

ANA MARIA HOYOS CADAVID

**Avaliação imunoistoquímica das proteínas da via de sinalização Sonic
Hedgehog (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2 e Gli3) em tumores
odontogênicos queratocísticos associados ou não à Síndrome do Carcinoma
Basocelular Nevoide**

São Paulo

2016

ANA MARIA HOYOS CADAVID

**Avaliação imunoistoquímica das proteínas da via de sinalização Sonic
Hedgehog (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2 e Gli3) em tumores
odontogênicos queratocísticos associados ou não à Síndrome do Carcinoma
Basocelular Nevoide**

Versão corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Para obter o título de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Área de concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada).

Orientador: Prof. Dr. Fábio Alves de Abreu

SÃO PAULO
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Cadavid, Ana Maria Hoyos.

Avaliação imunoistoquímica das proteínas da via de sinalização Sonic Hedgehog (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2 e Gli3) em tumores odontogênicos queratocísticos associados ou não à Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevoide / Ana Maria Hoyos Cadavid ; orientador Fábio Alves de Abreu. -- São Paulo, 2016.

61 p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Tumor odontogênico queratocístico. 2. Síndrome do carcinoma basocelular nevoide. 3. Via de sinalização Sonic Hedgehog. 4. Recidiva. 5. Imunohistoquímica. I. Abreu, Fábio Alves de. II. Título.

Hoyos AM. Avaliação imunoistoquímica das proteínas da via de sinalização Sonic Hedgehog (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2 e Gli3) em tumores odontogênicos queratocísticos associados ou não à Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevoide. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: / /2016

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

*Dedico estes anos de estudo primeiramente a **Deus**, por me brindar esta maravilhosa oportunidade e permitir que eu concluísse esta fase da minha vida com saúde física e mental. Por sempre me orientar e sustentar, mesmo nas adversidades.*

*Aos meus amados pais **Miro e Amparo**, com quem conto sempre incondicionalmente em cada passo que dou, a eles devo tudo que sou hoje. Obrigada por me abençoar e cuidar o tempo todo. Vocês são o maior tesouro na minha vida.*

*Aos meus irmãos **Robert e Julian**, por me brindarem a força necessária para continuar nos momentos mais difíceis e por serem sempre meu maior apoio.*

*Ao meu adorado sobrinho, **Juan Andres**, para quem quero servir de exemplo.*

*A minha **tia Maria**, que sempre tem significado muito na minha vida, por ser exemplo de bondade, gentileza, força e amor incondicional.*

*Ao meu noivo **Pablo**, por todo o apoio, companheirismo, atenção e sobre tudo a paciência, por ser essa pessoa que sempre caminha ao meu lado e se arrisca a viver novas experiências, sem se importar com as dificuldades.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador **Prof. Dr. Fabio Alves de Abreu** por me acolher e me dar essa maravilhosa oportunidade, mesmo sabendo das dificuldades de orientar uma pessoa estrangeira, obrigada por aceitar este desafio e por ser sempre essa pessoa respeitosa, admirável e imparcial, por confiar na minhas capacidades e no meu trabalho e por me ensinar tanto.

À **coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de doutorado, o que tornou possível a realização deste trabalho.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP)** pelo acolhimento e por me permitir o acesso e utilização de suas instalações e laboratórios.

Agradeço a minha eterna orientadora **Prof. Dra. Gloria Alvarez**, quem sempre confiou em mim e quem é um modelo de pessoa e profissional a seguir. Por ser minha inspiração e minha conselheira.

Agradeço ao **Prof. Dr. Oslei** por ter me dado a oportunidade e ter confiado em minhas capacidades.

Agradeço **aos professores das disciplina de Patologia Bucal e Estomatologia**, especialmente aos professores doutores **Décio, Suzana, Fabio e Camila** pelos constantes ensinamentos e por compartilhar seus conhecimentos comigo, obrigada de coração pelo apoio sempre.

Agradeço enormemente ao **Prof. Dr. Celso Lemos**, que representou um pai para mim nestes 4 anos de estudo, ele fez o passo pela universidade muito mais fácil, obrigada por sua gentileza, boa disposição, humildade e paciência.

