

Luiz Henrique Nascimento Neto

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS Shh, Gli-1 e
Fgf-2 EM ADENOMAS DE CÉLULAS BASAIS DE
GLÂNDULAS SALIVARES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do Título de Mestre em Odontologia na Área de Clínica Odontológica Integrada.

UBERLÂNDIA, 2015

Luiz Henrique Nascimento Neto

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS Shh, Gli-1 e
Fgf-2 EM ADENOMAS DE CÉLULAS BASAIS DE
GLÂNDULAS SALIVARES**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia para obtenção do Título de Mestre em Odontologia. Área de Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

Banca Examinadora:
Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso
Prof. Dr. Gustavo Davi Rabelo
Prof^a. Dr^a. Karen Renata Nakamura Hiraki

UBERLÂNDIA, 2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

N244i Nascimento Neto, Luiz Henrique,
2015 Imunolocalização das proteínas Shh, Gli-1 e Fgf-2 em adenomas de

células basais de glândulas salivares / Luiz Henrique Nascimento Neto. -
2015.

42 p. : il.

Orientador: Sérgio Vitorino Cardoso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Inclui bibliografia.

1. Odontologia - Teses. 2. Glândulas salivares - Tumores - Teses. 3.
Adenoma - Teses. 4. - Teses. I. Cardoso, Sérgio Vitorino, . II.
Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314

DEDICATÓRIA

*“Dedico este trabalho a minha eterna amiga, Larissa Tomaz de Moraes (Loira),
pela amizade, carinho e respeito que duram até após a sua partida
antecipada...sinto sua falta.”*

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador, Professor Dr. Sérgio Vitorino Cardoso, pelos ensinamentos passados e pela oportunidade de participar deste Projeto.

Aos meus Pais e familiares pelo suporte dado, sem o qual não conseguiria finalizar esta etapa.

A todos os colegas do Laboratório de Patologia Bucal, técnicos, pós graduandos e professores, a ajuda de vocês foi fundamental para o andamento do trabalho.

A amiga de todas as horas, Sulamita Vitória Martins de Castro, que aturo, ou ela me atura, desde os primórdios do Ensino Médio.

Ao melhor clã carnavalesco de todos os tempos (Babiane Paiva, Danielle Damas, Danieli Silva, José Fernandes, Suellem Biesdorf, Aline Costa, Lizânia Paiva e todos os outros agregados) pela parceria que de quase uma década.

Aos grandes amigos da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, Camila Abrão de Souza, Murilo Carísio Fernandes e Renata Cogui Gonçalves, pelas risadas e momentos juntos.

A amiga e professora de vida e ciência Prof^a Dr^a Cerise de Castro Campos, por tudo que me ensinou e ainda me ensina.

Aos amigos do curso de especialização em Odontologia para Pacientes com Necessidades Especiais, em especial a Bianca Nascimento Reginato, pelo companheirismo desde a residência em Terapia Intensiva até os dias de hoje.

Aos amigos inesquecíveis que pude fazer durante meu intercâmbio, sinto saudades de nossos momentos únicos.

A equipe do SAD, aos dentistas, técnicos e secretários da UAI Tibery por me receberem tão bem na unidade e contribuir de forma diferenciada o trabalho prestado aos nossos pacientes, sinto-me realizado com tal trabalho.

Ao Dr. Petrônio Rangel Salvador Júnior, por me atender tão bem em um momento difícil.

Damos voltas e voltas, mas
na realidade, só há duas
coisas: ou escolhes a vida
ou afastas-te dela.

-José Saramago-

“And how can we win
When fools can be kings”

-Matthew Bellamy-

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	1
LISTA DE TEBELAS E GRÁFICOS.....	2
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	3
RESUMO.....	5
ABSTRACT.....	7
1 INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO.....	9
2 PROPOSIÇÃO.....	18
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4 RESULTADOS.....	24
5 DISCUSSÃO.....	27
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	30
REFERÊNCIAS.....	31
ANEXO.....	38
APÊNDICE.....	42

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Reatividade imunoistoquímica para β -Catenina em ACB. Há reatividade citoplasmática e nuclear em células abluminais. Ampliação original de 450x (Crispim, 2014).....11

Figura 2 – Na ausência de Shh, o receptor Ptch se associa a Smo e bloqueia a sinalização por Gli. Quando Shh se associa a Ptch, esse libera Smo, que ativa Gli e então ocorre início de transcrição (Owens & Watt, 2003).....15

Figura 3 – Imagens representativas da reatividade imunoistoquímica para Shh (A), Gli-1 (B) e Fgf-2 (C) em adenoma de células basais de glândula salivar. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase. Aumento original de 500x.....25

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

Tabela 1 – Anticorpos e policlonais utilizados nos ensaios imunoistoquímicos (todos fabricados por Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).....	21
Tabela 2 – Análise da imunomarcação dos antígenos Shh, Gli-1 e Fgf-2 de acordo com os parâmetros intensidade de marcação e proporção de células positivas (Detre et al., 1995).....	22
Tabela 3 – Índice quickscore para reatividade imunoistoquímica em adenomas de células basais de glândula salivar. A comparação dos índices entre células luminais e abluminais não mostrou qualquer diferença estatisticamente significante ($p > 0,05$).....	24
Gráfico 1 – Distribuição de 21 casos de adenomas de células basais, conforme o índice quickscore de reatividade imunoistoquímica para Shh e Fgf-2 ($r = 0,59$; $p = 0,005$; teste de correlação de Spearman).....	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACB - Adenoma de Células Basais

Ca – Carcinoma

CKI - Caseína-quinase 1

Dhh - Desert Hedgehog

Dsh - Dishevelled

EDTA - ácido etilenodiaminotetracético

FGF - Fator de Crescimento de Fibroblasto

**FOUFU - Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de
Uberlândia**

FZ – Frizzled

g – Gramas

Gli – Glioma-associated oncogene homolog

GSK-3 β - Glicogênio Sinase Quinase β

HH - Hedgehog

Ihh - Indian Hedgehog

INCA - Instituto Nacional do Câncer

LIBIPO - Laboratório Integrado de Biologia e Patologia Oral

LDL – Low-density lipoprotein

LRP - LDL-receptor-related protein

ml – Mililitros

mM – Milimolar

pH – Potencial Hidrogênico

PPC - Proporção de Células Positivas

PTCH - Patched

QI – Índice de Quickscore

Shh - Sonic Hedgehog

Smo – Smoothened

TGS - Tumores de Glândulas Salivares

TRIS-HCl – tris (hidroximetil) aminometano hidroclorídrico

WNT - Wingless type

µm – Micrometro

°C – Grau Celsius

RESUMO

O adenoma de células basais (ACB) é uma neoplasia glandular benigna rara que acomete principalmente a glândula salivar parótida. As causas e mecanismos envolvidos na sua patogênese são pouco compreendidos. Pesquisas têm mostrado acúmulo nuclear de β -Catenina em ACB, tal proteína é fortemente relacionada à via de sinalização Wnt. Porém, estudos recentes mostraram ausência de ativadores dessa via em ACB, sugerindo que o acúmulo nuclear de β -Catenina não esteja relacionado com a presença da via Wnt. Sabe-se que existe uma relação entre a via de sinalização HH e a via Wnt e já foi demonstrado que sinalização excessiva da via HH pode levar ao câncer e a metástases, porém a detecção imunoistoquímica de proteínas dessa via em ACB ainda não foi objeto de estudo. Por isso, o objetivo desse estudo foi investigar se a ativação da via HH pudesse se relacionar com o acúmulo nuclear da β -Catenina em ACB, para melhor compreender a patogênese da lesão. Estudou-se a imunolocalização de duas proteínas envolvidas na via HH, a saber, Shh, principal ligante ativador da via, e Gli-1, proteína de transdução do sinal ativado, e ainda a Fgf-2, importante inibidor da proliferação celular induzida por Shh em precursores neurais e células tumorais, porém, em pele normal apresentou-se como um indutor de Shh e β -Catenina. Foram analisados 21 casos de ACB, através de imunoistoquímica pela técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase. Cada reação foi analisada qualitativamente e quantitativamente pelo índice de Quickscore (QI). Foi encontrado reatividade em 71,4% dos casos para Shh e em 52,4% para Gli-1, com predominância de marcação citoplasmática fraca. Enquanto que para Fgf-2 observou-se marcação citoplasmática e nuclear variada em 100% dos casos. A marcação foi semelhante tanto para células luminais e abluminais para todos os抗ígenos estudados. As médias de QI para Shh, Gli-1 e Fgf-2 foram de 1,7 (\pm 2,9), 1,6 (\pm 2,8) e 8,5 (\pm 5,5), respectivamente. Houve correlação positiva apenas entre Shh e Fgf-2, sugerindo a existência de um mecanismo de retroalimentação positiva, desta exercendo um efeito inibitório sobre aquela, apresentando uma ação semelhante ao encontrado em precursores neurais e células tumorais. Tais resultados não confirmam a ativação da via HH e não

se relaciona com o acúmulo nuclear da β -Catenina em ACB, podem sugerir que no ACB a Fgf-2 tenha ação de indutor tumoral e ainda representar a explicação do achado típico da β -Catenina no ACB.

