor primário, o esvaziamento cervical supra-omo-hióideo, em virtude do alto índice de metástase cervical oculta (BRASIL, INCA, 2014). Devido ao diagnóstico tardio, quando a doença já se encontra em estágio avançado, o tratamento do CEB está frequentemente associado a uma alta morbidade e pode resultar em dificuldades na fala, deglutição e mastigação, mutilação facial e, conseqüentemente, problemas no âmbito psicológico.

2.2 VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG

Inicialmente descrita em *Drosophila melanogaster* (GOODRICH, 1997), a via HH foi conservada evolutivamente, embora estudos genéticos apontem que, diversas proteínas necessárias para a cascata sinalizadora em humanos, não tem um papel evidente em *Drosophila*. É bem estabelecido o papel da via HH no desenvolvimento embrionário e na organogênese, participando na formação de dentes (HARDCASTLE et al., 1998), pulmões (GRINDLEY et al., 1997), cólon, mama, esôfago (INGHAM; MCMAHON, 2001), próstata e estômago (CHARI; MCDONNELL, 2007). A desregulação desta via acarreta em sérios defeitos congênitos, como holoprosencefalia, ciclopia e microcefalia (HUANGFU; ANDERSON, 2006; COHEN, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013).

Em humanos, os componentes centrais da via HH consistem nos três ligantes (SHH, IHH e DHH), o 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). O mecanismo exato pela qual a via HH é ativada ainda não foi completamente elucidado. No entanto, o cílio primário parece ser uma importante interface através da qual esta via de sinalização, em humanos, é regulada (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013). Por exemplo, mutações no transporte intraflagelar, que normalmente funciona com movimentos retrógrados e anterógrados de moléculas no interior do cílio primário, resulta em perda de função da via HH em camundongos (COHEN, 2012).

O cílio primário é uma organela de forma microtubular que se estende da membrana plasmática, age como uma “antena” que detecta sinais extracelulares e transmite estes sinais para o núcleo, a fim de gerar uma resposta celular. No cílio primário, os componentes centrais da via HH se localizam de maneiras diferentes, dependendo da presença ou ausência do ligante. Assim, o provável mecanismo funcional deste compartimento subcelular é regular a via HH, por aumentar a concentração local e possibilitar interações protéicas necessárias para a ativação da cascata sinalizadora (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012).

A ativação da via HH no contexto do cílio primário está ilustrada esquematicamente na Figura 1. Na ausência de ligante, PTCH1 localiza-se no interior do cílio primário e promove a supressão da atividade de SMO, impedindo a translocação desta proteína. Os fatores de transcrição GLI (GLI1, GLI2 e GLI3) são codificados por genes distintos, sendo que, com exceção de GLI1, estas proteínas são processadas em formas ativadoras, quando na presença do ligante, ou repressoras, quando na ausência deste (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013). Os fatores de transcrição GLI são mantidos no citoplasma por um complexo repressor composto por diversas proteínas, como *Suppressor of*

Fused (SUFU) e *Fused* (FU). 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).

Quando há interação do ligante Hh com PTCH1, o receptor transmembrânico é deslocado do cílio, permitindo, desta forma, o acúmulo ciliar 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 (GLI_A) e consequente indução da expressão de genes alvo da via HH (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012).

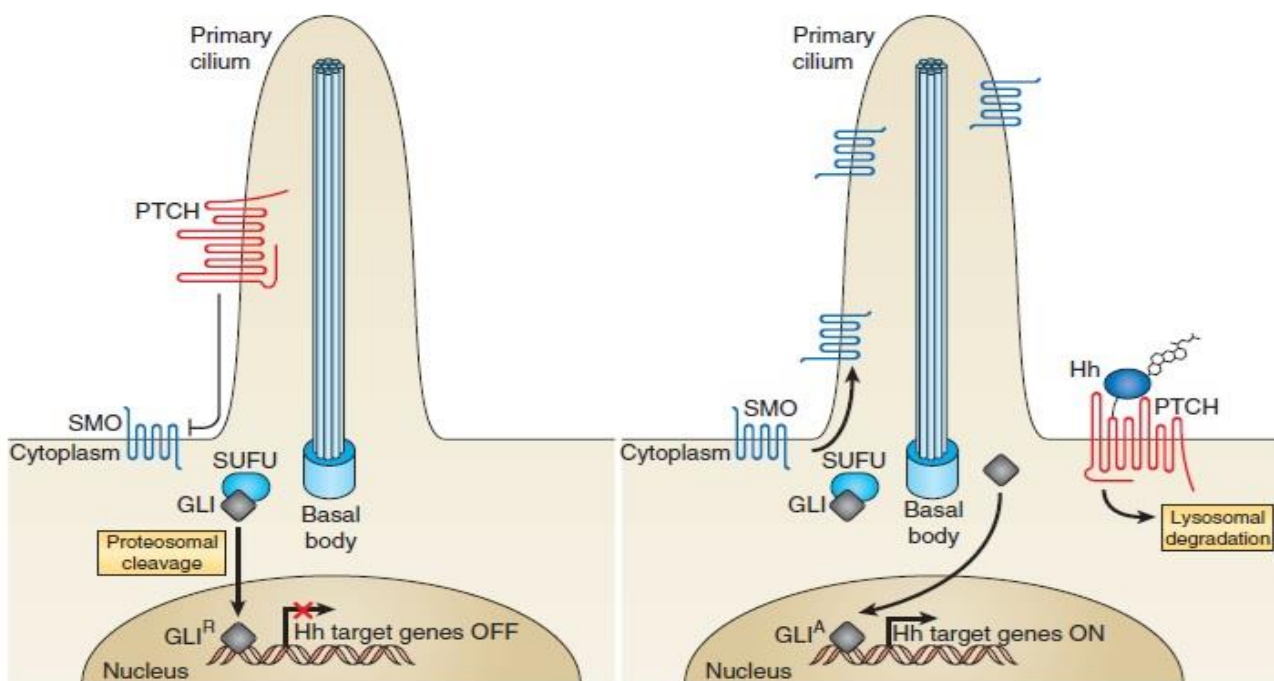


Figura 1. Componentes e o funcionamento da via Hedgehog em humanos. (a) Na ausência do ligante HH, PTCH localiza-se no cílio e inibe a atividade de SMO. O fator de transcrição GLI é mantido no citoplasma e segue para a clivagem e resulta na sua forma repressora. (b) Na presença do ligante, PTCH é translocado 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: AMAKYE et al., 2013.

A atividade da via HH resulta na ativação de genes alvos envolvidos em uma variedade de funções celulares, como controle da proliferação e sobrevivência celular (Myc, Bcl-2, β -catenina, ciclina D1), transição epitélio-mesênquima (Snail, Zeb1, Zeb2) manutenção de células-tronco teciduais (Wnt5a), angiogênese (VEGF, angiopoietina-1, angiopoietina-2) e destino celular (Sox2, Nanog) (MERCHANT; SAQUI-SALCES, 2014). Adicionalmente, GLI e PTCH1 também são genes alvo da via, envolvidos assim num mecanismo de feedback (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; MERCHANT; SAQUI-SALCES, 2014).

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 (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013). A conexão inicial entre a expressão aberrante da via HH e o câncer foi descrita na síndrome de Gorlin-Goltz, uma condição rara na qual os indivíduos possuem mutações em componentes da via HH, permitindo a sua ativação constitutiva (GORLIN et al., 1995). Essa identificação permitiu que, ao longo dos anos, estudos demonstrassem que mutações nos componentes da via HH têm importante papel na patogênese de tumores humanos, como no câncer do trato gastrointestinal (INGHAM; MCMAHON, 2001), de pâncreas (THAYER et al., 2003), pulmão (HWANG et al., 2014), próstata (CHARI; MCDONNELL, 2007) e boca (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL et al., 2011; HONAMI et al., 2012; LEOVIC et al., 2012).

Embora já bem estudados em outros tipos de carcinomas, como gástrico e pancreático (INGHAM; MCMAHON, 2001; THAYER et al., 2003), ainda não são bem estabelecidos os mecanismos da via HH envolvidos na patogênese do CEB. 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.(2011) 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 VIA HEDGEHOG E A PROLIFERAÇÃO E DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Dos três ligantes identificados em mamíferos (SHH, IHH e DHH), o SHH é o mais estudado em tumores humanos, principalmente devido ao paradigma de que os resultados de experimentos que envolvem a proteína SHH podem ser estendidos aos outros ligantes da via (STECCA; RUIZ, 2002).

Alguns experimentos indicam que os ligantes HH tem propriedades biológicas similares, mas que interagem de forma diferenciada com o receptor PTCH1, sendo o morfógeno SHH o que se liga com maior afinidade, seguido do IHH e DHH, respectivamente (BITGOOD; MCMAHON, 1995; PATHI et al., 2001; PETTIGREW; ASP; EMERSON, 2014). Outros estudos funcionais, no entanto, já demonstraram que cada um destes ligantes tem funções distintas (BITGOOD; MCMAHON, 1995; PATHI et al., 2001).

Estudos têm demonstrado que a proteína IHH não é um homólogo funcional do ligante SHH durante a tumorigênese (ADOLPHE et al., 2004; VAN DEN BRINK et al., 2004), o que significa que a expressão dessa proteína pode estar relacionada a funções biológicas distintas em tumores e, inclusive, IHH pode agir como inibidor competitivo de SHH (FU; YANG; ZHAO, 2009). O estudo de Van Den Brink et al. (2006), por exemplo, demonstrou que a proteína IHH é mais expressa em células superficiais do colón, enquanto que SHH é ausente ou observada em

baixos níveis. Em adenomas de colón, Van Den Brink et al. (2004) demonstraram uma perda de da proteína IHH, enquanto Douard et al. (2006) e Oniscu et al. (2004) descreveram uma maior expressão de SHH em adenocarcinomas e adenomas dessa mesma localização. Assim, parece que o padrão de expressão de SHH e IHH pode ser mutuamente exclusivo, com reflexos nas propriedades biológicas celulares.

Nesse sentido, Van Den Brink et al. (2004) destaca a proteína SHH na proliferação celular em colonócitos, enquanto IHH regula a diferenciação (ADOLPHE et al., 2004). Por conseguinte, IHH pode se comportar como um inibidor competitivo de SHH para ligação para PTCH1, e a expressão relativa de IHH e SHH pode desempenhar um papel na manutenção do equilíbrio entre a proliferação e diferenciação do epitélio do cólon (VAN DEN BRINK et al., 2004; FU; YANG; ZHAO, 2009). Já em câncer de mama, Xuan; Lin (2009) descreveram uma associação positiva entre a quantidade da proteína IHH e proliferação.

A proteína IHH é fundamental na coordenação de vários eventos celulares durante o desenvolvimento endocondral do osso, incluindo a proliferação e diferenciação de condrócitos e osteoblastos (LAI; MITCHELL, 2005; DAS et al., 2012). O mecanismo pelo qual IHH promove a proliferação de condrócitos tem sido associado à reguladores do ciclo celular, apesar de ainda não estar bem esclarecido. A proteína ciclina D1 promove a progressão do ciclo celular através da transição da fase G1/S e uma vez que, em camundongos, uma diminuição da proliferação de condrócitos é acompanhada por uma redução da expressão de ciclina D1, foi sugerido esta que medeia os efeitos proliferativos de IHH (LAI; MITCHELL, 2005).

A capacidade proliferativa das células neoplásicas consiste numa característica importante para o crescimento tumoral e, conseqüentemente, pode ser utilizada como um fator prognóstico (LEE et al., 2010). Dentre os marcadores de proliferação celular, a proteína Ki-67 é a mais conhecida, sendo expressa em células que estão em proliferação, mas desaparecendo rapidamente

quando a célula entra em um estado de repouso (ENDL et al., 2001). Mais recentemente, têm sido estudadas as proteínas de manutenção de minicromossomo (MCMs), as quais cumprem um papel fundamental na replicação do DNA eucariótico, garantindo que esta só ocorra uma vez a cada ciclo celular (LEE et al., 2010; LAMEIRA et al., 2014). Essa família de proteínas é expressa em todas as fases durante o ciclo celular, em células que estão em proliferação e células que já proliferaram, mas que não completaram o processo de diferenciação (ENDL et al., 2001; LEE et al., 2010; ASHKAVANDI et al., 2013).

De forma similar aos demais membros da família MCM, a proteína MCM3 tem seus níveis intracelulares diminuídos em células diferenciadas ou quiescentes (ENDL et al., 2001). Segundo Lee et al. (2010), a expressão desta proteína fornece resultados mais sensíveis e confiáveis para a avaliação do perfil proliferativo de uma população celular, uma vez que parece estar expressa, no ciclo celular, por um período maior do que a proteína Ki-67. Além disso, Lameira et al. (2014) ressalta que, no diz que respeito às neoplasias malignas, a expressão da proteína Ki-67 fornece informações pouco precisas, uma vez que demonstra a fração total de células proliferantes, ou seja, qualquer célula que esteja no ciclo celular. Dessa forma, esta proteína também evidencia células que, apesar de estar em proliferação, irão completar a diferenciação, não desenvolvendo o fenótipo maligno. Ainda, a proteína Ki-67 pode estar expressa quando a síntese de DNA está bloqueada ou em células apoptóticas (SZELACHOWSKA et al., 2006; LAMEIRA et al., 2014).

A utilização das proteínas MCM como para auxílio no diagnóstico tem sido descrito em alguns tumores humanos, como tumores de glândula salivar (ASHKAVANDI et al., 2013), carcinoma papilífero da tireóide (LEE et al., 2010) e melanoma (NODIN et al., 2012). Em CEBs, a imunexpressão da proteína MCM2 foi associada ao prognóstico do tumor (KODANI, 2003), sendo considerada melhor que a proteína Ki-67 (SZELACHOWSKA et al., 2006).