Agradeço ao **Prof. Dr. Norberto**, por tornar-se meu amigo, por me ensinar cada dia coisas novas, por ser meu maestro, por compartilhar seus conhecimentos sem egoísmo, por sua boa disposição e humildade.

Agradeço a **Prof. Dra. Estela** pela paciência, pelo amor na hora de ensinar, pela gentileza e o respeito, obrigada por me ensinar tanto.

Do fundo de meu coração agradeço a meus amigos e irmãos **Daniella, Douglas, Nelise, Tathy e Elaine**, pela amizade verdadeira, pelo convívio alegre e harmonioso, vocês são amigos que vou levar para a vida toda. Mil vezes obrigada por fazer de meu passo pelo Brasil algo maravilhoso e inesquecível.

Agradeço a minha mãe brasileira **Laura**, que me adotou como filha e me fez sentir sempre em casa, obrigada por cuidar de mim sempre e ficar ao meu lado.

Agradeço a todos **os colegas da pós-graduação**, pelas ajudas incondicionais e por fazer meu convívio muito mais agradável, especialmente a **Marina, Carina, Erica e Gustavo**.

Agradeço a **Nina e a Ceci**, duas pessoas que sempre cuidaram de mim como uma filha, obrigada pela gentileza, pelo carinho brindado, por me fazer sentir em família. Vocês tornaram meus dias muito mais fáceis e cheios de boas lembranças.

Obrigada **Laerte, Elisa, Vinicius, Fatima, Zilda, Juvani, Neia**, por toda a ajuda, apoio e gentileza durante todas as fases do curso.

Agradeço a **Luana, Sueli, Severino e Maria Fernanda**, pela constante ajuda na realização deste trabalho.

Ciente de que seria impossível me lembrar de todos que, direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, deixo aqui meus sinceros agradecimentos aqueles que fizeram parte de minha conquista.

RESUMO

Hoyos AM. Avaliação imunoistoquímica das proteínas da via de sinalização Sonic Hedgehog (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2 e Gli3) em tumores odontogênicos queratocísticos associados ou não à Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevoide [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida

O Tumor Odontogênico Queratocístico (TOQC) é considerado uma entidade com alta taxa de recidiva e agressividade local, apresentando também frequente associação com a Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevoide (SCBCN), por isso a patogênese de este tumor tem sido intensamente estudada. A transformação e proliferação de células neoplásicas normalmente envolvem a desregulação de vias de sinalização que participam do desenvolvimento embrionário normal, principalmente a via Sonic Hedgehog (Shh). A expressão de certas proteínas presentes nesta via foi detectada em vários tumores odontogênicos, sugerindo que desempenha um papel importante nas interações epiteliais e na proliferação de células tumorais. Embora o papel da via de sinalização Shh não esteja bem estabelecida no desenvolvimento de TOQCs, sugere-se que sua ativação pode ser correlacionada com o comportamento clínico agressivo destas lesões. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas da via de sinalização Shh em TOQCs esporádicos e associados a SCBCN, além de comparar a sua expressão entre lesões recorrentes e não recorrentes. Para isso foi realizado um estudo retrospectivo onde as características clínico-patológicas de 62 pacientes foram avaliadas, a expressão imunoistoquímica das proteínas Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2 e Gli3 foi analisada em todas as amostras, comparando TOQCs sindrômicos (29 lesões) e TOQCs esporádicos (57 lesões), assim como sua respectiva recorrência. Com este estudo foi possível observar que as proteínas Shh, Smo e Gli1 revelaram aumento da expressão em TOQCs associados a SCBCN, em comparação com

tumores esporádicos. Shh mostrou expressão citoplasmática intermédia dentro da camada basal em tumores síndrômicos, Smo por sua vez revelou forte expressão nuclear e citoplasmática nas camadas basal e suprabasal de tumores síndrômicos, enquanto que a expressão de Gli1 foi mais elevada apenas no citoplasma de TOQCs associados à síndrome em comparação com tumores esporádicos. No que diz respeito à sua recorrência, as proteínas Ptch1 e Gli2 mostraram maior expressão em TOQCs esporádicos e recorrentes, enquanto que a expressão Gli1 foi mais relevante nos tumores recorrentes e associados à SCBCN. Os nossos resultados sugerem que a maior expressão das proteínas Shh, Smo e Gli1 em TOQCs pode contribuir para o diagnóstico precoce de lesões associadas com a SCBCN. Da mesma forma, as proteínas Ptch1 e Gli2 podem prever o risco de recorrência de TOQCs esporádicos, enquanto Gli1 sugere uma potencial associação de recorrência em tumores síndrômicos.