Palavras-chave: Adenoma de células basais; Via de sinalização HH; Fgf-2.

ABSTRACT

The basal cell adenoma (BCA) is a rare benign tumor of the salivary glands that primarily affects the parotid salivary gland. The causes and mechanisms involved in its pathogenesis are poorly understood. Researches have shown nuclear accumulation of β -Catenin in BCA. β -Catenin is related to the Wnt signaling pathway, but recent studies were not able to show activation of this pathway in BCA, suggesting that its nuclear accumulation is not related to the presence of the Wnt pathway. The Hedgehog (HH) signaling pathway has many interfaces with Wnt pathway, including ability to translocate β -Catenin to the nucleus and therefore activate cellular proliferation and it is known that excessive HH signaling pathway can lead to cancer and metastasis, but immunohistochemistry detection of proteins in this pathway was not yet studied in BCA. The aim of this study was to investigate the presence of proteins related to HH pathway in BCA, to improve the knowledge, the pathogenesis about this lesion and if it could relate to the nuclear accumulation of β -catenin. In 21 cases of BCA, by immunohistochemistry using streptavidin-biotin-peroxidase technique, we studied the proteins Shh, the main activator of the HH pathway, Gli-1, which is related to HH signal transduction, and also Fgf-2, an important inhibitor of cell proliferation induced by Shh in neuronal precursors and tumor cells, but in normal skin Fgf-2 showed an inductor role of Shh and β -catenin. Each reaction was analyzed qualitatively and quantitatively by QuickScore Index (QI). We found weak cytoplasmic reactivity in 71.4% of the cases to Shh, and 52.4% to Gli-1. Fgf-2 was observed varied cytoplasmic and nuclear staining in 100% of the cases. For all antigens, staining was similar in both luminal and abluminal cells. The average QI were 1.7, 1.6 and 8.5 to Shh, Gli-1 and Fgf-2, respectively. There was a positive correlation only between Shh and Fgf-2. Suggesting the existence of a positive feedback in which Fgf-2 has an inhibitory effect over Shh, showing a similar action to that found in neuronal precursors and tumor cells. These results do not confirm activation of the HH pathway in BCA, and is not related with the nuclear accumulation of β -catenin.

But suggest that Fgf-2 has a tumor inducing action and also could represent the explanation of typical β -catenin found in this lesion.

Key words: Basal cell adenoma; HH signaling pathway; Fgf-2.

1. INTRODUÇÃO E REFERENCIAL TEÓRICO

Os tumores de glândulas salivares (TGS) representam 3% a 5% dos tumores de cabeça e pescoço, e são em sua grande maioria (60% a 80%) benignos (Setti et al., 2014).

São reconhecidos mais de 30 tipos diferentes de TGS. Embora esses tumores possam mostrar uma variedade impressionante de diversidade morfológica, é reconhecida a sobreposição de aspectos morfológicos que pode dificultar sobremaneira o diagnóstico (Eveson et al., 2005; Ellis & Auclair, 2008). Essa característica encoraja a procura por características clínicas, histológicas ou moleculares úteis ao diagnóstico diferencial.

Nesse sentido, a pesquisa por marcadores imunoistoquímicos que possam facilitar a distinção e o diagnóstico diferencial entre os TGS vem sendo abordada em estudos recentes. Em especial, a localização nuclear de β -Catenina parece ser uma característica peculiar do adenoma de células basais (ACB) de glândula salivar, o que foi observado em um estudo comparativo em que a localização nuclear de β -Catenina ocorreu em 95,4% dos casos de ACB enquanto que em 98% de outros TGS estudados não houve expressão nuclear dessa proteína (Do Prado et al., 2006; Do Prado et al., 2007; Kawahara et al., 2011).

Em análises envolvendo a presença da β -Catenina em ACB, a sua marcação nuclear manteve-se acima de 88% dos casos com intensidade forte e predominante em células abluminais, como pode ser observado na figura 1 (Kawahara et al., 2011; Servato, 2011; Crispim, 2014).

A via de sinalização Wnt é reconhecida como uma das principais responsáveis pela determinação da função de β -Catenina (Lin et al., 2011; Rao & Kühl, 2010; Wend et al., 2010; Queimado et al., 2008; Polakis, 2007), a qual também se associa à sua compartmentalização celular, e poderia assim ser uma chave para se explicar o perfil específico de expressão dessa molécula no ACB. Todavia, essa influência não foi verificada em dois estudos anteriores sobre o assunto realizados em nosso laboratório (Servato, 2011; Crispim, 2014). Por outro lado, a via de sinalização HH também pode influenciar a

função e compartimentalização de β -Catenina (Lin et al., 2011), mas ainda não havia sido investigada na patogênese do ACB.

Sabe-se que a via de sinalização HH (do inglês *Hedgehog*) é fundamental para a polarização celular, ramificação e formação do lúmen, durante o desenvolvimento embrionário das glândulas salivares e em diversos outros tecidos (Beachy et al, 2004; Jaskoll et al., 2004; Hashizume & Hieda, 2006; Kierszenbaum, 2008; Lin et al., 2011). Já foi também mostrado que a sinalização excessiva dessa via pode levar ao câncer e a metástase (Kierszenbaum, 2008; Mimeault & Batra, 2010). Mais recentemente, foi descoberta a importância da via nos processos de reparo e regeneração das glândulas salivares e de outros tecidos (Hai et al., 2010; Mimeault & Batra, 2010).

Questiona-se agora se as moléculas e proteínas envolvidas nessa via de sinalização estariam superativadas no desenvolvimento dos TGS, já que durante a formação e crescimento dos tumores ocorrem processos de proliferação e diferenciação similares à embriogênese.

A via HH é ativada por glicoproteínas ligantes, denominadas Sonic (Shh), Indian (Ihh) e Desert (Dhh), que ao se ligarem ao receptor de membrana Patched (Ptch) permitem o acúmulo e migração para o núcleo de proteínas reguladoras gênicas da família Gli. No núcleo, é então ativada a transcrição de diversos genes relacionados ao controle da proliferação e diferenciação celulares (Ruiz I Altaba, 1999; Dessaad et al., 2008; Cohen Jr, 2010).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a hipótese de que alterações na sinalização HH são relevantes na patogênese e diagnóstico do ACB de glândulas salivares.

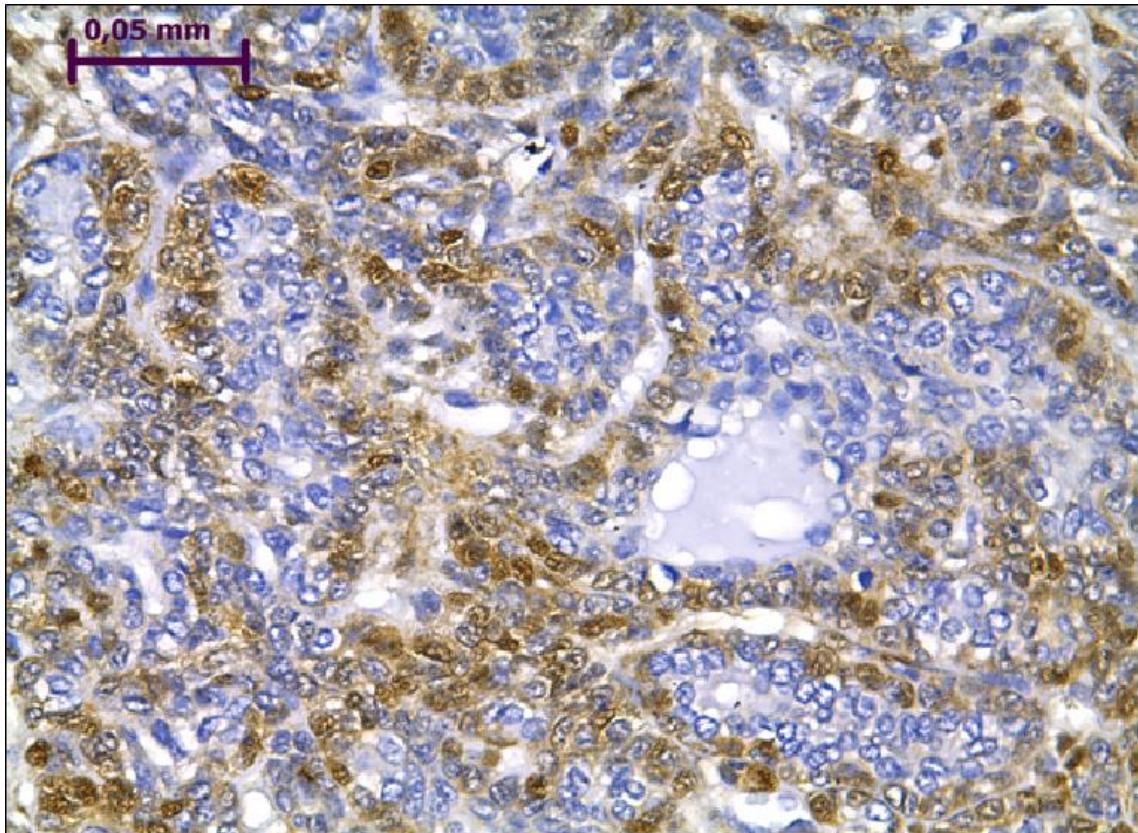


Figura 1 – Reatividade imunoistoquímica para β -Catenina em ACB. Há reatividade citoplasmática e nuclear em células abluminais. Ampliação original de 450x (Crispim, 2014).