2.4 VIA HEDGEHOG E A ANGIOGÊNESE

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; SANDLUND et al., 2006; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Adicionalmente, a formação de vasos sanguíneos pode ser observada mesmo antes da identificação macroscópica de neoplasias malignas em modelos experimentais, sugerindo que os eventos angiogênicos são essenciais para a expansão clonal destes tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Em neoplasias, o equilíbrio entre os reguladores positivos e negativos do processo angiogênico é perdido, gerando um sistema vascular aberrante, composto por vasos que não possuem capacidade de cessar o processo proliferativo e que se encontram em constante reconstrução (BERGERS; BENJAMIN, 2003; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Dessa forma, enquanto a densidade dos vasos normais é dada pelas necessidades metabólicas de nutrientes e oxigênio, a anormalidade funcional e estrutural dos vasos tumorais é dada pela natureza patológica da sua indução (BERGERS; BENJAMIN, 2003).

A via HH apresenta um importante papel na formação de novos vasos sanguíneos, tanto em tecidos embrionários (vasculogênese), quanto em tecidos adultos (angiogênese). Em tumores humanos, a maior expressão de componentes desta via pode influenciar o microambiente tumoral e, conseqüentemente, o processo angiogênico (CHEN et al., 2011; HARRIS et al., 2012). Os ligantes da via HH podem induzir a formação de vasos sanguíneos através da secreção de fatores angiogênicos, incluindo o *vascular endothelial growth factor* (VEGF) e angiopoietinas, por células mesenquimais, especialmente após isquemia (OLSEN et al., 2004; HARRIS et al., 2012). Além

de modular níveis de moléculas pró-angiogênicas em células estromais, os morfógenos HH também podem influenciar a angiogênese através da via não-canônica (CHEN et al., 2011).

Harris et al. (2012) demonstraram que o ligante SHH aumenta a vascularização e a angiogênese *in vitro*, por um mecanismo independente de VEGF, em câncer de mama. Pinter et al. (2013) apontam que o tratamento com um antagonista de SMO diminuiu a angiogênese tumoral, contribuindo significativamente para a redução do carcinoma hepatocelular em modelos experimentais. Esses autores ressaltam ainda que o bloqueio da via HH não interferiu nas células endoteliais, em termos de viabilidade e migração, mas contribuiu para a diminuição de expressão de moléculas pró-angiogênicas, especialmente VEGF. Analogamente, Mathew et al. (2014) sugeriram que a via HH participa, de uma forma dose-dependente, da angiogênese no contexto do câncer de pâncreas.

Vários estudos têm identificado os ligantes HH como moléculas que atuam na sinalização pró-angiogênica (OLSEN et al., 2004; PINTER et al., 2013). Nesse sentido, sugere-se que a inibição da via HH pode ser utilizada como modalidade terapêutica em vários tipos de neoplasias, uma vez que irá modular negativamente a formação de vasos sanguíneos, contribuindo para um menor aporte de substâncias necessárias à progressão tumoral (OLSEN et al., 2004; MATHEW et al., 2014).

Dentre as estratégias utilizadas para estudar a angiogênese tumoral, a caracterização da microdensidade vascular (MDV), através da imuno-histoquímica, consiste num método cientificamente adequado (SANDLUND et al., 2006). Dos diversos marcadores endoteliais disponíveis, o CD34 e endogлина (CD105) têm se destacado no estudo de neoplasias. Apesar de identificada em tecidos normais e neoplásicos, a proteína CD34 é encontrada em células endoteliais em atividade angiogênica (KUZU et al., 1992), enquanto a CD105 é encontrada em células endoteliais humanas em proliferação, especialmente quando estas estão em condições de

hipóxia (SANDLUND et al., 2006; MARIONI et al., 2010a). Marioni et al. (2010b) ressaltam ainda que a proteína CD34 pode ser encontrada em vasos estáveis, os quais não estão participando do processo angiogênico e, por isso, seria mais utilizado como um marcador pan-endotelial.

Desta forma, o marcador CD105 se destaca no estudo da angiogênese tumoral, uma vez que o mesmo não é observado em vasos pré-existentes e tecido normal (SANDLUND et al., 2006). De fato, a proteína CD105 já foi demonstrada como um potencial marcador prognóstico em algumas neoplasias, como o carcinoma escamocelular da cabeça e pescoço (MARIONI et al., 2010a; MARIONI et al., 2010b).

2.5 MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR

Atualmente, a percepção do câncer foi ampliada e deve ser compreendida em um contexto de microambiente, onde interagem células tumorais propriamente ditas, células ditas genotipicamente normais (fibroblastos, células imunes, células endoteliais), vasos e substâncias produzidas localmente ou provenientes da irrigação sanguínea (SICA et al., 2006; SICA et al., 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Dentre as células de defesa, os macrófagos parecem constituir a maior fração celular no microambiente tumoral (BINGLE; BROWN; LEWIS, 2002; ALLAVENA et al., 2008; SICA et al., 2008). Em tecidos em desenvolvimento ou em reparo, os macrófagos exercem papéis fundamentais, estando envolvidos na remodelação de matriz extracelular, remoção de células apoptóticas e angiogênese (BINGLE; BROWN; LEWIS, 2002). No tecido tumoral, fatores quimiotáticos derivados de células neoplásicas recrutam monócitos circulantes, os quais se diferenciam em macrófagos associados ao tumor (TAM – *tumor-associated macrophages*).

Os macrófagos possuem a capacidade de influenciar o crescimento e progressão tumoral, podendo tanto desempenhar funções que impedem o estabelecimento e disseminação das células neoplásicas quanto funções que favoreçam o desenvolvimento do tumor. A atividade paradoxal dos macrófagos reflete a heterogeneidade e plasticidade funcional dessas células, que podem expressar diferentes fenótipos e programas funcionais em respostas a sinais distintos do microambiente tumoral (ALLAVENA et al., 2008; SICA et al., 2008).

Classicamente, existem dois grupos de macrófagos, diferenciados de acordo com o modo de ativação, receptores e citocinas produzidas: M1 e M2. Os macrófagos M1, também denominados de “classicamente ativados”, estão associados a atividades anti-proliferativas e citotóxicas, enquanto que os macrófagos M2, também chamados de “alternativamente ativados”, são capazes de promover imunossupressão e angiogênese (SICA et al., 2006; SICA et al., 2008). Assim, essas células parecem exercer papéis distintos no desenvolvimento neoplásico, sendo o M2 uma célula com atividade pró-tumoral.

Os macrófagos M1 são ativados por produtos microbianos ou IFN- γ , produzem citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-12, IL-23, IFN- γ , IL-18, TNF- α , sendo, conseqüentemente, promotores da resposta imune Th1 e atuando na resposta contra patógenos (especialmente parasitas intracelulares) e células neoplásicas. Adicionalmente, estas células exercem atividades anti-proliferativa e citotóxica, resultante da capacidade de secretar NO, peróxido de hidrogênio e superóxidos (BINGLE; BROWN; LEWIS, 2002; ALLAVENA et al., 2008; OBEID et al., 2013). Por sua vez, os macrófagos M2 são caracterizados por sua capacidade de secretar citocinas anti-inflamatórias e imunossupressoras tais como IL-3, IL-4, IL-10 e TGF- β . Assim, o M2 é capaz de inibir as funções do M1, particularmente, as funções inflamatórias e citotóxicas. Os macrófagos M2 podem, ainda, promover a angiogênese, bem como secretar

enzimas proteolíticas (metaloproteinases) capazes de degradar a matriz extracelular, facilitando, desta maneira, a disseminação das células neoplásicas (SICA et al., 2006; SICA et al., 2008).

Devido às diferentes funções que exercem, os TAM também poderiam ser considerados como uma evidência de resposta contra a progressão neoplásica. No entanto, alguns estudos apontam que estímulos que induzam a polarização em macrófagos M1 geralmente não estão presentes no microambiente tumoral. Por outro lado, existem fatores, expressos no sítio neoplásico (TGB- β , IL-10), que potencialmente podem promover a diferenciação e polarização dos monócitos em macrófagos M2 (SICA et al., 2006; ALLAVENA et al., 2008; SIVEEN; KUTTAN, 2009). Dessa forma, acredita-se que TAM geralmente são polarizados em macrófagos M2, apresentando funções pró-tumorais (MARIONI et al., 2010a; SHIRABE et al., 2012; OBEID et al., 2013; HE et al., 2014; PEDERSEN et al., 2014).

No microambiente tumoral, os monócitos se diferenciam em TAM, os quais estabelecem uma estreita relação com as células neoplásicas. Diversos fatores derivados do tumor modulam a sobrevivência dos TAM e, por sua vez, TAM secretam fatores de crescimento, os quais promovem proliferação e sobrevivência de células neoplásicas, regulam deposição de matriz extracelular e ativam a neo-angiogênese (SICA et al., 2006). Macrófagos perivasculares secretam EGF, captado pela célula tumoral, que expressa receptor de EGF e assim realiza a quimiotaxia até o vaso sanguíneo. Por sua vez, as células neoplásicas secretam CSF-1 (macrophage *colony-stimulating factor 1*), que atrai macrófagos e os estimula a produzir mais EGF, completando um ciclo parácrino (CONDEELIS; POLLARD, 2006).

A angiogênese, processo fundamental no crescimento e progressão tumoral, está intrinsecamente relacionada aos macrófagos M2 (BINGLE; BROWN; LEWIS, 2002; GUO et al., 2013). Em tumores, o estresse causado pela hipóxia induz a expressão de moléculas inflamatórias, as quais recrutam macrófagos e estimulam a polarização destes no fenótipo M2

(BINGLE; BROWN; LEWIS, 2002; SIVEEN; KUTTAN, 2009). Uma vez ativados, TAM passam a secretar diversos fatores pró-angiogênicos, como VEGF, FGF, PDGF, TNF- α e IL-8 (WANG et al., 2013). Adicionalmente, TAM podem expressar proteases, como metaloproteinases de matriz (MMP 1, 3, 9) e, através da remodelação tecidual, facilitar a angiogênese (SIVEEN; KUTTAN, 2009; SOLINAS et al., 2009; SHIRABE et al., 2012; OBEID et al., 2013). A figura 2 ilustra a interação das células neoplásicas com TAM.

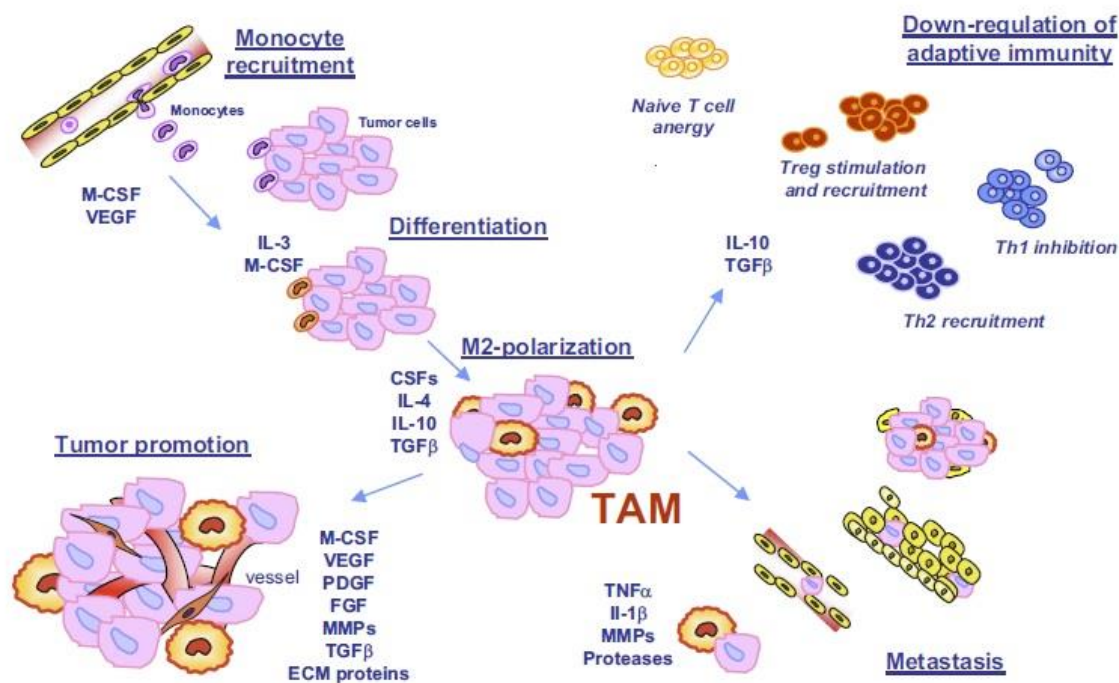


Figura 2. Macrófagos associados ao tumor (TAM). Fatores quimiotáticos derivados de tumores recrutam monócitos circulantes para o sítio tumoral. No microambiente tumoral, os monócitos se diferenciam em macrófagos associados ao tumor (TAM), os quais estabelecem uma estreita relação com as células neoplásicas. Fonte: SOLINAS et al., 2009.

Condeelis e Pollard (2006) relataram que a depleção de macrófagos em camundongos, através de uma mutação homozigótica no gene CSF-1, reduziu a progressão tumoral e praticamente erradicou a metástase tumoral em um modelo de câncer de mama. Também em câncer de mama, Obeid et al. (2013) relataram uma correlação positiva entre uma maior

densidade de vasos sanguíneos e o aumento de macrófagos no estroma tumoral, assim como uma relação inversa entre a densidade dessas células e a sobrevida. Em carcinoma hepatocelular, TAM estiveram associados a um pior prognóstico, especialmente devido ao estímulo angiogênico e maior potencial metastático (SHIRABE et al., 2012; KONG et al., 2013). De forma similar, Kamper et al. (2011) e Pedersen et al. (2014) consideraram a maior quantidade de macrófagos intratumorais, em linfomas, como um fator de pior prognóstico.