Palavras-chave: Tumor odontogênico queratocístico. Síndrome do carcinoma basocelular nevoide. Via de sinalização Sonic Hedgehog. Recorrência. Imunoistoquímica.

ABSTRACT

Hoyos AM. Immunohistochemical evaluation of the signaling pathway Sonic Hedgehog proteins (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2 e Gli3) in keratocystic odontogenic tumors and their associated with the nevoid basal cell carcinoma syndrome [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2016. Versão Corrigida.

Keratocystic Odontogenic Tumor (KCOT) is considered an entity of high recurrence rates and local aggressiveness, also often presenting association with Nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS), and the pathogenesis of this tumor has been therefore intensively studied. The transformation and proliferation of neoplastic cells usually involve deregulation of signaling pathways participating in normal embryonic development, mainly via Sonic Hedgehog (Shh). The expression of certain proteins of this pathway has been detected in several odontogenic tumors, suggesting that plays an important role in epithelial interactions and proliferation of tumor cells. Although the role of Shh signaling pathway is not well established in the development of KCOTs it has been suggested that its activation can be correlated to the aggressive clinical behavior of these lesions. The aim of this study is therefore to evaluate the immunohistochemical expression of proteins of Shh signaling pathway in sporadic KCOTs and associated with NBCCS and to compare their expression between recurring and non-recurring lesions. thus, a retrospective study was performed where the clinicopathological features of 62 patients were evaluated, the immunohistochemical expression of the Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2 and Gli3 protein, was analyzed in all samples, comparing syndromic KCOTs (29 lesions) and sporadic KCOTs (57 lesions), and also their respective recurrence. The results showed that the expression of Shh, Smo and Gli1 proteins was increased in KCOTs associated with NBCCS compared to sporadic tumors. Shh showed intermediate cytoplasmic expression within the basal layer syndromic tumors, Smo in

turn showed strong nuclear expression and cytoplasmic in basal and suprabasal layers of syndromic tumors, while Gli1 cytoplasm expression was higher only in KCOTs associated syndrome compared with sporadic tumors. Regarding recurrent tumors, Ptch1 and Gli2 proteins showed higher expression in sporadic and recurrent KCOTs, while Gli1 expression was more significant in recurrent tumors and associated NBCCS. Our results suggest that increased expression of Shh, Smo and Gli1 proteins in KCOTs can contribute to early diagnosis of KCOTs associated with the NBCCS. Likewise, Ptch1 and Gli2 proteins can predict the risk of recurrence of sporadic KCOTs, while Gli1 suggest a potential association to recurrence into syndromic tumors.