1.1 Via de sinalização Wtn/ β -Catenina

A via de sinalização Wnt é fundamental no desenvolvimento embrionário e tem sido relacionada com a homeostase dos tecidos (Klaus & Birchmeier, 2008; Espada et al., 2009; Hai et al., 2010).

Essa via apresenta-se de duas formas distintas: canônica (dependente da β -Catenina) e não canônica (independente da β -Catenina). Sua ativação ocorre após a ligação das glicoproteínas Wnts a dois receptores de superfície celular: o receptor da família Frizzled (FZ) e a uma proteína relacionada com o receptor LDL (LDL-receptor-related protein – LRP) (Polakis, 2007; Lucero et al., 2010; Rao & Kühl, 2010; Surana et al., 2014).

A ativação da via Wnt canônica ou mutações que favoreçam a exclusão de sítios de fosforilação da β -Catenina, bloqueia sua degradação e resulta no seu acúmulo citoplasmático e então nuclear (Rao & Kühl, 2010).

Na ausência de ativadores dessa via a β -Catenina é fosforilada pelas proteínas Caseína-quinase 1 (CKI) e Glicogênio Sintase Quinase 3 β (GSK3 β), através de um estrutura formada pelas proteínas Axina e APC (Giles et al., 2003; Rao & Kühl 2010; Dakeng et al., 2013; Surana et al., 2014). Em seguida a β -Catenina é degradada pela via ubiquitina-proteosomo (Giles et al., 2003; Rao & Kühl 2010; Dakeng et al., 2013; Brauburger et al., 2014; Surana et al., 2014).

Já na presença de Wnt, esta se liga ao receptor FZ e aos co-receptores (LRP 5 e 6), promovendo o recrutamento da proteína Dishevelled (Dsh) junto à membrana plasmática. A Dsh sequestra a Axina, paralisando a atividade do complexo de destruição (GSK3 β -CKI/Axina-APC) da β -Catenina (Polakis, 2007; Rao & Kühl, 2010; Surana et al, 2014). O acúmulo de β -Catenina no citoplasma resulta em sua translocação para o núcleo no qual, em conjunto com a família de fatores de transcrição TCF/LEF, promove a expressão de genes como c-Myc e Ciclina D1 (Rao & Kühl, 2010; Brauburger et al, 2014; Surana et al.; 2014).

Alterações ou mutações nos componentes dessa via de sinalização celular afeta alguns processos fisiológicos, podendo gerar distúrbios na proliferação celular, angiogênese, senescência e morte celular sendo importante na carcinogênese e metástase (Ramachandran et al, 2012; Anastas & Moon, 2013).

1.2. Adenoma de células basais

Não raro, as glândulas salivares são acometidas por neoplasias, cada uma com características histopatológicas distintas de acordo com os tipos celulares neoplásicos presentes. À medida que surgem novos aprendizados sobre essas lesões muda-se o esquema de classificação (Araújo, 2005). Em 2005, a Organização Mundial de Saúde lançou sua mais recente classificação

para os TGS (Barnes et al., 2005). Foram categorizados 24 tumores malignos e 10 benignos (Eveson et al., 2005; Ellis & Auclair, 2008).

Na maioria dos estudos os tumores benignos se sobrepõem numericamente aos malignos. Os três tumores benignos mais frequentes são respectivamente o adenoma pleomórfico, o tumor de Whartin e o ACB (Eveson et al., 2005; Ellis & Auclair, 2008; Setti et al., 2014).

A maior frequência dos ACBs ocorre em idosos caucasianos, com discreta prevalência no sexo feminino. A glândula parótida é o sítio mais acometido, com 75% dos casos, sendo o lobo superficial o mais afetado, seguido pelas glândulas salivares menores (Ellis et al, 1991; Eveson et al., 2005; Ellis & Auclair, 2008; Jones et al, 2008; Cordeiro, 2010; Tian et al, 2010).

As características primordiais do ACB são a presença de células basalóides, caracterizadas por serem pequenas, com núcleo hiperchromático arredondado e ovóide, ocupando quase todo o citoplasma, e a ausência de estroma mixocondróide (Araújo, 2005). Há também a presença de células luminais, que são cubóides e circundam pequenos lumens (Araújo, 2005; Ellis & Auclair, 2008). As células abluminais (não luminais) sugerem, pelo fenótipo morfológico, imunoistoquímico e ultraestrutural, serem células mioepiteliais (Bilal et al, 2003; Raitz & Araújo; 2004; Eveson et al., 2005; Ellis & Auclair, 2008). Essas últimas podem ser abundantes e apresentar atividade secretora, podendo modificar o estroma (Zarbo et al., 2000).

Possui três principais variantes histopatológicas, a saber: sólida, trabecular e tubular, sendo frequente a presença de áreas representativas de diferentes variantes em uma mesma lesão – nessa situação, a predominante define a classificação histopatológica do tumor (Araújo, 2005).

A variante sólida é a mais comum e caracteriza-se por múltiplas ilhas de células epiteliais sustentadas por pouco estroma, este composto por tecido conjuntivo denso não modelado. As células periféricas às ilhas encontram-se em paliçada variando de colunares a cuboidais (Zarbo, 2002; Ellis & Auclair, 2008). No subtipo trabecular as células neoplásicas organizam-se em finos cordões entrelaçados, o empalhamento das células periféricas é menos evidente e o estroma é menos denso, tornando a lesão bastante similar a

adenomas canaliculares (Daley et al. 1984; Ellis & Auclair, 2008). Finalmente o padrão tubular diferencia-se do trabecular por apresentar diferenciação ductal e formações luminais; e para diferenciá-lo do adenoma canicular deve-se verificar a ocorrência de células abluminais basalóides (Gardner & Daley, 1983; Daley et al. 1984; Ellis & Auclair, 2008). O termo tubulotrabecular é muito utilizado devido à dificuldade de determinar o subtipo predominante (Araújo, 2005).

Uma quarta e rara variante, denominada membranosa, tem sido relatada e associada à maior propensão a recidiva e transformação maligna devido a sua natureza multifocal. Exibe ilhas epiteliais organizadas em lóbulos dispostas de tal forma que se assemelham a peças de quebra cabeça. A presença distinta de uma camada de material hialino, eosinofílico circundando as ilhas neoplásicas ajuda a distinguir esse subtipo (Nagao et al, 1997; Yu et al, 1998; Ellis & Auclair, 2008).

1.3. Via de sinalização Hedgehog (HH)

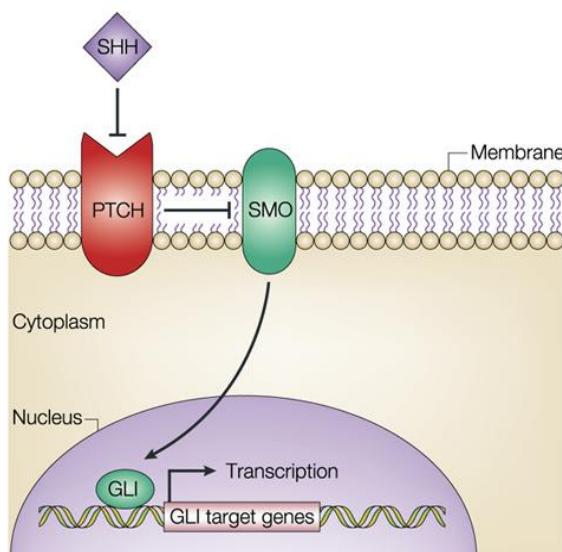
A via de sinalização Hedgehog (HH) é uma das reguladoras essenciais do desenvolvimento embrionário de animais e, nos adultos, para a renovação de células tronco. É também importante para regular a proliferação celular, diferenciação e polaridade tecidual (Beachy et al., 2004; Tang et al., 2007; Mimeault & Batra, 2010).

Recebe esse nome em função da proteína Hedgehog (Hh), que atua como sinalizadora intracelular e ativadora da via. Para tanto, Hh deve se ligar a uma classe de proteínas receptoras da membrana celular, denominada Patched (Ptch), com dois homólogos, Ptch 1 e Ptch 2. Na ausência de sinalização por Hh, Ptch se associa a outra proteína transmembrana, Smoothened (Smo), que é então impedida de ativar sinais intracelulares de transcrição gênica (Taipale et al., 2002; Xuan et al., 2006; Tang et al., 2007).

Como mostrado na Figura 2, quando presente um dos três homólogos de Hedgehog, (Sonic (Shh), Indian (Ihh) ou Desert (Dhh)) a ação inibitória de Ptch sobre Smo é bloqueada; Smo então ativa sinais intracelulares

que podem culminar, por exemplo, na ativação de Gli-1, fator de transcrição que por sua vez desencadeia proliferação celular e, eventualmente, oncogênese (Kogerman et al. 1999; Ruiz I Altaba, 1999; Tang et al., 2007; Dessaud et al., 2008; Cohen Jr., 2010; Athar et al., 2014).