Em CEB, alguns estudos já sugeriram que macrófagos estão presentes no estroma tumoral, contribuindo para o desenvolvimento desta neoplasia (MORI et al., 2011; FUJII et al., 2012; FRANÇA et al., 2013). França et al. (2013), estudando o fator inibitório de migração de macrófagos (MIF) em CEB, encontraram que tumores sem expressão de MIF tinham pior prognóstico quando comparado àqueles que exibiam a expressão de MIF, o que reforça o papel de macrófagos no desenvolvimento de CEB. De forma similar, De Souza et al. (2014) indicaram que os níveis séricos de MIF reduzem após a ressecção cirúrgica do CEB. Em seu estudo, Mori et al. (2011) comparou a densidade de macrófagos M1 e M2, demonstrando que existem poucos macrófagos M1 no estroma tumoral de CEB, enquanto a densidade de M2 tem sido relacionada a tumores menos diferenciados e com pior prognóstico (MORI et al., 2011; COSTA et al., 2013; HE et al., 2014; WANG et al., 2014) e menor sobrevida (COSTA et al., 2013; WANG et al., 2014).

Dentre os marcadores de macrófagos, o CD163, receptor presente apenas em monócitos e macrófagos, está envolvido em funções anti-inflamatórias, sendo comumente utilizado para caracterização do fenótipo M2. Apesar de largamente utilizado, o CD68 é, quando comparado ao CD163, menos específico, uma vez que sua expressão também pode ser observada em outras células fagocitárias (KAMPER et al., 2011; BARROS et al., 2013; KONG et al., 2013; PEDERSEN et al., 2014). Dessa forma, a marcação de CD68 pode superestimar a densidade de

macrófagos presente no microambiente tumoral (BARROS et al., 2013), além de não distinguir os subtipos de macrófagos (FUJII et al., 2012; KONG et al., 2013; HE et al., 2014). Apesar de ser considerado um marcador do fenótipo M2, não há consenso se todas as células CD163+ representam, no microambiente tumoral, este subtipo de macrófago. Estudos *in vivo*, que reproduzam melhor a complexidade da resposta imune, devem ser realizados para caracterizar a polarização dos macrófagos (BARROS et al., 2013).

Recentemente, foram identificados receptores e componentes intracelulares da via HH em monócitos humanos, como IHH, DHH, PTCH1, SMO e SUFU, indicando que essas células são capazes de transduzir a sinalização iniciada pelos morfógenos HH (DUNAEVA et al., 2010; SCHUMACHER et al., 2012) e/ou secretar os ligantes da via para o ambiente tecidual. Em um modelo de diabetes mellitus, Dunaeva et al. (2010) demonstraram que SHH e IHH estimulam a quimiotaxia de monócitos, o que por sua vez irá facilitar a angiogênese. Ainda, na esquistossomose humana, os macrófagos produzem o ligante IHH, o qual promove uma ativação do perfil M2 (PEREIRA et al., 2013).

A identificação e caracterização do fenótipo de macrófagos abrem caminhos para a compreensão da resposta imune na tumorigênese, bem como para o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas, tendo como alvo células “normais” (não-neoplásicas) do microambiente tumoral, que frequentemente não apresentam taxas de proliferação desreguladas ou instabilidade genética aumentada.

Diante do exposto, observa-se que a via HH participa na patogênese de diversos tumores humanos, incluindo o CEB, apresentando um importante papel na formação de novos vasos sanguíneos, proliferação e sobrevivência das células neoplásicas. Ainda, os componentes desta cascata sinalizadora influenciam o microambiente tumoral e, conseqüentemente, as células presentes

neste, como os macrófagos, os quais podem transduzir a via e contribuir com a progressão tumoral.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de componentes da via HH (SHH, IHH e GLI1) em CEBs, associando a imunoexpressão dessas moléculas com os aspectos clínicos, angiogênese, graus de diferenciação tumoral, potencial proliferativo e macrófagos CD163+.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estudar o perfil de expressão das proteínas SHH, IHH e GLI1 em componentes celulares do parênquima e estroma de CEBs;
- Analisar o padrão de expressão e localização das proteínas SHH e IHH em CEBs e margens tumorais, associando os aspectos encontrados com os graus de diferenciação tumoral e potencial proliferativo;
- Avaliar se macrófagos CD163+ expressam a proteína IHH em CEBs;
- Investigar a relação entre vasos GLI1/CD105 positivos;
- Investigar a associação entre macrófagos CD163+ e angiogênese em CEBs;
- Comparar a expressão de proteínas da via HH, macrófagos CD163+ e angiogênese entre CEBs, margens tumorais e mucosas não neoplásicas.

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 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.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Foram estudados 28 casos de CEB de pacientes admitidos no Hospital Aristides Maltez (Salvador, Bahia), no período compreendido entre 2011-2013. Parte dos espécimes cirúrgicos removidos para tratamento desta doença foram fixados em formol tamponado neutro 10% e processados seguindo as rotinas histotécnicas do CPqGM. Para uma análise comparativa, foram analisadas as margens tumorais (MAT) e selecionadas àquelas (n=9) livres de tumor. Também foram incluídos 4 casos de mucosa bucal não neoplásica (MNN), obtidas de pacientes saudáveis, a partir da remoção de terceiros molares não irrompidos.

Todos os pacientes foram abordados na consulta inicial no 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. Além disso, foi preenchida uma ficha clínica elaborada pela nossa equipe, a qual permitiu a coleta de dados mínimos referentes à história clínica, hábitos e tratamento dos pacientes.

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

4.3 ESTUDO HISTOLÓGICO

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). Para a análise de CEBs e MATs, foram considerados os parâmetros definidos pela Classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005) (Tabela 1) e todos os casos foram avaliados por um patologista experiente.

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.

4.4 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 imunomarcagem para os anticorpos MCM3, SHH, IHH, GLI1, CD163 e CD105 de acordo com o protocolo de imunohistoquímica do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do CPqGM. 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 SolutionTM, Dako, Carpinteria, USA) foi realizado protegido da luz, por 10 minutos, e o bloqueio das proteínas teciduais realizado também por 10 minutos (Protein Blocking SolutionTM, 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 (AdvanceTM, Dako Corporation, Carpinteria, USA) foram aplicados nos cortes histológicos, 20 minutos cada. As reações foram reveladas com 3,3-diaminobenzidina (Dako, Carpinteria, USA), por 5 minutos, em câmara escura e, posteriormente, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto e montadas com bálsamo do Canadá natural. Para o controle negativo, cada anticorpo primário foi substituído por soro normal de mesmo isotipo.

Tabela 2. Dados do fabricante, clone, recuperação antigênica e diluição dos anticorpos.

Anticorpo	Marca comercial	Clone	Controle positivo	Recuperação antigênica	Diluição
SHH	Novus Biologicals	5H4	Placenta	Citrato pH 6.0	1:1000
IHH	Novus Biologicals	EP1192Y	Placenta	Citrato pH 6.0	1:500
GLI 1	Novus Biologicals	Policlonal	Placenta	Citrato pH 6.0	1:600
MCM3	Dako	101	Câncer de mama	Citrato pH 9.0	1:50
CD105	Dako	SN6h	Placenta	Citrato pH 9.0	1:50
CD163	SantaCruz	GH1/61	Carcinoma epidermóide	Citrato pH 6.0	1:50

A co-localização das proteínas IHH/CD163 em CEBs foi identificada utilizando o kit EnVision™ G2 Doublestain System e o sistema polimérico de amplificação Advance™ (Dako, Carpinteria, USA), com os cromógenos Red Permanent e Vina Green. Para as proteínas GLI1/CD105, foi utilizado o sistema Advance™ (Dako, Carpinteria, USA) e MACH 3™ Fosfatase Alcalina (Biocare Medical), com os cromógenos 3,3-diaminobenzidina e Ferangi Blue.

IHH/CD163

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 com citrato pH 6.0, em calor úmido por 45 minutos. Para bloqueio da peroxidase endógena e de proteínas teciduais, foi utilizado o reagente Dual Endogenous Enzyme Block™ (Dako, Carpinteria, USA), em temperatura ambiente (TA) por 10 minutos.

O primeiro anticorpo primário (CD163) foi incubado por 1 hora em TA e, após isto, exposto ao reagente Rabbit/Mouse Link™ (Dako, Carpinteria, USA) por 20 minutos. Foi então aplicado nos cortes o Polymer/AP por 20 minutos e a reação revelada com a solução Permanent Red Working Solution (Dako, Carpinteria, USA), por 15 minutos. Após esta primeira revelação, os cortes histológicos foram incubados com a solução Doublestain Block HRP™ (Dako, Carpinteria, USA) por 10 minutos.

O segundo anticorpo primário (IHH) também foi incubado por 1 hora em TA. Em seguida, os reagentes HRP Link e HRP Enzyme (Advance™, Dako Corporation, Carpinteria, USA) foram aplicados nos cortes histológicos, 20 minutos cada. Esta segunda reação foi revelada com a solução Vina Green (Biocare Medical), por 20 minutos. Após lavagens com água destilada, as lâminas foram montadas em glicerina 10%.

GLI1/CD105

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 com citrato pH 9.0, em calor úmido por 45 minutos. 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).

O primeiro anticorpo primário (GLI1) foi incubado por 1 hora em TA e, após isto, exposto aos reagentes HRP Link e HRP Enzyme (Advance™, Dako Corporation, Carpinteria, USA), 20 minutos cada. A reação foi revelada com 3,3-diaminobenzidina (Dako, Carpinteria, USA), por 5 minutos, em câmara escura. Após esta primeira revelação, foi realizado um novo

bloqueio de proteínas teciduais (Protein Blocking Solution™, Dako, Carpinteria, USA), por 30 minutos.

O segundo anticorpo primário (CD105) também foi incubado por 1 hora em TA. Em seguida, os reagentes MACH 3 Mouse Probe e MACH3 Mouse AP-Polymer (MACH3™, Biocare Medical) foram aplicados nos cortes histológicos, 20 minutos cada. Esta segunda reação foi revelada com a solução Ferangi Blue (Biocare Medical), por 20 minutos. Após lavagens com água destilada, as lâminas foram montadas em glicerina 10%.

4.5 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

As lâminas foram escaneadas em microscópio digital virtual Aperio (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) e exibidas em um monitor de LCD com auxílio do Aperio Image Scope (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Para as proteínas SHH, IHH, GLI1 e MCM3, foram selecionadas 5 áreas coincidentes e representativas (aumento final 200x) de cada caso de CEB, sendo que cada área deveria ter pelo menos 75% de parênquima tumoral (Figura 3). Para a análise da angiogênese e dos macrófagos CD163+, foram avaliadas áreas de estroma adjacentes às ilhas tumorais, sendo selecionadas as 5 áreas com maior marcação de CD163. A seguir, estas mesmas áreas foram analisadas para a marcação de CD105 (Figura 3). As mesmas análises foram realizadas em MAT e MNN.

Figura 3. Método de seleção de áreas coincidentes para a análise dos marcadores MCM3, SHH, IHH, GLI1, CD163 e CD105.

a) Análise do Potencial Proliferativo:

Foram analisados 5 campos representativos em cada caso de CEB, MAT e MNN em aumento final de 200x. As células que exibiram marcação citoplasmática/nuclear positiva para a proteína MCM3 foram contadas em cada campo, com auxílio do programa Image J (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 imunomarcção e o intervalo de confiança (IC). Como o CEB apresentou o maior perfil proliferativo, esta foi considerada a amostra padrão e, portanto, os casos de CEB, MAT e MNN foram divididos em dois grupos, considerando a mediana de CEB: casos que exibem número de células MCM3 positivas maior que a mediana (AP, Alto potencial proliferativo) e menor que a mediana (BP, Baixo potencial proliferativo). Não foram avaliados os casos que possuíam o número de células MCM3 positivas dentro do IC.

b) Análise das proteínas MCM3, SHH, IHH e GLI1:

Para a análise das proteínas MCM3, SHH, IHH e GLI1 levou-se em consideração a localização dos antígenos: membranas e/ou citoplasmático (SHH e IHH) e citoplasmático e/ou nuclear (GLI1 e MCM3), considerando o tipo celular e se a marcação ocorreu no parênquima e/ou no estroma dos CEBs ou epitélio e/ou lâmina própria de MAT e MNN. No parênquima/epitélio, foram contadas células positivas e negativas de cada campo microscópico e utilizada a seguinte fórmula para calcular a proporção de células imunomarcadas: células positivas/número total de células. Em seguida, foram adotados critérios de semi-quantificação, conforme descrito por Gurgel et al. (2008): escore negativo (-), <5% de células imunomarcadas; escore 1+, 5-25%; escore 2+, 26-50%; escore 3+, 51-75%; escore 4, >76% de células imunomarcadas. Com relação ao estroma/lâmina própria, foi realizada uma análise semi-

quantitativa considerando-se se houve mais ou menos de 50% de células positivas em relação ao total de células.

c) **Análise das proteínas CD163 e 105:**

Foram selecionadas 5 áreas de maior marcação de CD163 e, a seguir, estas mesmas áreas foram analisadas para CD105, em aumento final de 200x. Foram considerados positivos qualquer vaso sanguíneo que apresentasse luz e coloração acastanhada. Com auxílio do Aperio Image Scope (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha), as áreas em aumento de 200x foram medidas, sendo o resultado final obtido como densidade de macrófagos CD163+ (DM) por mm² e microdensidade vascular (MDV) por mm².