Keywords: Keratocystic odontogenic tumor. Nevoid basal cell carcinoma syndrome. Signaling pathway Sonic Hedgehog. Recurrence. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Via de sinalização Sonic Hedgehog	23
Figura 5.1 - Expressão das proteínas da via de sinalização Shh em TOQCs esporádicos e associados com à SCBCN.....	43
Figura 5.2 - Padrão de expressão das proteínas Ptch1, Gli1 e Gli2 em TOQCs Recorrentes e não-recorrentes	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Anticorpos primários utilizados no estudo imunoistoquímico com respectivos títulos, origem e recuperação antigênica	35
Tabela 5.1 - Faixa etária distribuída em classes de 10 anos	38
Tabela 5.2 - Variáveis clínicas, sexo e etnia dos casos incluídos no estudo	39
Tabela 5.3 - Número de recorrências no total de 86 TOQCs	39
Tabela 5.4 -Análise semi-quantitativa das proteínas da via de sinalização Shh em TOQCs não-sindrômicos (Grupo1) e TOQCs sindrômicos (Grupo 2).....	42
Tabela 5.5 - Análise semi-quantitativa das proteínas da via de sinalização Shh em TOQCs esporádicos, comparando lesões recorrentes (R) e não recorrentes (NR)	46
Tabela 5.6 - Análise semi-quantitativa das proteínas da via de sinalização Shh em TOQCs associados a SCBCN, comparando lesões recorrentes (R) e não recorrentes (NR)	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COO	Cisto odontogênico ortoqueratinizado
OMS	Organização Mundial de Saúde
QO	Queratocisto odontogênico
SCBCN	Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevoide
Shh	Sonic Hedgehog
TOQC	Tumor odontogênico queratocístico
Ptch	Receptor transmembrânico Patched
Smo	Proteína transmembrânica Smoothened
Gli	Proteína citoplasmática Glioma associated oncogene
SUFU	Supressor de proteína Fused
CBC	Carcinoma basocelular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 NOMENCLATURA.....	19
2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E RADIOGRÁFICAS.....	19
2.3 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	20
2.4 HISTOGÊNESE E PATOGÊNESE	21
2.5 A VIA DE SINALIZAÇÃO SONIC HEDGEHOG	22
2.6 TRATAMENTO.....	24
2.7 RECORRÊNCIA	26
2.8 SÍNDROME DO CARCINOMA BASOCELULAR NEVOIDE	27
3 PROPOSIÇÃO	32
4 PACIENTES E MÉTODOS	33
4.1 CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA	33
4.2 METODOLOGIA.....	33
4.3 TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA	34
4.4 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA	36
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
5 RESULTADOS	38
5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS 62 PACIENTES.....	38
5.2 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA.....	40
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	53

REFERÊNCIAS	54
ANEXOS.....	60

1 INTRODUÇÃO

O termo queratocisto odontogênico foi descrito por Philipsen em 1956, a lesão atraiu o interesse por causa de suas características histopatológicas específicas o que a tornou muito estudada. Em função do seu comportamento agressivo, das dificuldades de estabelecer o melhor tratamento e da descoberta de anomalias cromossômicas, a Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2005 sugeriu a reclassificação da lesão como uma neoplasia benigna, denominando-a então como tumor odontogênico queratocístico (TOQC)(1,2).

Dentre as hipóteses de sua origem, o TOQC origina-se de remanescentes celulares da lâmina dentária, e conseqüentemente encontram-se nos ossos gnáticos. Pode acometer pacientes com idade variável, e apresenta leve predileção pelo sexo masculino. O comportamento clínico varia consideravelmente, alguns apresentam potencial de crescimento limitado, enquanto outros possuem características de uma neoplasia com alto potencial de agressividade local (3,4).

É importante salientar que o TOQC pode estar associado à Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevoide (SCBCN) que se caracteriza por ser uma síndrome hereditária autossômica dominante. Numerosas alterações de desenvolvimento como: múltiplos carcinomas basocelulares e anormalidades esqueléticas são observadas na síndrome. Reporta-se que aproximadamente 70% dos pacientes com a SCBCN apresentam múltiplos TOQCs (1) e que aproximadamente 40% apresentam mutação no gene *Ptch1*(5).

O comportamento clínico dos TOQCs é incerto, principalmente dos associadas à SCBCN, é por isso que muitos autores têm avaliado a imunexpressão de diversas proteínas envolvidas em proliferação e apoptose celular destes tumores na tentativa de justificar seu crescimento e suas características histológicas peculiares (6). Com o advento da biologia molecular, diversos estudos também investigam a participação de alterações genéticas e epigenéticas na patogênese destes tumores, instigando pesquisadores a elucidar esse processo e, conseqüentemente desvendar meios terapêuticos e diagnósticos eficazes. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a

expressão imunoistoquímica dos marcadores presentes na via de sinalização Sonic Hedgehog (Shh-Ptch1-Ptch2-Smo-Gli1-Gli2-Gli3) em TOQCs associados e não associados à SCBCN. Além disso, será comparada a expressão destas proteínas em TOQCs recorrentes e não recorrentes, com a finalidade de entender melhor a biologia e patogêneses deste tumor e proporcionar ferramentas úteis na hora de fazer um diagnóstico precoce nos casos em que outras manifestações da SCBCN ainda não são evidentes, assim como ajudar a prever o risco de recorrência e agressividade destas lesões.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NOMENCLATURA