Nas células em que não há algum ligante ativador da via HH ao receptor Ptch, Smo se localiza em pequenas vesículas endossomais, onde provavelmente ocorre a sua degradação (Ogden et al. 2004) e no citoplasma a os fatores de transcrição Gli são fosforilados e inativados pela GSK-3 β (Mizuarai et al., 2009). Muitas etapas dessa via ainda não estão esclarecidas.



Nature Reviews | Cancer

Figura 2 – Na ausência de Shh, o receptor Ptch se associa a Smo e bloqueia a sinalização por Gli. Quando Shh se associa a Ptch, esse libera Smo, que ativa Gli e então ocorre início de transcrição (Owens & Watt, 2003).

1.4. Proteína Sonic Hedgehog

A proteína Sonic Hedgehog (Shh) é a principal glicoproteína ativadora da via de sinalização HH (Ingham & McMahon, 2001; Miller et al., 2001; Taipale & Beachy, 2001). Acredita-se que a sinalização de Shh seja parácrina (Miller et al., 2001).

A superexpressão de Shh pode induzir a proliferação de células mesenquimais e epiteliais. Em casos de superexpressão de Shh, espera-se

que proteínas envolvidas na via HH, como a Gli-1, também estejam com expressão aumentada (Bellusci et al., 1997; Grindley et al. 1997), porém a recíproca parece não ser válida, visto que em carcinomas epidermóides de mucosa oral apresentaram altos níveis de Gli-1 e não houve marcação para Shh. Também não houve marcação de Shh em mucosa oral normal (Buim et al., 2011).

1.5. Gli-1

Gli-1 é uma das três proteínas da família Gli fundamentais após a ativação da via de sinalização HH (Cohen Jr., 2010). É conhecida por ser oncogênica, enquanto que Gli-2 e Gli-3 dependendo do tipo celular podem ser oncogênicas ou supressoras de tumor (Matise & Joyner, 1999). Em dois estudos recentes envolvendo carcinoma epidermóide de mucosa oral observaram-se níveis elevados de Gli-1 nas amostras teciduais com carcinoma, comparadas ao tecido normal (Buim et al., 2011; Wang et al., 2012).

Em análises imunoistoquímicas, foi encontrada predominância de compartimentalização citoplasmática de Gli-1 em células epiteliais e mesenquimais de carcinomas de células basais com pouca ou nenhuma expressão nuclear (Aza-Blanc et al., 1997; Dahmane et al., 1997; Ghali et al., 1999).

1.6. Fgf-2

Entre os fatores de crescimento de fibroblastos conhecidos, o Fgf-2 é o mais potente inibidor de proliferação celular induzida pela sinalização de Shh em precursores neuronais e células tumorais. Sugere-se que Fgf inibe a Shh ligando-se a receptores de Fgf e induzindo uma cascata de sinalização celular ou por competição por receptor específico, podendo ser útil na terapia de tumores com crescimento relacionado à ativação pela Shh (Fogarty et al., 2007). Por outro lado um estudo feito em pele normal de camundongos

demonstrou, em análises imunoistoquímicas, expressão aumenta de Shh e de β -Catenina em tecidos tratado *in vivo* com Fgf-2, resultando em aumento de folículos capilares sugerindo que Fgf-2 melhore a proliferação tecidual induzindo a super ativação de Shh e de β -Catenina (Lin et al., 2015).

Apesar da capacidade inibitória de Fgf-2 sobre a glicoproteína Shh em uma variedade de tipos celulares (Fogarty et al., 2007), esse fator de crescimento parece ter um importante papel na patogênese e progressão de diferentes tipos tumorais, incluindo TGS (Furuse et al., 2010; Miguita et al., 2010; Soares et al., 2012).

Fgf-2 é expressa em adenomas pleomórficos de glândula salivar, com reatividade aumentada em casos de recidiva (Soares et al., 2012). É um fator de crescimento que pode agir de maneira autócrina para estimular a proliferação de células tumorais (Morrison, 1991). A imunolocalização de Fgf-2 em carcinomas adenóides císticos e em carcinomas mucoepidermóides é predominantemente intracelular com marcação de moderada a forte em citoplasma e núcleo, encontrada principalmente em células ductais e mioepiteliais, sugerindo que o fator seja produzido endoginamente (Myoken et al., 1996). Essa mesma marcação forte, citoplasmática e nuclear, também é encontrada em células mioepiteliais de adenomas pleomórficos (Miguita et al., 2010). A participação dos fatores de crescimento de forma geral é bem documentada nos tumores malignos com pouca evidência em tumores benignos (Miguita et al., 2010).

Entretanto, a relação encontrada entre Fgf-2 e β -Catenina (Lin et al., 2015), poderia ajudar a compreender a peculiar marcação desta proteína em ACB. Especificamente, a expressão de Fgf-2 ainda não foi estudada em ACB.

2. PROPOSIÇÃO

Este estudo buscou melhorar o entendimento da patologia molecular do adenoma de células basais de glândulas salivares, com interesse específico na via de sinalização HH, mediante a avaliação da expressão das proteínas Shh, Gli-1 e Fgf-2 por técnica de imunoistoquímica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia parecer 180356/2012 (Anexo A).

3.1. Casuística e amostras

O estudo foi composto por amostras provenientes de biópsia ou ressecção cirúrgica de pacientes atendidos entre os anos de 1997 e 2006 no Instituto Nacional do Câncer (INCA) e na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia (FOUFU).

Foram incluídos como casos de interesse todos aqueles diagnosticados por exame histopatológico como adenoma de células basais, (Araújo, 2005; Ellis & Auclair, 2008; Eveson et al., 2008) e excluídos todos que apresentavam material biológico arquivado em quantidade insuficiente para as reações imunoistoquímicas. Com um total de 21 casos para análise.

3.2. Imunoistoquímica

A partir das amostras teciduais fixadas em formol e posteriormente emblocadas em parafina, foram preparados cortes histológicos de 3 μ m de espessura, dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas com 3-aminopropiltrióxilano (Sigma-Aldrich, EUA) para aumento da adesividade entre o corte tecidual e a lâmina.

Os ensaios imunoistoquímicos foram realizados de acordo com o protocolo estabelecido no Laboratório Integrado de Biologia e Patologia Oral (LIBIPO), descrito abaixo.

Inicialmente, os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol (Synth, Brasil), de 16 horas e 15 minutos, respectivamente, ambos a temperatura ambiente. Em seguida, foram hidratados em soluções

decrescentes de etanol: dois banhos a 100%, um a 95% e um a 80%, por cinco minutos cada um. Para a remoção do pigmento formólico, usou-se solução de hidróxido de amônio a 10% (Synth) em etanol a 95% em banho de 10 minutos, seguidos de sete lavagens em água destilada.

A recuperação antigênica foi realizada com os cortes imersos em solução de ácido etilenodiaminotetracético (Amresco, EUA), a 1,0mM, tamponado com hidróxido de sódio (pH 8,0), em um ciclo de 15 minutos à temperatura de 110ºC em câmara termopressurizada (Steamer – *Biocare Medical, Concord, CA, EUA*).

Após resfriamento dos cortes, seguido por cinco banhos em água destilada, realizou-se o bloqueio da atividade endógena de biotina colocando-se os cortes imersos por 15 minutos à temperatura ambiente em solução feita com duas claras de ovo dissolvidas em 200ml de água deionizada e filtrada por três vezes em gaze, seguido de dez banhos em água destilada. Para o bloqueio da atividade endógena de avidina, foi realizado imersão de 15 minutos à temperatura ambiente em solução de 15g de leite em pó desnatado (Molico®) dissolvido em 90ml de água deionizada e seguido de dez banhos em água destilada (Miller et al, 1999).

No passo seguinte realizou-se três banhos de 10 minutos cada um em solução de peróxido de hidrogênio (Dinâmica, Brasil) a 10 volumes, para bloqueio da peroxidase endógena tecidual, seguidos por cinco banhos em água destilada e três lavagens de cinco minutos cada uma em solução tampão tris (hidroximetil) aminometano hidroclorídrico, 20nM pH 7,4 (Amresco). Cada banho foi feito a temperatura ambiente.

Os cortes foram então incubados, à temperatura ambiente, em solução bloqueadora de reações inespecíficas a base de caseína (*Background Snipper, Biocare Medical, Concord, CA, EUA*) por 15 minutos. Em seguida, os anticorpos primários, diluídos em TRIS-HCl na titulação previamente estabelecida em testes de padronização (Tabela 1), foram incubados e armazenados em câmara úmida por duas horas a temperatura ambiente. Para controle negativo omitiu-se os anticorpos primários na solução de TRIS-HCl.

Tabela 1 – Anticorpos e policlonais utilizados nos ensaios imunoistoquímicos (todos fabricados por Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA).