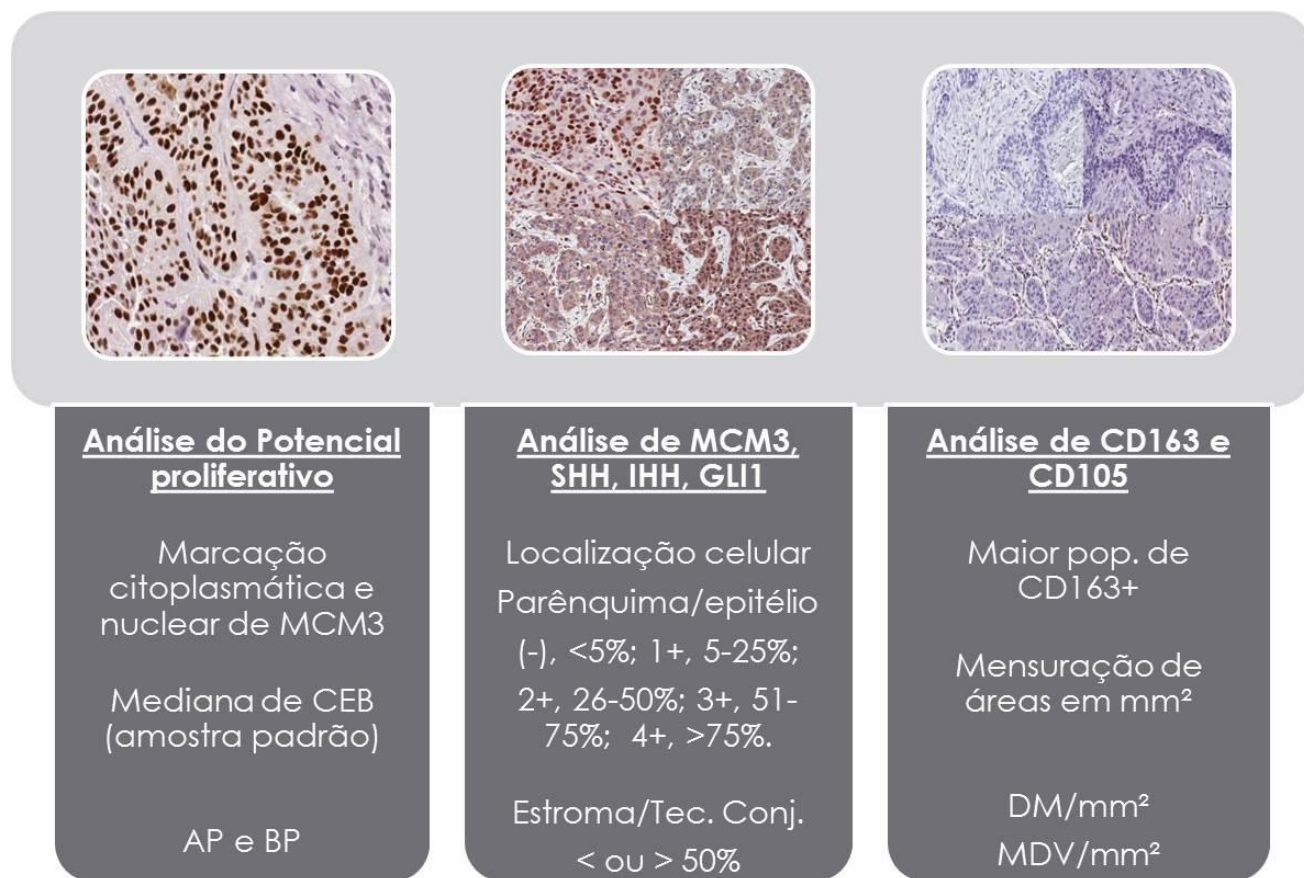


Figura 4. Esquema da metodologia adotada para a análise imuno-histoquímica.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram compilados em um banco de dados organizado em planilhas do programa operacional *Microsoft Excel* e a análise estatística foi realizada utilizando o *Software GraphPad Prism* versão 6.03 (*GraphPad Software, Inc., San Diego, USA*). 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 não-paramétricos, devido à distribuição assimétrica dos resultados e tamanho amostral.

As amostras foram comparadas utilizando os seguintes testes estatísticos:

Mann-Whitney: para comparar e testar diferenças estatísticas entre duas amostras independentes.

Kruskall-Wallis com o pós-teste de Dunn: para comparar e testar diferenças estatísticas entre mais de duas amostras independentes.

Correlação de Spearman: para correlacionar dois grupos.

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

5 RESULTADOS

5.1 ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS DO CEB

A amostra deste estudo foi composta por 28 casos de CEBs, sendo que 20 lesões (71,42%) acometiam homens e 8 (28,58%) acometiam mulheres. A idade dos pacientes variou de 41 a 85 anos, apresentando uma média de 56,5 (DP±10,71). O sítio anatômico predominante foi a língua (n=15; 53,57%), seguido pelo assoalho de boca (n=8; 28,57%), região retromolar (n=3; 10,71%) e gengiva (n=2; 7,15%).

Clinicamente, os tumores foram classificados de acordo com *TNM Classification of Malignant Tumours* (2002). Nesta casuística, considerando a extensão do tumor primário, 14 CEBs (50%) foram considerados como T1-T2 e 14 (50%) foram classificados como T3-T4. Considerando-se a presença ou ausência e a extensão de metástase em linfonodos regionais, 21 tumores (75%) foram classificados como N1-N3 e apenas 7 casos (25%) não apresentaram invasão de linfonodo regional (N0). Em nenhum caso foi observada metástase à distância. Quanto ao estágio clínico, 25 CEBs (89,28%) foram considerados de estágio III-IV e apenas 3 (10,72%) de estágio I-II.

Invasão muscular foi observada em 13 (46,42%) pacientes, enquanto que a maioria não apresentou invasão óssea (n=4; 14,28%), perineural (n=2; 7,14%) e vascular (n=2; 7,14%). Em 2 anos de acompanhamento, 7 (25%) pacientes apresentaram recidiva de lesões e 6 (21,42%) foram a óbito por câncer.

De acordo com a classificação da OMS (2005), 19 CEBs (67,85%) foram classificados histologicamente como bem diferenciados, 8 (28,58%) como moderadamente diferenciados e 1 (3,57%) como pouco diferenciado. Em 9 casos de CEBs, foi possível a avaliação das MATs,

sendo que 5 (55,55%) apresentavam displasia epitelial. Destas, 3 (60%) foram classificadas como DEO discreta, 1 (20%) como DEO moderada e 1 (20%) como DEO intensa.

Com relação aos hábitos dos pacientes incluídos neste estudo, 24 (85,71%) eram tabagistas, 22 (78,57%) etilistas e 22 (78,57%) tabagistas e etilistas. As características clínicas e histológicas dos CEB estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Características clínicas e histológicas dos pacientes com CEB.

Parâmetros clínicos	Total (n)	%
<u>Sexo</u>		
Homem	20	71,42
Mulher	8	28,58
<u>Tamanho</u>		
T1-T2	14	50
T3-T4	14	50
<u>Metástase - Linfonodo</u>		
N0	7	35
N1-N3	21	75
<u>Metástase – Distância</u>		
<u>M0</u>	23	82,14
<u>Mx</u>	5	17,86
<u>Estádio clínico</u>		
I-II	3	10,72
III-IV	25	89,28
<u>Invasão muscular</u>		
Sim	13	46,42
Não	15	53,58
<u>Invasão óssea</u>		
Sim	4	14,28
Não	24	85,72
<u>Invasão perineural e vascular</u>		
Sim	2	7,14
Não	26	92,86
<u>Gradação Histológica</u>		
Bem diferenciado	19	67,85
Moderadamente diferenciado	8	28,58
Pouco diferenciado	1	3,57
<u>Sítio anatômico</u>		
Língua	15	53,57
Assoalho bucal	8	28,57
Região retromolar	3	10,71
Gengiva	2	7,15

5.2 IMUNOEXPRESSÃO DE MCM3

Todos os casos de CEB foram positivos para a proteína MCM3, sendo o escore 4+ predominante (n=19; 67,85%), seguido do escore 3+ (n=6; 21,42%), 2+ (n=2; 7,14%) e 1+ (3,59%). A proteína MCM3 estava localizada no núcleo e citoplasma das células do parênquima tumoral. Todas as MATs também apresentaram positividade para esta proteína, sendo observada a marcação nas células do compartimento epitelial, em citoplasma e núcleo. Neste grupo, o escore 2+ foi o mais encontrado (n=7; 77,77%), seguido do escore 1+ (n=2; 22,23%). Todos os casos de MNN foram negativos para a proteína MCM3.

A figura 7 mostra a imunomarcção de MCM3 em CEB (Figura 7-A), MAT (Figura 7-B) e MNN (Figura 7-C). As comparações entre os grupos de CEB, MAT e MNN estão descritas na tabela 5 e representadas na figura 4.

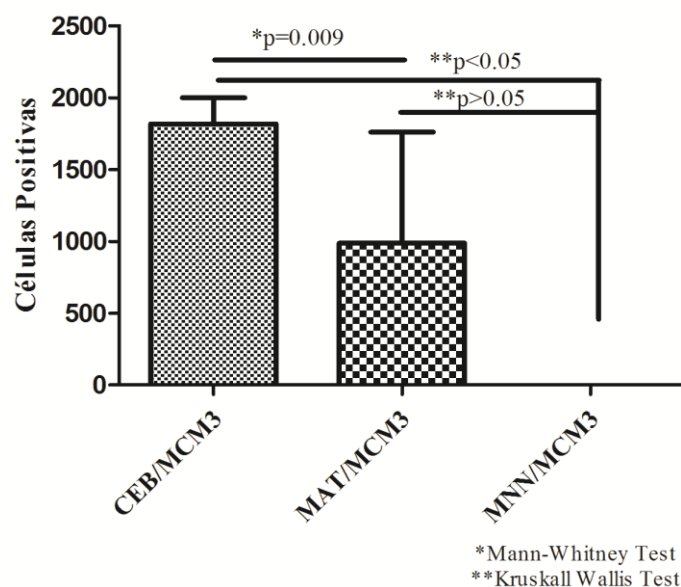


Figura 5. Imunoexpressão da proteína MCM3 em CEB, MAT e MNN.

5.3 IMUNOEXPRESSION DE SHH

Em parênquima tumoral, a proteína SHH estava presente no citoplasma de células neoplásicas e foi positiva em 25 casos (89,28%) de CEB, sendo o escore 4+ predominante (n=17; 68%), seguido do escore 3+ (n=5; 20%), 1+ (n=2; 8%) e 2+ (n=1; 4%). Quando presente no estroma tumoral (n=23; 82,14%), a imunomarcção de SHH foi observada em mais de 50% das células em 2 casos (8,69%), e em menos de 50% em 21 casos (91,31%). Neste compartimento, a proteína SHH foi positiva em fibroblastos e células endoteliais. Nas MATs, 6 casos (66,66%) apresentaram imunomarcção citoplasmática da proteína SHH no compartimento epitelial, predominando os escores 2+ (n=2; 33,33%) e 3+ (n=2; 33,33%), seguido dos escores 1+ (n=1; 16,67%) e 4+ (n=1; 16,67%). Já na lâmina própria, 3 casos (33,33%) foram positivos em citoplasma, sendo 2 (66,67%) com menos de 50% das células imunomarcadas. Todos os casos de MNN foram negativos esta proteína.

A figura 7 mostra a imunomarcção de SHH em CEB (Figura 7-D), MAT (Figura 7-E) e MNN (Figura 7-F). As comparações entre os grupos de CEB, MAT e MNN estão descritas na tabela 5 e representadas na figura 5.

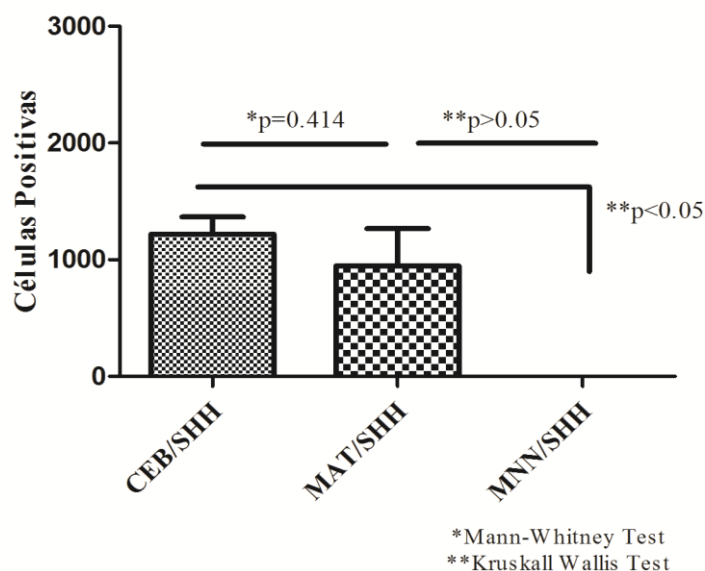


Figura 6. Imunoexpressão da proteína SHH em CEB, MAT e MNN.