Em 1956, descrito por Philipsen, o queratocisto odontogênico (QO) foi classificado como um cisto de desenvolvimento. Em 2005 a Organização Mundial da Saúde (OMS) sugeriu a mudança da classificação do QO como uma entidade neoplásica benigna, devido ao seu comportamento biológico agressivo, à altas taxas de recorrência e à associação com a SCBCN(1). Evidências acerca de um verdadeiro comportamento tumoral começaram a serem descobertas e, dessa forma, o QO foi então renomeado como tumor odontogênico queratocístico, consolidando suas características clínicas peculiares (7-9).

2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E RADIOGRÁFICAS

O TOQC trata-se de uma lesão de origem odontogênica que afeta principalmente região de ângulo e ramo da mandíbula (65-83% dos casos) com maior incidência em homens, com proporção homem: mulher que varia de 1.42:1 a 2:1 (9,10). Podem ser encontrados em pacientes com idade variável, porém a maior incidência ocorre entre 2ª e 3ª décadas de vida, com idade média em torno de 30 anos (7,11).

Geralmente, os TOQCs são assintomáticos, sendo descobertos com frequência, durante o exame radiográfico de rotina. Quando são sintomáticos, as queixas mais comuns são inchaço e/ou dor. Tendem a crescer no sentido anteroposterior, normalmente sem causar expansão óssea evidente. Outras manifestações como drenagem purulenta e parestesia podem ser observadas em lesões mais extensas (11-13).

Ao exame radiográfico, apresenta-se geralmente como lesão radiolúcida uni ou multilocular de formato ovoide com margens bem definidas. O envolvimento de elementos dentários pode estar presente e a reabsorção radicular é incomum (7,14,15)

Para a realização do diagnóstico é preciso a realização da biopsia incisional, acompanhada do análise das características clínicas e radiográficas. Entre os diagnósticos diferencias podemos incluir: O cisto dentigero, o ameloblastoma, o tumor odontogênico adenomatoide e o fibroma ameloblastico (15,16).

2.3 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS

Os achados histopatológicos são bem característicos do tumor, sendo geralmente constituídos de cavidade cística revestida por epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado de poucas camadas que variam de 5 a 8. A união com o tecido conjuntivo subjacente apresenta-se de forma linear e sua camada basal apresenta células colunares e dispostas em paliçada com núcleo basofílico. Nas camadas suprabasais podem haver sinais de mitoses e raramente apresentar displasia epitelial. A superfície de revestimento apresenta-se normalmente corrugada, podendo apresentar lâminas de paraqueratina sobre a camada superficial, e focos de ortoqueratinização podem ser observados (17).

Devido à semelhança histopatológica, o cisto odontogênico ortoqueratinizado (COO) era caracterizado como uma variante do TOQC. No entanto, baseando-se no comportamento clínico, sugeriu a distinção entre as duas lesões. Em concordância, alguns estudos também mostraram diferenças entre características histopatológicas e perfil imunoistoquímico destas lesões, sendo atualmente, considerados como entidades distintas (17–19).

O tecido conjuntivo frouxo que permeia a lesão odontogênica pode eventualmente apresentar cistos satélites. A presença de infiltrado inflamatório não é um achado característico, porém, quando presente, pode ser capaz de alterar o aspecto epitelial e dificultar o diagnóstico (7,20). A cápsula cística dos TOQCs é delgada,

composta por tecido fibroso rico em mucopolissacarídeos. Ilhas de células epiteliais odontogênicas e microcistos satélites podem estar presentes (18,20–22).

2.4 HISTOGÊNESE E PATOGÊNESE

Considerando o fato de que os tumores odontogênicos são oriundos de remanescentes celulares de tecidos da odontogênese, diversos pesquisadores passaram a investigar uma via de sinalização fundamental para o desenvolvimento embrionário dos dentes, dentre outras estruturas, denominada *Sonic Hedgehog* (Shh) (23,24). Além disso, já é bem documentada a relação patogênica existente entre mutações do gene *Ptch1* e *Smo* (consideradas supressores de tumor) e os TOQCs associados à SCNCB, o que indica que essa via de sinalização tem participação direta sobre a formação tumoral, além de diversas moléculas da via já terem sido detectadas em alguns tumores odontogênicos (23,25–27).