Anticorpo	Código	Título	Controles	Origem
Anti-Shh	SC-9024	1:300	Rim / Linfonodo/ Glândula salivar	Coelho
Anti-Gli1	SC-20687	1:200	Rim / Glândula Salivar	Coelho
Anti-Fgf2	SC-79	1:250	Ca de Cólon / Glândula salivar	Coelho

Em seguida, os cortes foram desincubados e então lavados em dois banhos de solução de TRIS-HCl por dois minutos cada um e incubados, por 20 minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, com sistema de amplificação estreptavidina-biotina-peroxidase (*Trekkie Universal Link, Biocare Medical, Concord, CA, EUA*) que consiste em solução de anticorpo secundário biotinilado, seguido por dois banhos de dois minutos cada um em solução de TRIS-HCl. Em seguida, feita a incubação dos cortes com o complexo terciário a base estreptavidina conjugada a peroxidase (*Trekkie Avidin-HRP Label, Biocare Medical*) por dez minutos em câmara úmida à temperatura ambiente, seguindo-se por duas lavagens de dois minutos cada uma em tampão TRIS-HCl.

Finalmente a reação foi revelada com substrato cromogênico 3,3'-tetrahidrocloreto de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio (*Betazoid DAB Chromogen Solution, Biocare Medical, Concord*) por cinco minutos com precipitação resultante do pigmento oxidado, seguido por lavagem em água corrente durante cinco minutos.

As lâminas foram então contra-coradas com hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente, desidratadas em solução de etanol 100% por 10 minutos, secadas em estufa a 60°C e montadas com lamínulas de vidro e resina histológica (Precision, Cralplast, China).

3.3. Análise da reatividade imunoistoquímica

As reações imunoistoquímicas foram avaliadas em microscópio de luz convencional (Leica DM750), por dois avaliadores previamente calibrados, Leana Ferreira Crispim e Luiz Henrique Nascimento Neto, de forma independente. Para cada amostra, verificou-se inicialmente a área de hotspot (marcação mais evidente em menor aumento). Nessa área, dez campos histológicos em grande aumento (objetiva de 40x) foram avaliados quanto à presença ou não de reatividade, à compartmentalização da reação (nuclear ou citoplasmática), à intensidade de reação, e à proporção de células reativas.

Finalmente, um índice semiquantitativo para avaliação da reatividade, denominado Quickscore (QI), foi calculado segundo os critérios apresentados na Tabela 2, consistindo na multiplicação dos valores de intensidade de reação e proporção de células reativas (Detre et al., 1995). Na avaliação, o valor final do índice de reatividade foi dado pela média do valor atribuído por cada avaliador, exceto quando havia variação maior do que três pontos entre eles. Nessa situação, procedia-se a nova avaliação, mas agora em conjunto, até que a discrepância se mostrasse no intervalo desejado.

Tabela 2 – Análise da imunomarcação dos antígenos Shh, Gli-1 e Fgf-2 de acordo com os parâmetros intensidade de marcação e proporção de células positivas (Detre et al., 1995).

Índice	Intensidade	Proporção de células positivas
0	Ausência de marcação	Ausência de marcação
1	Fraca	0 a 4%
2	Moderada	5 a 19%
3	Forte	20 a 39%
4	-	40 a 59%
5	-	60 a 79%
6	-	80 a 100%

3.4. Análise estatística

Considerando os intervalos não contínuos da possível distribuição dos valores finais do QI (0 a 6, 8 a 10, 12, 15 e 18), apenas testes estatísticos não paramétricos foram utilizados neste estudo.

Utilizou-se o teste de Wilcoxon para comparar os valores médios do QI para cada antígeno de interesse entre células luminais e abluminais e o teste de Spearman para se avaliar possíveis correlações na reatividade dos diferentes antígenos.

O nível de significância estatística foi de 5% ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas com software GraphPad Prism, versão 5.01 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

4. RESULTADOS

Imagens representativas da expressão de cada anticorpo nos ACB podem ser observadas na Figura 3. Para Shh, dos 21 casos, 15 deles (71,4%) foram positivos, com índice médio de 1,7 (\pm 2,9). A reatividade era predominantemente citoplasmática, em intensidade fraca e com baixa proporção de células neoplásicas coradas. Gli-1 foi reativo em 11 casos (52,4% do total), com QI médio de 1,6 (\pm 2,8) em padrão morfológicamente semelhante ao de Shh. Todos os 21 casos foram reativos para Fgf-2, com índice médio de 8,5 (\pm 5,5), predominantemente com marcação nuclear de moderada a forte intensidade, observada na maioria das células. Não houve diferença relevante ou estatisticamente significante da reatividade entre células luminais ou abluminais, conforme mostrado na Tabela 3, para nenhuma das moléculas estudadas.

Houve correlação positiva, de moderada intensidade e estatisticamente significante, entre os índices de quickscore para a reatividade de Shh e Fgf-2, conforme ilustrado no Gráfico 1. As correlações entre a reatividade de Shh e Gli-1, e a de Gli-1 e Fgf-2 não foram estatisticamente significantes ($p = 0,09$ e $0,08$, respectivamente).

Tabela 3 – Índice quickscore para reatividade imunoistoquímica em adenomas de células basais de glândula salivar. A comparação dos índices entre células luminais e abluminais não mostrou qualquer diferença estatisticamente significante ($p > 0,05$).

	Shh		Gli-1		Fgf-2	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
Células luminais	1,8	3,0	1,6	2,8	8,4	5,5
Células abluminais	1,7	2,9	1,5	2,8	8,1	5,5

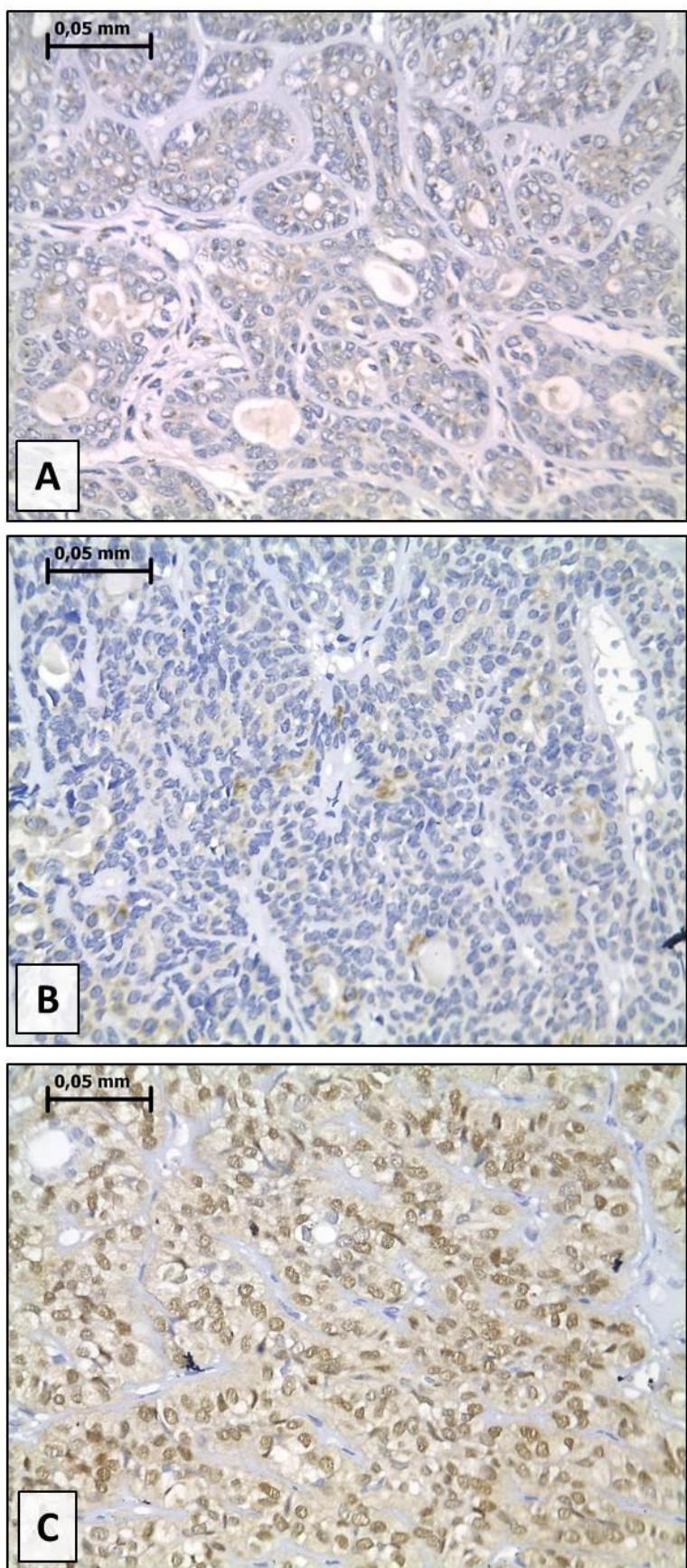
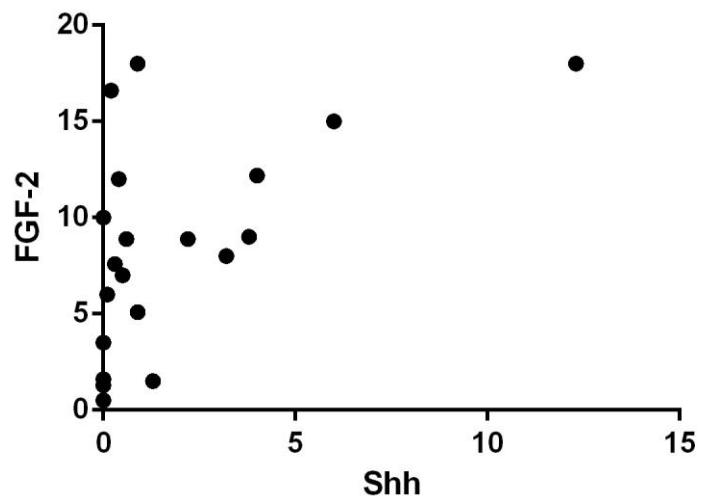


Figura 3 - Imagens representativas da reatividade imunoistoquímica para Shh (A), Gli-1 (B) e Fgf-2 (C) em adenoma de células basais de glândula salivar. Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase. Aumento original de 500x.