5.4 IMUNOEXPRESSÃO DE IHH

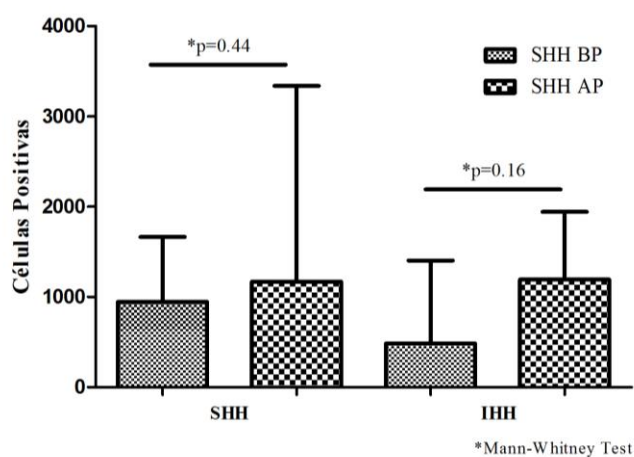
Vinte e dois casos (78,57%) foram positivos para a proteína IHH no parênquima tumoral, embora esta marcação tenha se apresentado em menor proporção que a marcação da proteína SHH. Neste compartimento, os escores predominantes foram 4+ (n=7; 31,82%) e 3+ (n=7; 31,82%), seguido do escore 1+ (n=5; 22,72%) e 2+ (n=3; 13,64%). A proteína IHH apresentou marcação citoplasmática e, em apenas 3 casos (13,64%) estava presente também na membrana celular. Com relação ao estroma, todos os casos apresentaram marcação de IHH, a qual foi mais evidente quando comparada à de SHH neste mesmo compartimento. Foi observada positividade em mais de 50% das células em 12 casos (42,85%) e em menos de 50% em 16 casos (57,15%), marcando predominantemente células inflamatórias semelhantes à macrófagos e células endoteliais. Oito MATs (88,88%) apresentaram imunomarcação citoplasmática da proteína IHH no compartimento epitelial, predominando o escore 1+ (n=4; 50%), seguido dos escores 2+ (n=2; 25%) e 3+ (n=2; 25%). Já na lâmina própria, 8 casos (88,88%) foram positivos em citoplasma, sendo 6 (75%) com mais de 50% das células imunomarcadas. Em MNN, 3 casos (75%) apresentaram marcação citoplasmática, sendo esta apenas no epitélio e de escore 1+.

A figura 7 mostra a distribuição da imunomarcação de IHH em CEB (Figura 7-G), MAT (Figura 7-H) e MNN (Figura 7-I). As comparações entre os grupos de CEB, MAT e MNN estão descritas na tabela 5.

Figura 7. **Imunomarcção de MCM3, SHH e IHH em CEB, MAT e MNN. (A-C)-MCM3:** (A) Escore 4+, marcação citoplasmática e nuclear em parênquima de CEB. (B) Escore 2+, marcação citoplasmática e nuclear em epitélio de MAT. (C) Escore negativo em MNN. **(D-F)-SHH:** (D) Escore 4+, marcação citoplasmática em parênquima de CEB. (E) Escore 2+, marcação citoplasmática em epitélio de MAT. (F) Escore negativo em MNN. **(G-I)-IHH:** (G) Escore 4+, marcação citoplasmática no parênquima de CEB. (H) Escore 2+, marcação citoplasmática em epitélio e lâmina própria de MAT. (I) Escore 1+, marcação citoplasmática em epitélio de MNN.

5.5 ASSOCIAÇÃO DE SHH E IHH COM PERFIL PROLIFERATIVO E DIFERENCIAÇÃO TUMORAL

De acordo com a quantidade de marcação de MCM3, as amostras foram divididas em dois grupos, AP e BP, sendo que não foram avaliados os casos (n=10; 35,71%) que possuíam o número de células MCM3 positivas dentro do IC (1443 a 2191). Considerando-se este critério, 18 (64,29%) tumores foram analisados. Destes, 10 (55,55%) foram classificados como BP e 8 (44,45%) como AP. Todas as MATs foram classificadas como BP. As proteínas SHH e IHH apresentaram uma distribuição similar, com uma maior imunoposição nos grupos AP (Figura 8 e 10). Com relação à diferenciação tumoral, foi observada uma tendência de maior expressão das proteínas MCM3, SHH e IHH em tumores menos diferenciados (Figura 9 e 11).



Nota: AP = alto perfil proliferativo; BP= baixo perfil proliferativo.

Figura 8. Imunoexpressão das proteínas SHH e IHH com relação ao perfil proliferativo.

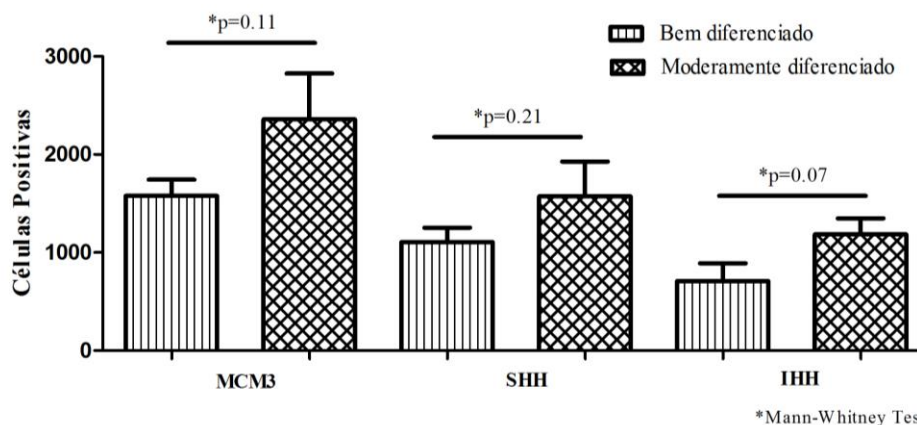


Figura 9. Imunoexpressão das proteínas SHH, IHH e MCM3 com relação à diferenciação tumoral.

Figura 10. Imunomarcção de SHH e IHH de acordo com o perfil proliferativo. (A e B) Marcação citoplasmática de SHH em CEBs com BP e AP, respectivamente. (C e D) Marcação citoplasmática de IHH em CEBs com BP e AP, respectivamente.

Nota: AP = alto perfil proliferativo; BP= baixo perfil proliferativo.

Figura 11. Imunomarcção de SHH e IHH de acordo com a diferenciação tumoral. (A e B) Marcação citoplasmática de SHH em CEBs BD e MD, respectivamente. (C e D) Marcação citoplasmática de IHH em CEBs BD e MD, respectivamente.

Nota: BD= bem diferenciado; MD= moderadamente diferenciado.

5.6 IMUNOEXPRESSÃO DE GLI1

A proteína GLI1 foi positiva em 24 (85,72%) casos de CEB, predominando, no parênquima do tumor, o escore 4+ (n=15; 62,5%), seguido do escore 3+ (n=7; 29,16%), 1+ (n=1; 4,17%) e 2+ (4,17%). Quanto à localização, GLI1 foi observada no núcleo e citoplasma das células tumorais. No estroma do CEB, a marcação desta proteína foi observada em 22 casos (78,57%) e predominantemente no núcleo de células endoteliais, sendo que todos os casos apresentaram menos de 50% das células imunomarcadas. Em epitélio, as MATs apresentaram positividade em 7 (77,77%) casos, variando entre os escores 1+ (n=3; 42,86%), 2+ (n=2; 28,57%) e 4+ (n=2; 28,57%). Na lâmina própria, 4 casos (44,44%) foram positivos, sendo 3 (75%) com menos de 50% das células imunomarcadas. Em MNN, 1 caso (25%) apresentou marcação citoplasmática e nuclear, sendo esta apenas no epitélio e de escore 1+.

A figura 13 mostra a distribuição da imunomarcação de GLI1 em CEB (Figura 13-A), MAT (Figura 13-B) e MNN (Figura 13-C). As comparações entre os grupos de CEB, MAT e MNN estão descritas na tabela 5 e representadas na figura 6.

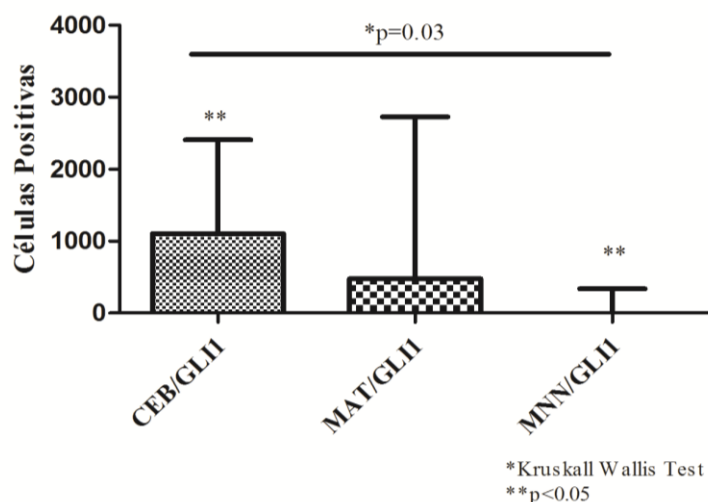


Figura 12. Imunoexpressão da proteína GLI1 em CEB, MAT e MNN.

5.7 ASSOCIAÇÃO ENTRE VASOS GLI1 POSITIVOS/CD105 POSITIVOS

No estroma do CEB, a marcação da proteína GLI1 foi observada predominantemente no núcleo de células endoteliais. Para avaliar se a imunexpressão de GLI1 estava relacionada à marcação da proteína CD105, foi realizada dupla marcação imunohistoquímica para essas proteínas. Pode-se perceber a presença de GLI1 no núcleo da célula endotelial, bem como a proteína CD105 presente no citoplasma deste mesmo tipo celular (Figura 14).

Figura 13. **Imunomarcção da proteína GLI1 em CEB, MAT e MNN.** (A) Escore 4+, marcação citoplasmática e nuclear em parênquima de CEB. (B) Escore 2+, marcação citoplasmática e nuclear em epitélio de MAT. (C) Escore negativo em MNN.

Figura 14. **Co-localização das proteínas GLI1 e CD105 em CEB.** (A) Marcação nuclear de GLI1 em células endoteliais. (B) Marcação citoplasmática de CD105 em células endoteliais. (C e D) Dupla marcação evidenciando a presença de CD105 (Ferangi Blue) no citoplasma e GLI1 (DAB) no núcleo da célula endotelial.

5.8 DENSIDADE DE MACRÓFAGOS E MICRODENSIDADE VASCULAR (CD163 E CD105)

Vinte e três casos de CEB (82,14%) apresentaram imunoexpressão membranar e citoplasmática de CD163, enquanto 24 (85,72%) exibiram positividade citoplasmática para CD105. Ambas as proteínas foram observadas em células do estroma adjacente às ilhas tumorais. Com relação às MATs, apenas 3 (33,33%) apresentaram imunoexpressão de CD163 e 4 (44,44%) de CD105. Todos os casos de MNN foram negativos para estas proteínas.

A figura 16 mostra a distribuição da imunomarcagem de CD163 em CEB (Figura 16-A), MAT (Figura 16-B) e MNN (Figura 16-C) e CD105 também nos três grupos (Figura 16-D, E, F). As comparações entre os grupos de CEB, MAT e MNN estão descritas na tabela 5 e representadas na figura 7.

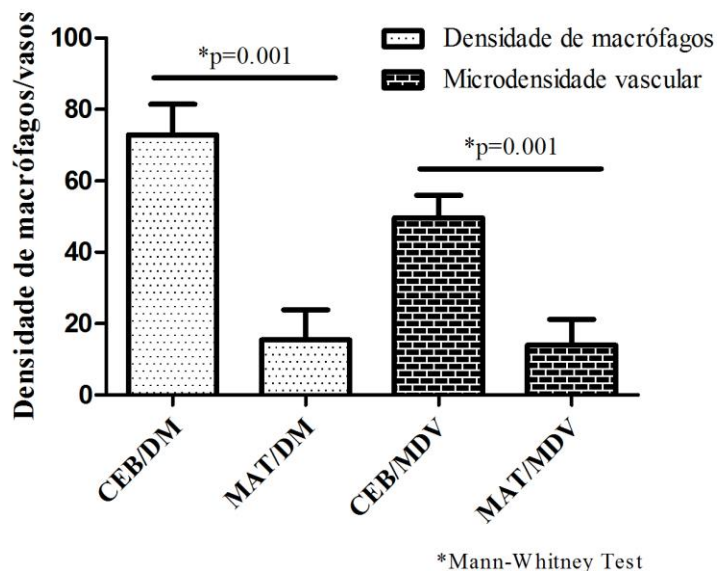


Figura 15. DM e MDV em CEB e MAT.

Figura 16. **Imunomarcção de CD163 e CD105 em CEB, MAT e MNN. (A-C)-CD163:** (A) Marcação membranar e citoplasmática de CD163 em CEB. (B) Marcação citoplasmática de CD163 em MAT. (C) Células negativas em MNN. **(D-F)-CD105:** (D) Marcação citoplasmática de CD105 em CEB. (E) Marcação citoplasmática de CD105 em MAT. (F) Células negativas em MNN.

5.9 IMUNOEXPRESSION DAS PROTEÍNAS MCM3, SHH, IHH, GLI1, CD163 E CD105 EM MAT

Apesar da expressão das proteínas da via HH ter sido maior em CEBs, a maioria das MATs apresentaram imunomarcção de MCM3 (n=9; 100%), SHH (n=6; 66,66%), IHH (n=8; 88,88%), GLI1 (n=7; 77,77%), CD163 (n=3; 33,33%) e CD105 (n=4; 44,44%). Dentre os 9 casos de MAT estudados, 5 (55,55%) apresentaram displasia epitelial e maior expressão das proteínas estudadas. As comparações entre MAT-DEO e MAT estão ilustradas nas figuras 17 e 18.