Evidências recentes sugerem que TOQC origina-se a partir de células da lâmina dentária ou de seus remanescentes. Estudos tem demonstrado um papel importante da sinalização molecular da via Ptch na etiologia deste tumor (27). Li (28) reportou que mais de 85% dos casos relacionados à síndrome e 30% dos casos esporádicos apresentam uma mutação no *Ptch 1*, ao passo que Vered e colaboradores (29) relataram uma taxa de 54,5% e 32% respectivamente. Esse resultado mostra que nem todos os pacientes com TOQC esporádico ou relacionado à síndrome exibem a mutação do *Ptch1*, e que este é apenas um dos fatores ligados à patogênese do TOQC, ressaltando o fato de que muitos outros envolvimento genéticos ainda precisam ser estudados para tentar elucidar esse processo (3).

2.5 A VIA DE SINALIZAÇÃO SONIC HEDGEHOG (Shh)

A patogênese dos TOQCs ainda é intensamente estudada, devido à sua incerta regulação molecular. Sabe-se, entretanto, que a transformação e a proliferação neoplásicas de células, normalmente, envolve a desregulação de vias de sinalização que participam do desenvolvimento embrionário normal, como a via Sonic Hedgehog (30–33). A via de sinalização Shh é importante para a formação do tubo neural, esqueleto axial, sistema límbico, pulmão, pele, folículo piloso e dos dentes (34). Estudos já demonstraram que esta via tem importante papel na patogênese de tumores, como no câncer do trato gastrointestinal, de pâncreas e de próstata, especialmente por participar da ativação de programas relacionados à proliferação e sobrevivência celular e da manutenção e proliferação de células-tronco tumorais (33,35).

A ativação desta via ocorre pela interação do ligante Shh com o receptor transmembrânico Patched(Ptch). A proteína Ptch, ao ligar-se à Shh, libera a proteína transmembrana Smoothened (Smo) cuja atividade encontra-se previamente suprimida. Uma vez ativada, a proteína Smo altera o destino de proteínas citoplasmáticas da família Glioma-associated oncogene (Gli). As proteínas Gli1 e Gli2 migram então para o núcleo celular, onde atuam como um ativador dos genes alvo (*Shh*, *Ptch*, *Gli*), enquanto a proteína Gli3 age como inibidor. O supressor de proteínas fused (SUFU) também tem importante papel na patogênese da SCBCN ao ligar-se à proteína Gli no citoplasma e no núcleo prevenindo esta de ativar os genes alvo desta cascata (23,36) (Figura 2.1).