Gráfico 1 – Distribuição de 21 casos de adenomas de células basais, conforme o índice quickscore de reatividade imunoistoquímica para Shh e Fgf-2 ($r = 0,59$; $p = 0,005$; teste de correlação de Spearman).



5. DISCUSSÃO

A compartmentalização nuclear de β -Catenina pode estar ligada a ativação da via Wnt ou a mutações inativadoras gênicas que impossibilitariam a degradação dessa proteína no citoplasma (Sato et al., 2007; Klaus & Birchmeier, 2008; Rao & Küh, 2010; Lucero et al., 2010). Estudos recentes com ACB não conseguiram mostrar ativação da via de sinalização Wnt em ACB (Servato, 2010; Crispim, 2014), de forma que a expressão nuclear de β -Catenina nesse tumor permanece não esclarecida. O presente estudo trabalhou com a hipótese de que houvesse ativação da via HH no adenoma de células basais de glândula salivar, uma vez que esse fenômeno poderia estar associado à reconhecida expressão nuclear de β -Catenina nesse tumor (Kawahara, 2011).

Nos resultados observados, apesar da elevada proporção (71,4% dos casos) o padrão de marcação com baixa expressão, ou seja, com baixo QI, para Shh informa que a via HH parece, assim como a via Wnt, não ser relevante no desenvolvimento do ACB. De fato, corrobora essa possibilidade o fato de que a reatividade para Gli-1, molécula de transdução de sinal da via HH ativada, também foi quase que desprezível nas amostras ora avaliadas. A baixa expressão dessas duas moléculas pode sugerir que seria necessário uma grande concentração de Shh para ativar a via HH e assim permitir o acúmulo de Gli-1 na célula. Dessa forma o presente estudo não suporta a participação da via HH na patogênese desse tumor e não justifica a expressão nuclear de β -Catenina em ACB.

A GSK3 β foi observada em 80% dos casos de ACB com marcação de fraca a moderada (Crispim, 2014). Essa proteína é responsável pela fosforilação e posterior degradação da Gli-1, na ausência de sinal de HH (Mizuarai et al., 2009). Tal achado de GSK3 β em ACB (Crispim, 2014) e a baixa atividade para Gli-1 encontrada no presente estudo pode sugerir que a GSK3 β esteja em atividade e provendo a destruição de Gli-1, sendo mais um fator de que a via de sinalização HH não está ativa nos ACB.

Estudos experimentais evidenciam a presença de fatores de crescimento de fibroblasto (Fgf), inclusive Ffg-2 em TGS, como por exemplo,

no adenoma pleomórfico e em sua variante maligna, no carcinoma adenóide cístico e carcinoma mucoepidermóide (Myoken et al. 1996; Furuse et al., 2010; Miguita et al., 2010; Soares et al., 2012) porém a sua expressão não foi ainda investigada em ACB de glândula salivar.

A imunolocalização de Fgf-2 em ACB, mostrada pela primeira vez neste estudo, foi semelhante ao encontrado em outro trabalho envolvendo tumores malignos de glândula salivar, os quais apresentaram localização citoplasmática e nuclear, tanto em células mioepiteliais quanto ductais, em todos os casos, sugerindo que o fator de crescimento seja produzido endogenamente (Myoken et al., 1996) e que possua ação de indutor tumoral.

Sabe-se que em precursores neuronais e em células tumorais incubadas com Fgf-2, esta abole quase que completamente a proliferação celular induzida pela ativação de Shh (Fogarty et al., 2007). Ao passo que em tecido de pele normal tratados com Fgf-2 *in vivo* induziu expressão aumentada de Shh e β-Catenina (Lin et al., 2015). O resultado aqui verificado, com elevada expressão de Fgf-2 e reduzida de Shh, pode sugerir que no tecido estudado a Fgf-2 apresente um comportamento semelhante a sua ação em tecidos neurais e células neoplásicas acabando por inibir a proliferação celular induzida por Shh, tratando-se de uma evidência de que não ocorra ativação da via HH na patogênese do ACB. Ao mesmo tempo a Fgf-2 pode estar relacionada à expressão aumentada de β-Catenina em ACB e ser a chave para sua explicação.

Porém a falta de evidência de β-Catenina em outros TGS (Kawahara et al., 2011) e a presença de Fgf-2 (Myoken et al. 1996; Furuse et al., 2010; Miguita et al., 2010; Soares et al., 2012) é insuficiente para confirmar tal hipótese sendo necessário estudos comparativos envolvendo essas duas proteínas em ACB e em outros TGS.

Um único caso apresentou marcação intensa para as três proteínas estudadas. Pode-se sugerir que nesse caso a Fgf-2 esteja exercendo um papel indutor de Shh, conforme Lin e colaboradores (2015) demonstraram sendo assim capaz de ativar a via HH e consequentemente apresentar também Gli-1. Porém, por ser um caso atípico dos demais, em que se manteve baixa

intensidade para Shh e Gli-1 e elevada para Fgf-2, é insuficiente para ser usado como critério diferencial em ACB. O caso foi mantido no estudo devido à escassa quantidade de ACB para análise.

A correlação moderada entre Shh e Fgf-2, sugere a existência de retroalimentação positiva de Shh para com Fgf-2, acabando por regular negativamente a função de Shh, através de um mecanismo de feedback positivo.

Para melhor verificar quais moléculas estão envolvidas nos mecanismos que levam ao ACB, especialmente melhor compreender a expressão nuclear de β -Catenina, e aperfeiçoar seu diagnóstico diferencial, outras proteínas envolvidas na via HH devem ser estudadas para confirmação da presença ou não dessa via na patogênese do ACB, como por exemplo, a proteína Ptch, que não foi avaliada neste estudo devido a uma falha na padronização de reagentes, a qual impossibilitou a padronização do mesmo.

Devido a sua raridade, o adenocarcinoma de células basais não foi incluído no presente estudo, não sendo realizadas comparações entre eles, impossibilitando prever ou sugerir que a evolução maligna do ACB esteja envolvendo as moléculas estudadas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados deste estudo sugerem que a via de sinalização HH não está relacionada à alteração na expressão de β -Catenina no ACB e sugerir que nessa lesão a Fgf-2 tenha ação de indutor tumoral. E ainda abrem novas possibilidades para investigação e melhor compreender a patogênese podendo a Fgf-2 estar relacionada à expressão aumentada de β -Catenina.

REFERÊNCIAS*

- Anastas JN, Moon RT. WNT signaling pathways as therapeutic targets in cancer. **Nature Reviews**. 2013;13(1):11-24.
- Araújo VC. Basal cell adenoma. IN Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds.). **World Health Organization classification of tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC Press, 2005. p. 261.
- Aza-Blanc P, Ramírez-Weber FA, Laget MP, Schwartz C, Kornberg T B. Proteolysis that is inhibited by hedgehog targets Cubitus interruptus protein to the nucleus and converts it to a repressor. **Cell**. 1997;89(7):1043-53.
- Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. **World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2005.
- Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM. Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis. **Nature**. 2004;432(7015):324-31.
- Bellusci S, Furuta Y, Rush MG, Henderson R, Winnier G, Hogan BLM. Involvement of Sonic hedgehog (Shh) in mouse embryonic lung growth and morphogenesis. **Development**. 1997;124(1):53-63.
- Bilal H, Handra-Luca A, Bertrand JC, Fouret PJ. P63 is expressed in basal and myoepithelial cells of human normal and tumor salivary gland tissues. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry**. 2003;51(2):133-9.
- Brauburger K, Akyildiz S, Ruppert JG, Graeb M, Bernkopf DB, Hadjihannas MV, et al. Adenomatous polyposis coli (APC) membrane recruitment 3, a member of the APC membrane recruitment family of APC-binding proteins, is a positive regulator of Wnt-β-catenin signalling. **The FEBS Journal**. 2014;281(3):787-801.
- Buim MEC, Gurgel CAS, Ramos EAG, Lourenço SV, Soares FA. Activation of sonic hedgehog signaling in oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. **Human pathology**. 2011;42(10): 1484-90.
- Cohen Jr MM. Hedgehog signaling update. **American Journal of Medical Genetics Part A**. 2010;152(8):1875-1914.

* De acordo com a Norma da FOUFU, baseado nas Normas de Vancouver.
Abreviaturas dos periódicos com conformidade com Medline (Pubmed).

Cordeiro, MS. **Adenoma de células basais no Instituto Nacional de Câncer: experiência recente com 30 casos.** [dissertação] Uberlândia: Faculdade de Odontologia/UFU; 2010.