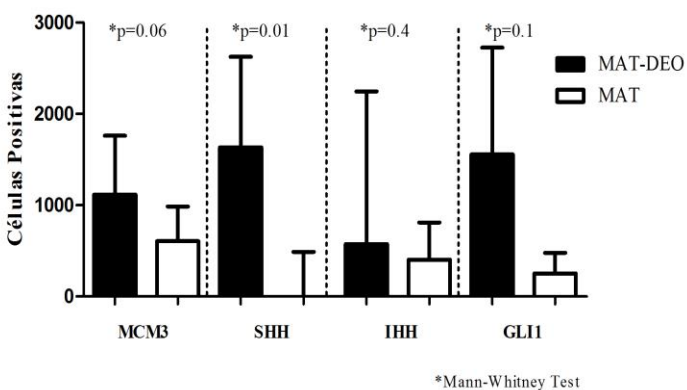


Figura 17. Imunoexpressão das proteínas da via HH em MAT-DEO e MAT

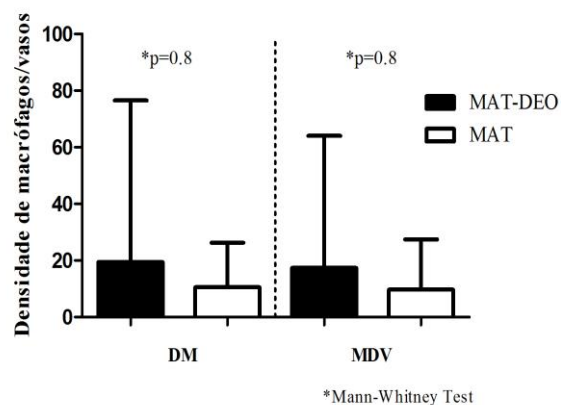


Figura 18. DM e MDV entre MAT-DEO e MAT.

Tabela 4. Imunoexpressão das proteínas para os parâmetros clínicos e histológicos de CEB.

	<i>MCM3</i>			<i>SHH</i>		<i>IHH</i>		<i>GLI1</i>		<i>CD163</i>		<i>CD105</i>	
	Total	Mediana	p (valor)	Mediana	p (valor)	Mediana	p (valor)	Mediana	p(valor)	Mediana	p (valor)	Mediana	p (valor)
<u>Sexo*</u>													
Femino	8	1435	0.46	972.5	0.10	168.5	0.09	1101	0.93	64	0.66	34,28	0.66
Masculino	20	1908		1294		1036		1169		65,15		47,43	
<u>Tamanho*</u>													
T1-T2	14	1885	0.53	1384	0.53	635.5	0.08	1052	0.98	63.42	0.94	44.57	0.87
T3-T4	14	1550		1152		1423		1150		65.13		40.57	
<u>Linfonodo*</u>													
N0	7	1976	0.28	1155	0.15	975	0.89	1091	0.89	56	0.61	29.71	0.63
N1-N3	21	1586		1378		663		1115		67.43		41.14	
<u>Estádio clínico*</u>													
I-II	19	2496	0.08	0.0	0.13	975	0.62	1729	0.29	56	0.6	29.71	0.35
III-IV	23	1586		1188		769		1091		67.43		41.14	
<u>Invasão muscular*</u>													
Sim	13	1889	0.85	1148	0.31	663	0.61	1091	0.78	61.71	0.23	35.42	0.61
Não	15	1586		1390		975		1209		75.43		53.71	
<u>Invasão óssea*</u>													
Sim	4	1228	0.25	947	0.66	681	0.86	729.5	0.32	30.86	0.2	27.43	0.37
Não	24	1866		1196		883		1162		67.43		47.43	
<u>Gradação Histológica*</u>													
Bem diferenciado	19	1514	0.11	1155	0.21	376	0.07	962	0.16	62.86	0.97	40	0.70
Mod. Diferenciado	8	2546		1436		1135		1403		63.43		44.57	
<u>Sítio anatômico**</u>													
Língua	15	1586	0.26	1183	0.73	1174	0.96	1209	0.29	67.42	0.28	35.42	0.58
Assoalho bucal	8	2238		1283		727		1410		61.14		55.43	
Região retromolar	3	1926		1412		1096		960		25.14		17.14	

Nota: foram incluídos na tabela apenas os grupos passíveis de análise estatística.

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

A análise descritiva da imunexpressão das proteínas da via HH analisadas e as respectivas comparações entre CEB, MAT e MNN estão descritas na tabela 5.

Tabela 5. Comparação da imunexpressão das proteínas entre CEB, MAT e MNN.

	<i>CEB</i>		<i>MAT</i>		<i>MNN</i>		p (valor)*
	n (%)	Mediana	n (%)	Mediana	n (%)	Mediana	
<u>MCM3</u>							
Positivo	28 (100)	1748	09 (100)	987	0	0	0.0003
Negativo	0 (0)		0 (0)		4 (100)		
<u>SHH</u>							
Positivo	25 (89.28)	1186	06 (66.66)	571	0	0	0.01
Negativo	3 (10.72)		3 (33.34)		4 (100)		
<u>IHH</u>							
Positivo	22 (78.57)	780	08 (88.88)	574	3 (75)	266	0.39
Negativo	6 (21.43)		1 (11.12)		1 (25)		
<u>GLII</u>							
Positivo	24 (85.72)	1103	07 (77.77)	479	1 (25)	0	0.03
Negativo	4 (14.28)		2 (22.23)		3 (75)		
<u>DM</u>							
Positiva	23 (82.14)	65.15	03 (33.34)	0	0	0	0.0002
Negativa	5 (17.86)		6 (66.66)		4 (100)		
<u>MDV</u>							
Positiva	24 (85.72)	40.57	4 (44.44)	0	0	0	0.0002
Negativa	4 (14.28)		5 (55.56)		4 (100)		

Nota: *Teste de Kruskal-Wallis

5.10 MACRÓFAGOS CD163+ E ANGIOGÊNESE

A angiogênese, avaliada pela marcação de CD105 (MDV), estava associada à presença de macrófagos no estroma adjacente às ilhas tumorais. Correlação positiva forte foi observada para DM e MDV em CEBs (Figura 19 e 21) e correlação positiva perfeita em MATs (Figura 20 e 22).

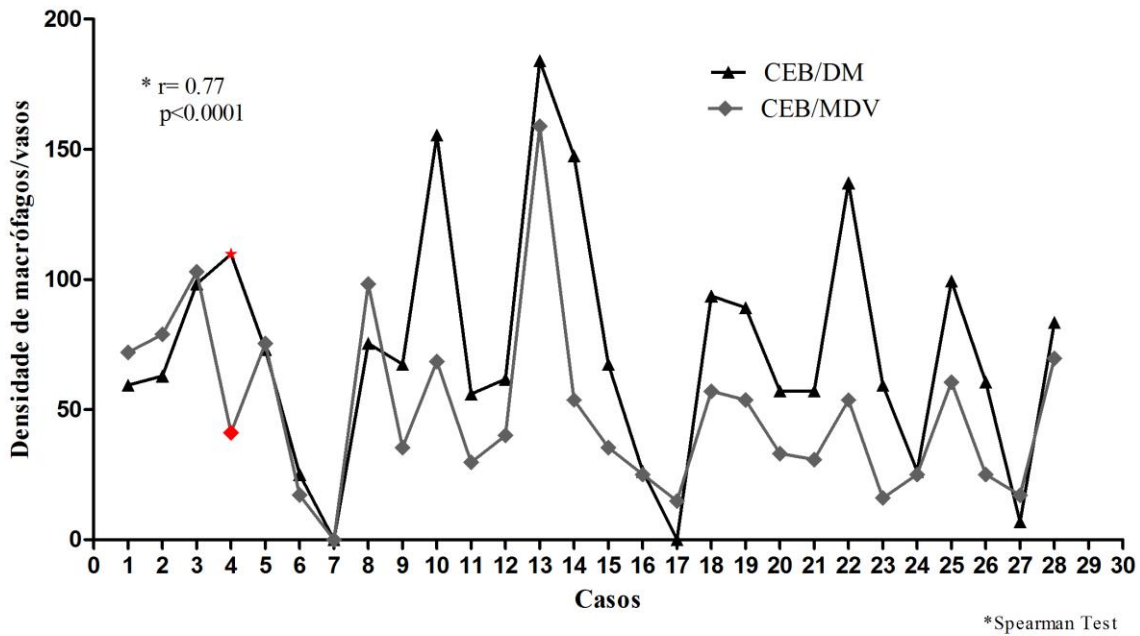


Figura 19. Correlação entre DM e MDV em CEBs.

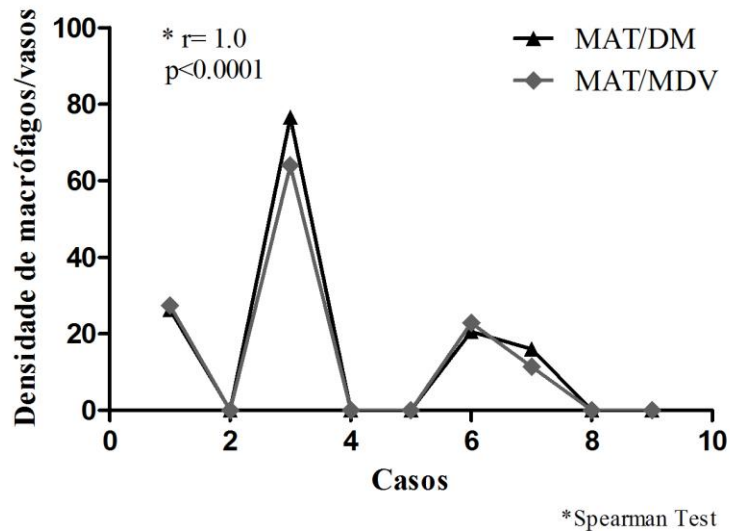


Figura 20. Correlação entre DM e MDV em MATs.

Figura 21. **Imunomarcção da DM e MDV em CEB.** (A e B) Observar área negativa para células CD163+ e de baixa MDV. Em (C e D), área de alta DM e MDV.

Nota: DM= densidade de macrófagos; MDV= microdensidade vascular.

Figura 22. **Imunomarcção da DM e MDV em MAT.** (A e B) Observar área de baixa DM e MDV. Em (C e D), área de alta DM e MDV.

Nota: DM= densidade de macrófagos; MDV= microdensidade vascular

5.11 IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA IHH EM MACRÓFAGOS CD163+

Buscando avaliar se, em CEB, macrófagos podem produzir o ligante IHH, foi realizada dupla marcação e co-localização das proteínas IHH e CD163. Observou-se marcação de IHH em parênquima e estroma tumoral, sendo que, neste último compartimento, macrófagos foram evidenciados através da marcação com CD163. Devido à imunopressão simultânea de IHH e CD163 na mesma célula, fica evidente a marcação imunohistoquímica com uma mistura dos cromógenos utilizados (Figura 23).

Figura 23. **Co-localização das proteínas CD163 e IHH em CEB.** (A) Marcação citoplasmática de CD163 (Red Permanent). (B) Marcação citoplasmática de IHH (Vina Green). (C e D) Dupla marcação evidenciando imunoexpressão simultânea de IHH e CD163 no mesmo tipo celular.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, avaliamos a expressão de componentes da via HH (SHH, IHH e GLI1) em 28 casos de CEB, 9 casos de MAT e 4 casos de MNN, associando a expressão dessas moléculas com angiogênese, potencial proliferativo e macrófagos CD163+. Na casuística, não foram incluídos casos de CEB de lábio, uma vez que os fatores de risco, as características clínicas e histológicas desta doença são mais semelhantes às neoplasias de pele (BRENER et al., 2007).

Os resultados desse trabalho corroboram com evidências atuais de que a via HH participa na patogênese do CEB (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL et al., 2011; HONAMI et al., 2012; LEOVIC et al., 2012; SALES et al., 2012; DIAS et al., 2013). Nesse sentido, demonstramos que proteínas da via (SHH, IHH e GLI1) estão superexpressas no tumor quando comparadas às MAT e MNN. Embora o morfógeno SHH não tenha sido expresso em MNN, IHH e GLI1 apresentaram uma baixa imunexpressão. No entanto, é preciso considerar uma possível participação do processo inflamatório nestas amostras, na detecção destas proteínas (PEREIRA et al., 2013).

Apesar da expressão das proteínas da via HH ter sido maior em CEBs, a maioria das MATs apresentaram imunomarcação de SHH (n=6; 66,66%), IHH (n=8; 88,88%) e GLI1 (n=7; 77,77%), o que corrobora com Leovic et al. (2012) em relação a teoria denominada “*field cancerization*”, a qual descreve que, no carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço, áreas distintas são expostas à carcinógenos por longos períodos, resultando em campos geneticamente alterados, onde carcinomas podem se desenvolver. Nossos resultados corroboram com esta teoria, uma vez que demonstram que a via HH também está ativada em MAT, sugerindo a presença de alterações genéticas em células próximas ao sítio tumoral, mesmo que estas não apresentem qualquer alteração citológica e/ou arquitetural. Dentre os 9 casos de MAT estudados, 5 apresentaram displasia epitelial e maior

expressão das proteínas SHH, IHH e GLI1. Da mesma forma, Dias et al. (2013) demonstraram que a via HH está ativada em DEO, estágio anterior ao desenvolvimento de um carcinoma.

Neste trabalho, como já descrito, a imunomarcagem das proteínas SHH e IHH, no citoplasma das células neoplásicas, sugere a re-ativação da via HH em CEB, uma vez que os ligantes são internalizados ao interagir com receptor PTCH1. Adicionalmente, a presença destes morfógenos, especialmente IHH, no parênquima e estroma tumoral, indicam que possivelmente está ocorrendo uma ativação autócrina e parácrina desta via em CEB, como é visto em hepatocarcinomas, (CHAN et al., 2012), câncer de pâncreas (SAHEBJAM; SIU; RAZAK, 2012) e câncer de mama (O'TOOLE et al., 2011) e, dessa forma, o papel da via HH pode se estender além do parênquima e envolver todo o microambiente tumoral. Assim como encontrado neste estudo, Pereira et al.(2010) demonstraram que IHH apresenta maior marcação em células do estroma, quando comparado à SHH.

Em tecidos adultos normais, vias de sinalização que participam do desenvolvimento embrionário, como a via HH, são normalmente mantidas em um estado inativo, exceto quando participam no reparo tecidual ou na manutenção de células-tronco (COHEN, 2012; MCMILLAN; MATSUI, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013). Quando desregulada, a via HH pode ser ativada por uma série de mecanismos, dependentes ou não do ligante HH. Os mecanismos dependentes do ligante são mais complexos, uma vez que, além do tumor, também envolve o microambiente tumoral e até outras vias de sinalização (AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013).

Dentre os mecanismos dependentes do ligante, destacam-se a ativação autócrina e parácrina da via. A ativação autócrina acontece por meio de secreção do ligante pelas células neoplásicas, com consequente auto-ativação da via, ou seja, uma interação do ligante secretado com o receptor da mesma célula secretora. Na sinalização parácrina, entretanto, ocorre a secreção do ligante pelo parênquima para o estroma tumoral, o qual pode secretar fatores de crescimento tumorais e fatores

pró-angiogênicos para o parênquima, auxiliando na sua progressão (SCALES; DE SAUVAGE, 2009; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013). Ainda, na sinalização dita como parácrina reversa, ocorre secreção do ligante pelo estroma tumoral, a fim de promover ativação das células neoplásicas (SCALES; DE SAUVAGE, 2009; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013).

Buscando avaliar se os níveis de expressão das proteínas SHH e IHH poderiam ter uma função importante no equilíbrio entre a proliferação e diferenciação tumoral, estudamos esses morfógenos na interface do perfil proliferativo e diferenciação tumoral. De acordo com os nossos resultados, SHH e IHH parecem atuar de forma cooperativa na proliferação e diferenciação tumoral do CEB, sendo que a proteína IHH pode estar mais relacionada à diferenciação tumoral.

Com relação ao perfil proliferativo tumoral, foi utilizada, neste estudo, a proteína MCM3, 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). Embora utilizada no diagnóstico de alguns tumores humanos, como tumores de glândula salivar (ASHKAVANDI et al., 2013), carcinoma papilífero da tireóide (LEE et al., 2010) e melanoma (NODIN et al., 2012), não há, até o momento, estudos que avaliem a sua expressão em CEBs.

Especialmente quando comparado à MNN, CEBs apresentaram maior expressão da proteína MCM3, demonstrando que a proliferação é um evento fundamental para o crescimento e progressão tumoral (LEE et al., 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Tumores mais diferenciados apresentaram uma menor imunoexpressão de MCM3, o que geralmente está associado a um melhor prognóstico (KODANI, 2003), visto que as células estão cessando a sua proliferação para entrar em processo de diferenciação e, dessa forma, não encontram-se completamente anaplásicas. CEBs com menor tamanho, ausência de metástase em linfonodos, sem invasão muscular e óssea e com estágio clínico I-II, apresentaram maior imunoexpressão de MCM3. Estes resultados devem ser interpretados

à luz da biologia tumoral, uma vez que, nos estágios mais iniciais, o compartimento proliferativo tumoral é predominante sobre a morte de células malignas, enquanto que, em fases mais avançadas, as células neoplásicas adquirem outras capacidades, como a invasividade e progressão tumoral (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Dentre os nossos resultados, a imunomarcagem nuclear de GLI1 ratifica a participação da via HH em CEB, uma vez que a translocação desta proteína ocorre apenas após a ativação da cascata sinalizadora (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012; ROBBINS; FEI; RIOBO, 2012). Além do núcleo, a proteína GLI1 também foi identificada no citoplasma. Neste compartimento celular, quando na ausência do ligante, as proteínas GLI passam por um processamento proteolítico, perdendo o seu domínio ativador e, desta forma, funcionam como um repressor transcricional (SHENG et al., 2006). No entanto, vale ressaltar que os fatores de transcrição GLI (GLI1, GLI2 e GLI3) são codificados por genes distintos (HASSOUNAH; BUNCH; MCDERMOTT, 2012; AMAKYE; JAGANI; DORSCH, 2013) e, uma vez que GLI1 não possui o domínio repressor N-terminal, funciona exclusivamente como ativador da via (COHEN, 2012). Dessa forma, a presença de GLI1 no citoplasma também parece sugerir a necessidade de um acúmulo citoplasmático prévio a translocação nuclear desta proteína, como observado para outros fatores de transcrição, como p53 (GRAVINA et al., 2014).

Neste estudo, quando no estroma tumoral, a proteína GLI1 foi identificada em vasos sanguíneos, no núcleo de células endoteliais, enquanto que os ligantes SHH e IHH foram observados no citoplasma dessas células. De acordo com Harris et al. (2011), as células endoteliais não parecem expressar ou produzir, naturalmente, moléculas HH. No entanto, já foi demonstrada, em hepatite viral crônica, a expressão do fator de transcrição GLI2 em células endoteliais (PEREIRA et al.,

2010), assim como Olsen et al. (2004) identificou que, no estroma tumoral, as células endoteliais apresentam maior expressão de PTCH1 e baixos níveis de HHIP, inibidor da via HH.

Nesse contexto, de forma similar ao seu papel na formação de vasos sanguíneos em tecidos embrionários (vasculogênese), a via HH está re-ativada para atuar na neo-vascularização tumoral. Cabe ressaltar que ainda são poucos os estudos sobre o papel da via HH na angiogênese de CEB. Nossos resultados demonstram a ativação da cascata sinalizadora em células endoteliais presentes no estroma tumoral de CEBs, uma vez que, além da imunomarcagem citoplasmática dos ligantes da via, foi identificada a presença do fator de transcrição GLI1 no núcleo dessas células. Ainda, realizamos a co-localização das proteínas GLI1 e CD105 nas células endoteliais, ratificando o papel da via HH na angiogênese tumoral. Honami et al. (2012) demonstraram, em camundongos, que o bloqueio da via HH pode reduzir a formação de novos vasos em CEBs. Sales et al. (2012) encontraram uma correlação entre a expressão de SHH e VEGF-A em CEB humano, sugerindo que a via HH parece ter uma participação na angiogênese deste tumor.

Estudos demonstram que os TAM são, na maioria das vezes, polarizados para o fenótipo M2, apresentando funções pró-tumorais (MARIONI et al., 2010a; SHIRABE et al., 2012; OBEID et al., 2013; HE et al., 2014; PEDERSEN et al., 2014). Neste estudo, foi utilizada a proteína CD163. Apesar de ser considerado um marcador do fenótipo M2, não há consenso se todas as células CD163+ representam este subtipo de macrófago (BARROS et al., 2013). (KAMPER et al., 2011; BARROS et al., 2013; KONG et al., 2013; PEDERSEN et al., 2014). Quando comparada à MAT e MNN, CEBs apresentaram uma maior densidade de macrófagos CD163+, sugerindo um possível papel destas células na carcinogênese bucal. Poucos estudos avaliaram a densidade de macrófagos em CEB (MORI et al., 2011; FUJII et al., 2012; FRANÇA et al., 2013; COSTA et al., 2013; WANG

et al., 2014) e, até o momento, nenhum trabalho avaliou se estas células são responsivas e/ou secretam proteínas da via HH neste tipo de tumor.

Dentre todos os resultados gerados com esse trabalho, demonstrar que macrófagos CD163+ positivos expressam IHH sugere que a sinalização HH é importante não somente para as células malignas, mas também para o microambiente tumoral (CHEN et al., 2011). Recentemente, foram identificados receptores e componentes intracelulares da via HH em macrófagos, indicando que essas células são capazes de transduzir a sinalização iniciada pelos morfógenos HH (DUNAEVA et al., 2010; SCHUMACHER et al., 2012).

Já está bem estabelecido que células da resposta imune inata, como macrófagos, estão envolvidas no *switch* angiogênico, favorecendo a progressão tumoral. Além disso, estas células auxiliam a invasão local e dificultam a ação de drogas direcionadas à inibição da ativação endotelial (QIAN; POLLARD, 2010; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Neste contexto, estudamos se a densidade de macrófagos CD163+, em CEB e MAT, estava associada à angiogênese. Para avaliar a neo-vascularização tumoral, caracterizamos a MDV através da detecção imuno-histoquímica da proteína CD105, a qual não é observada em vasos pré-existentes e no tecido normal (SANDLUND et al., 2006).

CEBs apresentaram uma maior quantidade de vasos/mm² quando comparados à MAT e MNN, ratificando o papel da angiogênese em promover um meio adequado ao crescimento do tumor. Adicionalmente, a MDV foi fortemente associada à presença de macrófagos CD163+ no estroma adjacente às ilhas tumorais, indicando que, na carcinogênese oral, os macrófagos parecem contribuir na modulação do microambiente tumoral, favorecendo a progressão do tumor. Embora comumente associada ao crescimento de tumores sólidos, estudos mais recentes apontam que a formação de vasos sanguíneos também parece contribuir na transformação e iniciação de células neoplásicas,

sendo observada mesmo antes da identificação macroscópica de neoplasias malignas em modelos experimentais (HANAHAN; WEINBERG, 2011). Nossos resultados corroboram com esta teoria, uma vez que encontramos a MDV também esteve fortemente associada à DM na lâmina própria de MATs. Analogamente, Sales et al. (2012) encontraram expressão de VEGF-A em MAT, sugerindo que, mesmo quando alterações histológicas e citológicas não são observadas nas margens, a mucosa próxima ao sítio tumoral pode estar contribuindo para secreção de fatores de crescimento para o tumor propriamente dito.

Uma das principais formas que TAM podem contribuir na angiogênese tumoral é através da produção de VEGF-A, citocina que irá agir nas células endoteliais para induzir a formação de novos vasos (MERRY et al., 2012; RUFFELL; AFFARA; COUSSENS, 2012). Cabe ressaltar que fatores pró-angiogênicos, como VEGF-A, são genes alvo da via HH e, neste estudo, demonstramos que macrófagos CD163+ expressam IHH, um dos ligantes responsáveis por iniciar a cascata sinalizadora. Poucos trabalhos avaliaram a relação de macrófagos e angiogênese em CEB. Em 2013, Vilas Bôas e colaboradores não encontraram correlação entre a MDV e DM em CEB, sugerindo que o processo angiogênico não depende do número de macrófagos presente no estroma tumoral, mas sim do fenótipo predominante, M1 ou M2. No entanto, estes autores avaliaram a DM com o marcador CD68, o qual não distingue os subtipos de macrófagos (FUJII et al., 2012; KONG et al., 2013; HE et al., 2014), e a MDV através do fator VIII, proteína encontrada em todos os vasos de grande calibre e, focalmente, em capilares e vasos linfáticos (SANDLUND et al., 2006).

Nessa casuística, a idade dos pacientes com CEB variou de 41 a 85 anos, apresentando uma média de 55,5 (DP±10,71), corroborando com outros autores que encontraram a 5ª e a 6ª década de vida como a faixa etária de maior prevalência da doença (FRONIE et al., 2013; ADRIEN et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014). Homens etilistas e fumantes foram os mais acometidos e os sítios

anatômicos mais prevalentes, língua e assoalho de boca, também foram os locais comumente descritos em outros estudos (FRONIE et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014). Segundo Kashiwazaki et al. (2008), o câncer de boca invade localmente os tecidos e ainda pode provocar metástases, como em linfonodos regionais, entretanto a invasão muscular e óssea não é freqüente, como também observado em nosso estudo. Embora alguns dos nossos resultados não apontem uma associação entre parâmetros clínicos e imunexpressão de proteínas da via HH, cabe ressaltar que isto pode ter sido reflexo do tamanho desta casuística.

Por fim, este estudo apresenta resultados importantes sobre a participação da via HH em CEBs, ratificando a sua re-ativação neste tipo de tumor, através de uma sinalização autócrina e Parácrina. Demonstramos que via HH também é expressa em células endoteliais, podendo contribuir na angiogênese, ao mesmo tempo que macrófagos expressam IHH, ligante da via, e estão associados com a neo-vascularização tumoral.

Embora a maioria dos fármacos atuais utilizados no tratamento do câncer afete diretamente o crescimento e a sobrevivência das células neoplásicas, evidências têm demonstrado que muitos componentes do microambiente tumoral são críticos para a carcinogênese e representam alvos terapêuticos adicionais (HELLER et al., 2012). Com relação aos macrófagos, por exemplo, a inibição da polarização em M2 e suas atividades pró-tumorais, bem como uma maior expressão do fenótipo M1, com funções citotóxicas, representam estratégias valiosas no tratamento de tumores humanos (MERRY et al., 2012; SHIRABE et al., 2012). Adicionalmente, a identificação de GLI1 no núcleo de células endoteliais, sugere que a inibição da via HH pode ser útil em vários tipos de neoplasias que dependam da angiogênese para a sua progressão (OLSEN et al., 2004). Assim, o bloqueio da via HH resultaria numa supressão do crescimento tumoral, tanto diretamente, por interferir na sobrevivência intratumoral, quanto indiretamente, por alterar o microambiente.

7 CONCLUSÕES

- As proteínas SHH, IHH e GLI1 foram positivas em CEB, indicando a re-ativação da via HH neste tumor. A imunomarcação destas moléculas em parênquima e estroma indica que está ocorrendo uma sinalização autócrina e parácrina.
- As proteínas SHH e IHH podem atuar de forma homóloga na proliferação e diferenciação tumoral do CEB.
- A imunomarcação de MCM3 em CEB e MAT indica que esta proteína pode despontar como um bom marcador de proliferação celular em CEB.
- Macrófagos CD163+ expressam IHH e estão associados à angiogênese em CEB e MAT.
- A via HH está re-ativada em células endoteliais presentes no estroma de CEBs, auxiliando na neovascularização tumoral.
- A imunomarcação das proteínas da via HH em MAT contribui para a teoria "*field cancerization*", que envolve tecidos fenotipicamente normais.
- CEBs apresentaram maior expressão das proteínas MCM3, SHH, IHH, GLI1, CD163 e CD105, quando comparado à MAT e MNN.