Crispim, LF. **Imunolocalização de β-Catenina, GSK3β, APC, LEF-1, e-Caderina e p63 em adenomas de células basais de glândula salivar.** [dissertação] Uberlândia: Mestrado em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas/UFU; 2014.

Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A. Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. **Nature.** 1997;389(6653):876-81.

Daley TD, Gardner DG, Smout MS. Canalicular adenoma: not a basal cell adenoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology.** 1984;57(2):181-8.

Dakeng S, Duangmano S, Jiratchariyakul W, U-Pratya Y, Bögler O, Patmasiriwat P. Inhibition of WNT signaling by cucurbitacin B in breast cancer cells: reduction of WNT associated proteins and reduced translocation of galectin-3-mediated β-catenina to the nucleus. **Journal of Cellular Biochemistry.** 2013;113(1):49-60.

Dessaud E, McMahon AP, Briscoe J. Pattern formation in the vertebrate neural tube: a sonic hedgehog morphogen-regulated transcriptional network. **Development.** 2008;135(15):2489-2503.

Detre S, Jotti GS, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. **Journal of Clinical Pathology.** 1995;48(9):876-8.

Ellis GL, Auclair PL, Gnepp DR. **Surgical Pathology of the Salivary Glands.** Philadelphia, WB: Saunders, 1991.

Ellis GL, Auclair PL. **Atlas of Tumor Pathology: Tumors of the Salivary Glands.** 4 ed. Washington,DC: Armed Forces Institute of Pathology; 2008.

Espada J, Calvo MB, Díaz-Prado S, Medina V. Wnt signalling and cancer stem cells. **Clinical & Translational Oncology.** 2009;11(7):411-27.

Eveson JW, Aucalin P, Gnepp DR, El-Naggar AK. Tumour of the salivary glands: Introduction. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. **World Health Organization classification of tumours: Pathology and genetics of head and neck tumours.** Lyon: IARC Press, 2005. p.209-281.

Fogarty MP, Emmenegger BA, Grasfeder LL, Oliver TG, Wechsler-Reya RJ. Fibroblast growth factor blocks Sonic hedgehog signaling in neuronal precursors and tumor cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** 2007;104(8):2973-8.

Furuse C, Miguila L, Rosa ACG, Soares AB, Martinez EF, Altemani A, et al. Study of growth factors and receptors in carcinoma ex pleomorphic adenoma. **Journal of oral pathology & medicine**. 2010;39(7):540-7.

Gardner DG, Daley TD. The use of the terms monomorphic adenoma, basal cell adenoma, and canalicular adenoma as applied to salivary gland tumors. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**. 1983;56(6):608-15.

Ghali L, Wong ST, Green J, Tidman N, Quinn AG. Gli1 protein is expressed in basal cell carcinomas, outer root sheath keratinocytes and a subpopulation of mesenchymal cells in normal human skin. **Journal of investigative dermatology**. 1999;113(4):595-9.

Giles RH, Van Es JH, Clevers H. Caught up in a WNT storm: WNT signaling in cancer. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2003;1653(1):1-24.

Grindley JC, Bellusci S, Perkins D, Hogan BLM. Evidence for the Involvement of the Gli Gene Family in Embryonic Mouse Lung Development. **Developmental biology**. 1997;188(2):337-48.

Hagen T, Puig AV. Characterisation of the phosphorylation of β -catenin at the GSK-3 priming site Ser45. **Biochemical and biophysical research communications**. 2002;294(2):324-8.

Hai B, Yang Z, Millar SE, Choi YS, Taketo MM, Nagy A, et al. Wnt/ β -catenin signaling regulates postnatal development and regeneration of the salivary gland. **Stem cells and development**. 2010;19(11): 1793-1801.

Hashizume A, Hieda Y. Hedgehog peptide promotes cell polarization and lumen formation in developing mouse submandibular gland. **Biochemical and biophysical research communications**. 2006; 339(3):996-1000.

Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. **Genes & development**. 2001;15(23):3059-87.

Jaskoll T, Leo T, Witcher D, Ormestad M, Astorga J, Bringas Jr P, et al. Sonic hedgehog signaling plays an essential role during embryonic salivary gland epithelial branching morphogenesis. **Developmental dynamics**. 2004;229(4):722-32.

Jones AV, Craig GT, Speight PM, Franklin CD. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. **Oral oncology**. 2008;44(4):407-17.

Kawahara A, Harada H, Abe H, Yamaguchi T, Taira T, Nakashima K, et al. Nuclear β -catenin expression in basal cell adenomas of salivary gland. **Journal of Oral Pathology & Medicine**. 2011;40(6):460-6.

Kierszenbaum AL. **Histologia e Biologia Celular: uma introdução à Patologia.** 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 677p. 489-495.

Klaus A, Birchmeier W. WNT signaling and its impact on development and cancer. **Nature Reviews Cancer.** 2008;8(5):387-398.

Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Undén AB, Sandstedt B, et al. Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear–cytoplasmic shuttling of Gli-1. **Nature cell biology.** 1999;1(5):312-9.

Lin C, Fisher AV, Yin Y, Maruyama T, Veith, GM, Dhandha M. et al. The inductive role of Wnt-β-Catenin signaling in the formation of oral apparatus. **Developmental biology.** 2011;356(1):40-50.

Lin WH, Xiang LJ, Shi HX, Zhang J, Jiang LP, Cai PT et al. Fibroblast Growth Factors Stimulate Hair Growth through β-Catenin and Shh Expression in C57BL/6 Mice. **BioMed Research International.** 2015; 2015.

Lucero OM, Dawson DW, Moon RT, Chien AJ. A re-evaluation of the "oncogenic" nature of Wnt/beta-catenin signaling in melanoma and other cancers. **Current Oncology Reports.** 2010;12(5):314-318.

Matise MP, Joyner AL. Gli genes in development and cancer. **Oncogene.** 1999;18(55):7852-9.

Miguita L, Martinez EF, Soares de Araújo N, Cavalcanti de Araújo V. FGF-2, TGFβ-1, PDGF-A and respective receptors expression in pleomorphic adenoma myoepithelial cells: an in vivo and in vitro study. **Journal of Applied Oral Science.** 2010;18(1):83-91.

Miller RT, Kubier P, Reynolds B, Henry T, Turnbow, H. Blocking of endogenous avidin-binding activity in immunohistochemistry: the use of skim milk as an economical and effective substitute for commercial biotin solutions. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology.** 1999;7(1):63-5.

Miller LAD, Wert SE, Whitsett JA. Immunolocalization of sonic hedgehog (Shh) in developing mouse lung. **Journal of Histochemistry & Cytochemistry.** 2001;49(12):1593-1603.

Mimeault M, Batra SK. Frequent deregulations in the hedgehog signaling network and cross-talks with the epidermal growth factor receptor pathway involved in cancer progression and targeted therapies. **Pharmacological reviews.** 2010;62(3):497-524.

Mizuarai S, Kawagishi A, Kotani H. Inhibition of p70S6K2 down-regulates Hedgehog/GLI pathway in non-small cell lung cancer cell lines. **Mol Cancer.** 2009;8:44-54.

Morrison RS. Suppression of basic fibroblast growth factor expression by antisense oligodeoxynucleotides inhibits the growth of transformed human astrocytes. **Journal of Biological Chemistry**. 1991;266(2): 728-34.

Myoken Y, Myoken Y, Okamoto T, Sato JD, Kan M, McKeehan WL, et al. Immunohistochemical study of overexpression of fibroblast growth factor-1 (fgf-1), fgf-2, and fgf receptor-1 in human malignant salivary gland tumours. **The Journal of pathology**. 1996;178(4): 429-36.

Nagao T, Sugano I, Ishida Y, Matsuzaki O, Konno A, Kondo Y, et al. Carcinoma in basal cell adenoma of the parotid gland. **Pathology-Research and Practice**. 1997;193(3):171-8.

Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in Drosophila. **Nature**. 1980;287(5785):795-801.

Ogden SK, Ascano Jr M, Stegman MA, Robbins DJ. Regulation of Hedgehog signaling: a complex story. **Biochemical pharmacology**. 2004;67(5):805-14.

Owens DM, Watt FM. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. **Nature Reviews Cancer**. 2003;3(6):444-451.

Polakis P. The many ways of Wnt in cancer. **Current Opinion in Genetics & Development**. 2007;17(1):45-51.

Do Prado RF, Consolaro A, De Assis Taveira LA. Expression of betacatenin in carcinoma in pleomorphic adenoma, pleomorphic adenoma and normal salivary gland: an immunohistochemical study. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. 2006;11(3):E247-251.

Do Prado RF, Cardoso CL, Consolaro A; De Assis Taveira LA. Nuclear β -Catenin in Basal Cell Adenomas. **International journal of surgical pathology**. 2007;15(2):219-220.

Ramachandran I, Thavathiru E, Ramalingam S, Natarajan G, Mills WK, Benbrook DM et al. WNT inhibitory factor 1 induces apoptosis and inhibits cervical cancer growth, invasion and angiogenesis. 2012;31(22):2725-37.