REFERÊNCIAS

- ADOLPHE, C. et al. An in vivo comparative study of sonic, desert and Indian hedgehog reveals that hedgehog pathway activity regulates epidermal stem cell homeostasis. **Development**, v.131, n.20, p. 5009–5019, 2004.
- ADRIEN, J. et al. Why are head and neck squamous cell carcinoma diagnosed so late? Influence of health care disparities and socio-economic factors. **Oral Oncology**, v.50, n.2, p. 90–97, 2014.
- ALLAVENA, P. et al. The inflammatory micro-environment in tumor progression : The role of tumor-associated macrophages. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 66, p. 1–9, 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.
- ASHKAVANDI, Z. J. et al. MCM3 as a novel diagnostic marker in benign and malignant salivary gland tumors. **Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP**, v. 14, n. 6, p. 3479–3482, 2013.
- BARROS, M. H. M. et al. Macrophage polarisation: an immunohistochemical approach for identifying M1 and M2 macrophages. **PloS one**, v. 8, n. 11, 2013.
- BERGERS, G.; BENJAMIN, L.E. Tumorigenesis and the angiogenic switch. **Nat Rev Cancer**, v. 3, p. 401-410, 2003.
- BHARGAVA, A.; SAIGAL, S.; CHALISHAZAR, M. Histopathological Grading Systems In Oral Squamous Cell Carcinoma : A Review. **J. Int Oral Health**, v. 2, n. 4, p. 1–10, 2010.
- BINGLE, L.; BROWN, N. J.; LEWIS, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression : implications for new anticancer therapies. **Journal of Pathology**, v. 8, p. 254–265, 2002.

BITGOOD, M.J.; MCMAHON, A.P. Hedgehog and Bmp Genes Are Coexpressed at Many Diverse Sites of Cell – Cell Interaction in the Mouse Embryo. **Developmental Biology**, v. 138, p. 126–138, 1995.

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

BRENER, S. et al. Carcinoma de células escamosas bucal : uma revisão de literatura entre o perfil do paciente , estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 1, p. 63–69, 2007.

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, out. 2011.

CHAN, I. S. et al. Paracrine Hedgehog signaling drives metabolic changes in hepatocellular carcinoma. **Cancer Research**, v. 72, n. 24, p. 6344–6350, dez. 2012.

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, set. 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 USA**, v. 108, n. 23, p. 9589–9594, jun. 2011.

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.

CONDEELIS, J.; POLLARD, J. W. Minireview Macrophages : Obligate Partners for Tumor Cell Migration, Invasion, and Metastasis. **Cell**, v. 124, p. 263–266, 2006.

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, mar. 2013.

COSTA, N. L. et al. Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 49, n. 3, p. 216–223, 2013.

DAS, S. et al. Hedgehog signaling in tumor cells facilitates osteoblast-enhanced osteolytic metastases. **PloS one**, v. 7, n. 3, jan. 2012.

DE SOUZA, M.B. et al. Serum and salivary macrophage migration inhibitory factor in patients with oral squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, v. 8, p. 2267-2275, 2014.

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.

DOUARD, R. et al. Sonic Hedgehog–dependent proliferation in a series of patients with colorectal cancer. **Surgery**, v. 139, n. 5, p. 665-670, 2006.

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

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.

FRANÇA, C. M. et al. Macrophage migration inhibitory factor and oral cancer. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 42, p. 368–373, 2013.

FU, X.; YANG, X.; ZHAO, L. Indian hedgehog, a neglected member of hedgehog pathway, may offer a novel avenue for colorectal cancer therapy. **Cancer Biother Radiopharm**, v. 24, n. 6, p. 733-735, 2009.

FUJII, N. et al. Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 6, p. 444–451, jul. 2012.

FRONIE, A. F. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity : clinical and pathological aspects. **Rom Journal of Morphology Embryology**, v. 54, n. 2, p. 343–348, 2013.

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

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

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

GRAVINA, G. et al. Nucleo-cytoplasmic transport as a therapeutic target of cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 7, n. 1, p. 85, dez. 2014.

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

GUO, C. et al. The role of tumor-associated macrophages in tumor vascularization. **Vascular Cell**, v. 5, n. 1, p. 1–12, 2013.

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

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HARDCASTLE, Z. et al. The Shh signalling pathway in tooth development : defects in Gli2 and Gli3 mutants. **Development**, v. 125, n. 15, p. 2803–2811, 1998.

HARRIS, L.G. et al. Increased vascularity and spontaneous metastasis of breast cancer by hedgehog signaling mediated upregulation of cyr61. **Oncogene**, v. 31, n. 28, p. 3370-3380, 2012.

HASHIBE, M. et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the INHANCE consortium. **Cancer Epidemiology Biomarkers Prev**, v. 18, n. 2, 2011.

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**, p. 2429–2435, 2012.

HE, K.-F. et al. CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. **BioMed Research International**, v. 2014, jan. 2014.

HELLER, E. et al. Hedgehog signaling inhibition blocks growth of resistant tumors through effects on tumor microenvironment. **Cancer research**, v. 72, n. 4, p. 897–907, fev. 2012.

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, jan. 2012.

HUANGFU, D.; ANDERSON, K. V. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from Drosophila to vertebrates. **Development**, v. 133, n. 1, p. 3–14, jan. 2006.

HWANG, J. et al. The effects of sonic hedgehog signaling pathway components on non-small-cell lung cancer progression and clinical outcome. **World Journal of Surgical Oncology**, p.1–10, 2014.

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

JEMAL, A. et al. Global cancer statistics. **CA Cancer Journal of Clinical**, v. 61, 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

KAMPER, P. et al. Tumor-infiltrating macrophages correlate with adverse prognosis and Epstein-Barr virus status in classical Hodgkin's lymphoma. **Haematologica**, v. 96, n. 2, p. 269–276, mar. 2011.

KASHIWAZAKI, H. et al. Gene expression profile changes correlated with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Odontology**, v. 96, n. 1, p.38-43, 2008.

KODANI, I. Minichromosome maintenance 2 expression is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous cell carcinomas. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 32, n. 8, p.468–474, 2003.

KONG, L. et al. The Clinical Significance of the CD163+ and CD68+ Macrophages in Patients with Hepatocellular Carcinoma. **PLoS One**, v. 8, n. 3, 2013.

KUZU, I. et al. Heterogeneity of vascular endothelial cells with relevance to diagnosis of vascular tumours. **Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 2, p. 143–148, 1992.

LAI, L. P.; MITCHELL, J. Indian hedgehog: its roles and regulation in endochondral bone development. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 96, n. 6, p. 1163–1173, dez. 2005.

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, ago. 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.

LOURENÇO, S. Q. C. et al. Classificações Histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral : Revisão de Sistemas Propostos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 325–333, 2007.

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. 361–7, maio 2010a.

MARIONI, G. et al. Neoangiogenesis in laryngeal carcinoma: angiogenin and CD105 expression is related to carcinoma recurrence rate and disease-free survival. **Histopathology**, v. 57, n. 4, p. 535–543, out. 2010b.

MATHEW, E. et al. Dosage-dependent regulation of pancreatic cancer growth and angiogenesis by hedgehog signaling. **Cell Reports**, v. 9, n. 2, p. 484–494, out. 2014.

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

MERCHANT, J. L.; SAQUI-SALCES, M. Inhibition of Hedgehog signaling in the gastrointestinal tract: targeting the cancer microenvironment. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 1, p. 12–21, mar. 2014.

MERRY, R. et al. Oral health and pathology: a macrophage account. **British Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v. 50, n. 1, p. 2–7, 2012.

MORI, K. et al. Infiltration of M2 Tumor-Associated Macrophages in Oral Squamous Cell Carcinoma Correlates with Tumor Malignancy. **Cancers**, v. 3, n. 4, p. 3726–3739, 2011.

NODIN, B. et al. High MCM3 expression is an independent biomarker of poor prognosis and correlates with reduced RBM3 expression in a prospective cohort of malignant melanoma. **Diagnostic Pathology**, v. 7, n. 1, p. 82, jan. 2012.

O'TOOLE, S. A et al. Hedgehog overexpression is associated with stromal interactions and predicts for poor outcome in breast cancer. **Cancer Research**, v. 71, n. 11, p. 4002–4014, 1 jun. 2011.

OBEID, E. et al. The role of tumor-associated macrophages in breast cancer progression (review). **International Journal of Oncology**, v. 43, n. 1, p. 5–12, jul. 2013.

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

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

PATHI, S. et al. Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. **Mechanisms of Development**, v. 106, p. 107-117, 2001.

PEDERSEN, M. B. et al. High intratumoral macrophage content is an adverse prognostic feature in anaplastic large cell lymphoma. **Histopathology**, v. 65, n. 4, p. 490–500, out. 2014.

PEREIRA, T. A. et al. Macrophage-derived Hedgehog ligands promotes fibrogenic and angiogenic responses in human schistosomiasis mansoni. **Liver International**, v. 33, n. 1, p. 149–161, jan. 2013.

PEREIRA, T. D. A. et al. Viral factors induce Hedgehog pathway activation in humans with viral hepatitis, cirrhosis, and hepatocellular carcinoma. **Laboratory Investigation**, v. 90, n. 12, p. 1690–1703, dez. 2010.

PETTIGREW, C. A.; ASP, E.; EMERSON, C. P. A new role for Hedgehogs in juxtacrine signaling. **Mechanisms of Development**, v. 131, p. 137–149, mar. 2014.

PINTER, M. et al. Hedgehog inhibition reduces angiogenesis by downregulation of tumoral VEGF-A expression in hepatocellular carcinoma. **United European Gastroenterology Journal**, v. 1, n. 4, p. 265–75, ago. 2013.

QIAN, B.; POLLARD, J.W. Macrophage Diversity Enhances Tumor Progression and Metastasis. **Cell**, v. 141, n. 1, p. 39–51, 2010.

ROBBINS, D. J.; FEI, D. L.; RIOBO, N. A. The Hedgehog signal transduction network. **Science Signaling**, v. 5, n. 246, out. 2012.

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, jul. 2014.

RUFFELL, B.; AFFARA, N. I.; COUSSENS, L. M. Differential macrophage programming in the tumor microenvironment. **Trends in Immunology**, v. 33, n. 3, p.119–126, 2012.

SAHEBJAM, S.; SIU, L. L.; RAZAK, A. A. The utility of hedgehog signaling pathway inhibition for cancer. **The Oncologist**, v. 17, n. 8, p. 1090–1099, jan. 2012.

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.

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

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

SEBASTIAN, P. et al. Anterior tongue cancer with no history of tobacco and alcohol use may be a distinct molecular and clinical entity. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 43, n. 8, p. 593–599, set. 2014.

SHENG, T. et al. Regulation of Gli1 localization by the cAMP/protein kinase A signaling axis through a site near the nuclear localization signal. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 1, p.9–12, jan. 2006.

SHIRABE, K. et al. Role of tumor-associated macrophages in the progression of hepatocellular carcinoma. **Surg Today**, n. 42, n. 1, p. 1–7, 2012.

SCHUMACHER, M. A. et al. Gastric Sonic Hedgehog Acts as a Macrophage Chemoattractant During the Immune Response to *Helicobacter pylori*. **Gastroenterology**, v. 142, n. 5, p. 1150-1159, 2012.

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, 2006.

SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 18, n. 5, p.349–355, out. 2008.

SIVEEN, K. S.; KUTTAN, G. Role of macrophages in tumour progression. **Immunol Letters**, v. 123, n. 2, p. 97–102, 2009.

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

SOLINAS, G. et al. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 86, n. 5, p. 1065–1073, nov. 2009.

STECICA, B.; RUIZ, A. The therapeutic potential of modulators of the Hedgehog-Gli signaling pathway. **Journal of Biology**, v. 1, n. 2, p. 1–4, 2002.

SZELACHOWSKA, J. et al. Mcm-2 Protein Expression Predicts Prognosis Better than Ki-67 Antigen in Oral Cavity Squamocellular Carcinoma. **Anticancer Research**, v. 26, p. 2473–2478, 2006.

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

VALENT, P. et al. Heterogeneity of neoplastic stem cells: theoretical, functional, and clinical implications. **Cancer Research**, v. 73, n. 3, p. 1037–1045, fev. 2013.

VAN DEN BRINK, G.R. et al. Indian Hedgehog is an antagonist of Wnt signaling in colonic epithelial cell differentiation. **Nature Genetics**, v. 36, n. 3, p. 277–282, mar. 2004.

VAN DEN BRINK, G. R.; PEPPELENBOSCH, M. P. Expression of hedgehog pathway components in the adult colon. **Gastroenterology**, v. 130, n. 2, p. 619, 2006.

VILAS BÔAS, D. S. et al. Tumor-Infiltrating Macrophage and Microvessel Density in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Brazilian Dental Journal**, v. 24, n. 3, p. 194-199, 2013.

WANG, S. et al. Expression of CD163, interleukin-10, and interferon-gamma in oral squamous cell carcinoma: mutual relationships and prognostic implications. **European Journal of Oral Sciences**, v. 122, n. 3, p. 202–209, jun. 2014.

WANG, X. et al. Interaction of monocytes/macrophages with ovarian cancer cells promotes angiogenesis in vitro. **Cancer Science**, v. 104, n. 4, p. 516–523, abr. 2013.

XUAN, Y.; LIN, Z. Expression of Indian Hedgehog signaling molecules in breastcancer. **Journal of Cancer Research Clinical Oncology**, v. 135, n. 2, p. 235-240, 2009.

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