Raitz R, Araújo VCD. Estudo do estado de diferenciação da célula mioepitelial nas neoplasias de glândula salivar. **Acta sci., Health sci.** 2004;26(2):345-50

Rao TP, Kühl M. An updated overview on Wnt signaling pathways: a prelude for more. **Circulation Research**. 2010;106(12):1798-1806.

Ruiz i Altaba A. Gli proteins and Hedgehog signaling: development and cancer. **Trends in Genetics**. 1999; 15(10):418-25.

Sato H, Suzuki H, Toyota M, Nojima M, Maruyama R, Sasaki S, et al. Frequent epigenetic inactivation of DICKKOPF Family genes in human gastrointestinal tumors. **Carcinogenesis**. 2007; 28(12):2459-2466.

Servato, JPS. **Imunolocalização de Wnt-1, β-Catenina e c-Myc em adenomas e adenocarcinomas de células basais de glândula salivar.** [dissertação] Uberlândia: Faculdade de Odontologia/UFU; 2011.

Setti K, Mouanis M, Moumni A, Maher M, Harmouch A. Profil épidémiologique des tumeurs malignes primitives des glandes salivaires: à propos de 154 cas. **The Pan African Medical Journal**. 2014;17(117).

Soares AB, Demasi AP, Tincani AJ, Martins AS, Altemani A, Cavalcanti de Araújo V. The increased PDGF-A, PDGF-B and FGF-2 expression in recurrence of salivary gland pleomorphic adenoma. **Journal of clinical pathology**. 2012;65(3):272-7.

Surana R, Sikka S, Cai W, Shin EM, Warrier SR, Tan HJG, et al. Secreted frizzled related proteins: Implications in cancers. **Biochimica et Biophysica Acta**. 2014;1845(1):53-65.

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

Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. **Nature**. 2002;418(6900): 892-6.

Tang JY, So PL, Epstein Jr EH. Novel Hedgehog pathway targets against basal cell carcinoma. **Toxicology and applied pharmacology**. 2007;224(3):257-64.

Tian Z, Li L, Wang L, Hu Y, Li J. Salivary gland neoplasms in oral and maxillofacial regions: a 23-year retrospective study of 6982 cases in an eastern Chinese population. **International journal of oral and maxillofacial surgery**. 2010;39(3):235-42.

Wang YF, Chang CJ, Lin CP, Chang SY, Chu PY, Tai SK, et al. Expression of hedgehog signaling molecules as a prognostic indicator of oral squamous cell carcinoma. **Head & neck**. 2012;34(11):1556-61.

Xuan YH, Jung HS, Choi YL, Shin YK, Kim HJ, Kim KH, et al. Enhanced expression of hedgehog signaling molecules in squamous cell carcinoma of uterine cervix and its precursor lesions. **Modern pathology**. 2006;19(8):1139-47.

Yu GY, Ussmueller J, Donath K. Histogenesis and development of membranous basal cell adenoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**. 1998;86(4): 446-51.

Zarbo RJ, Prasad AR, Regezi JA, Gown AM, Savera AT. Salivary gland basal cell and canalicular adenomas: immunohistochemical demonstration of myoepithelial cell participation and morphogenetic considerations. **Archives of pathology & laboratory medicine**. 2000;124(3):401-5.

Zarbo RJ. Salivary gland neoplasia: a review for the practicing pathologist. **Modern pathology**. 2002;15(3):298-323.

ANEXO A - Aprovação do Comitê de Ética

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: VIAS DE SINALIZAÇÃO WNT E SHH E A PECULIAR EXPRESSÃO NUCLEAR DE BETA-CATENINA EM ADENOMA DE CÉLULAS BASAIS

Pesquisador: SÉRGIO VITORINO CARDOSO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 09890512.3.0000.5152

Instituição Proponente: FACULDADE DE ODONTOLOGIA (UFU)

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 180.356

Data da Relatoria: 30/11/2012

Apresentação do Projeto:

Considerando a oportunidade de aprimoramento de critérios de diagnóstico, e ainda a ausência de conhecimento científico abrangente sobre a influência das vias WNT e SHH no adenoma de células basais (ACB) em particular, mas também em outros tumores de glândula salivar, o estudo irá testar a hipótese de que a expressão nuclear forte e frequente de beta-catenina em ACB é um diferencial claro para outros tumores com citodiferenciação basalóide (adenocarcinoma de células basais, carcinoma adenóide cístico), mioepitelial (adenoma pleomórfico) e tubular (adenoma canalicular), e pode ser útil no diagnóstico diferencial dessas lesões. Além disso, alterações na sinalização da via WNT e, ou, SHH podem ser responsáveis pelo achado típico de marcação nuclear forte e intensa de beta-catenina em ACB, em comparação com o padrão de expressão dessas moléculas em glândula salivar normal e em outros tumores de glândula salivar.

Objetivo da Pesquisa:

É objetivo geral do estudo obter informações abrangentes a respeito da participação das vias de sinalização WNT e SHH no desenvolvimento de tumores de glândula salivar com citodiferenciação basalóide, mioepitelial e tubular, com particular ênfase no adenoma de células basais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo não oferece nenhum risco direto à saúde dos sujeitos, visto tratar-se de estudo retrospectivo. No entanto, foi previsto que o consumo de parte do "bloco de biópsia" pode conferir risco no sentido de utilizar material que poderá ser necessário para alguma avaliação do serviço.

Também consideraram o risco de divulgação de informações pessoais, sendo que para ambas as situações, foram apresentadas estratégias para prevenção das situações.

Como benefícios, diferentes questões foram citadas, tais como avanço tecnológico aplicado ao diagnóstico do ACB; conhecimento científico quanto ao tema em estudo e formação de pessoal no desenvolvimento de pesquisas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de estudo retrospectivo, descritivo, tipo série de 56 casos diagnosticados como adenoma de células basais, adenoma pleomórfico, adenoma canalicular, adenocarcinoma de células basais e carcinoma adenóide cístico. As fontes de material e informações necessárias ao estudo serão provenientes de arquivo do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia. Para caracterização da amostra, de cada caso serão recuperadas informações demográficas dos pacientes (sexo e idade), bem como a localização anatômica da lesão. As análises imunohistoquímicas das proteínas betacatenina, E-caderina, Wnt1a, Wnt2, Wnt3a, Wnt4, Wnt5, Frizzled-7, Wif1, SFRP-1, SFRP-2, CK1 epsilon, GSK3beta, APC, c-myc, ciclina D1, SHH, PTCH, SMO, Gli1, Gli3 e galectina-3 serão feitas em cortes histológicos obtidos de material arquivado, incluído em parafina. Seguir-se-á o protocolo estabelecido no Laboratório sede. Para análise da reatividade imunoistoquímica, será utilizado sistema de fotomicrografia composto por microscópio acoplado a câmera fotográfica. Para cada caso, serão inicialmente definidas as áreas de hot spot da marcação e, dentre elas, serão obtidas imagens digitais daquelas que apresentem morfologia histopatológica mais característica de cada lesão. Inicialmente, o padrão de marcação de cada antígeno será descrito conforme os diferentes padrões de citodiferenciação em cada tumor, com ênfase na diferenciação basalóide, mioepitelial e tubular, conforme presentes. Em seguida, todas as células tumorais das áreas de hot spot, até o máximo de 800, serão avaliadas para se determinar a proporção de células positivas, denominada $\{\text{índice de marcação}\}$. Ao final, para definição de categorias de marcação, cada amostra será classificada em uma de três classes: 0 - ausência de reatividade, 1 - reatividade observada em até 30% das células, e 2 - reatividade em mais de 30% das células. O cronograma do estudo indica que o rastreamento e seleção de casos terá início em fevereiro de 2013 e o término, o qual culmina com o relatório da pesquisa, em dezembro de 2014. O custo total será na ordem de R\$ 135.315,84 financiados parcialmente pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Valor Global: R\$ 49.915,84).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram adequadamente preenchidos, apresentados e assinados.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Data para entrega de Relatório Parcial: dezembro de 2013.

Data para entrega de Relatório Final: dezembro de 2014.

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

O CEP/UFU lembra que:

- a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.
- b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.
- c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

Orientações ao pesquisador :

¿ O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 - Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

¿ O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.3.z), aguardando seu parecer, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos da pesquisa (Item V.3) que requeiram ação imediata.

↳ O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e junto com seu posicionamento.

↳ Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprobatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res.251/97, item III.2.e). O prazo para entrega de relatório é de 120 dias após o término da execução prevista no cronograma do projeto, conforme norma.

UBERLANDIA, 21 de Dezembro de 2012

Assinador por:
Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

Apêndice 1 – Média de QuickScore para cada caso

Caso	<i>Shh</i>	<i>Gli-1</i>	<i>Fgf-2</i>
1	6	4,1	15
2	1,2	0,05	1,5
3	0,6	1,6	8,9
4	0	0	1,5
5	0,4	0	12
6	0	0	1,3
7	0	6,1	3,5
8	0,9	0	5,0
9	0,2	0,5	16,5
10	0	0	3,6
11	3,8	0	9
12	0,9	0	18
13	0,1	0	6
14	0	1,5	10
15	3,9	1,5	12,2
16	0,5	0	7
17	0	0	0,5
18	3,1	4,2	8
19	12,3	11,1	18
20	2,2	0,4	8,9
21	0,3	1,3	7,6