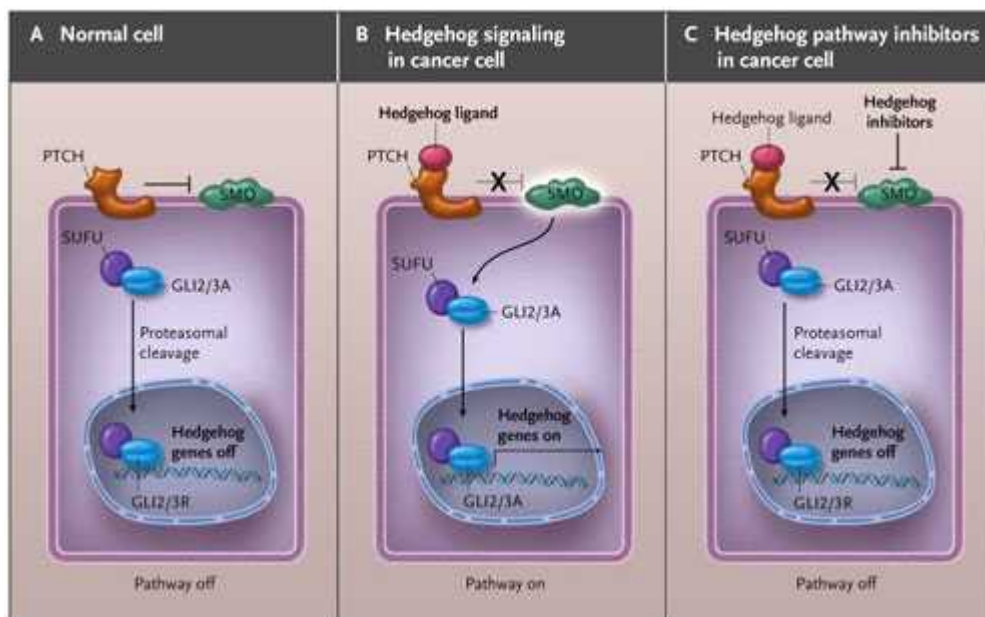


Figura 2.1 Representação esquemática da via de sinalização Sonic Hedgehog **A.** Em célula normal, o receptor de membrana Ptch liga-se e reprime ao receptor smoothened (Smo), bloqueando o sistema de sinalização de Hedgehog. O fator de transcrição da família Gli1, Gli2, Gli3, existe tanto na forma de ativador (A) como de repressor (R), a última incapaz de induzir a transcrição dos genes Hedgehog. Na ausência do ligando, Gli2A e Gli3A são unidos pelo supressor do inibidor hedgehog (SUFU) e são sometidos a excisão proteossomal pelas formas repressoras Gli2r e Gli3r. **B.** Em célula cancerígena, a união dos ligantes Hedgehog facilita a transdução de sinais **C.** O tratamento com inibidores da via restaura a repressão de Smo e controla a via Hedgehog aberrantemente ativada (37)

Estudos recentes têm demonstrado que a etiologia dos TOQCs tem relação com as alterações em *Ptch1*, cuja inativação pode ocorrer por diferentes processos: redução da dosagem genética por haploinsuficiência (perda de um alelo funcional), anulação dessa dosagem genética (uma segunda alteração age sobre a primeira e inativa os dois alelos) e o silenciamento do gene, em que uma hipermetilação no gene pode causar perda de função dos alelos sem perder a carga genética (alteração epigenética) (25,38,39).

2.6 TRATAMENTO

Não há um consenso sobre qual o melhor tratamento para o TOQC já que a decisão depende de múltiplos fatores como a localização e extensão da lesão, a idade do paciente entre outros. Diversas modalidades terapêuticas cirúrgicas são utilizadas na tentativa de eliminar as recorrências da lesão, que variam desde procedimentos conservadores como marsupialização, descompressão e enucleação cística a procedimentos agressivos como ressecções marginais e radicais. A vantagem das técnicas mais conservadoras é a preservação de estruturas anatômicas e menor taxa de morbidade (10,40,41).

Com o intuito de diminuir o índice de recidivas, foram propostas terapias adjuvantes associadas à enucleação como osteotomia periférica, crioterapia e solução de Carnoy. A osteotomia periférica ou curetagem óssea consiste no desgaste ou raspagem da loja óssea com instrumental rotatório ou cureta. A crioterapia promove morte celular nas margens ósseas por congelamento que devem ser inferiores a -20° C. E a aplicação da solução de Carnoy nas paredes ósseas promove necrose química com margem de segurança de até 1,5 mm. Cada 10 ml de solução de carnoy contém 6 ml de álcool absoluto, 3 ml de clorofórmio e 1 ml de ácido glacial acético, associados à 1 g de cloreto férrico (15,42,43).

As diferentes modalidades de tratamento mostram índices de recidiva variados. Zhao et al. (12) observaram recorrências em 17,79% de 163 TOQCs tratados somente por enucleação cística, 6,7% em 29 pacientes tratados por enucleação associada à aplicação de solução de Carnoy. Não foram observadas recorrências em 11 casos em que foram realizados marsupialização associada à posterior enucleação e em 52 casos que realizaram ressecção. O tempo de seguimento neste estudo variou de 3 a 29 anos. Zecha et al (44), demonstraram índice de recorrência de 20,7% em 58 pacientes tratados com enucleação e Boffano et al. (13) observaram recorrências de 11,9% em 261 tumores tratados por enucleação e curetagem.

Em 2010, Mendes e colaboradores (25) reuniram vinte e oito estudos que relatam a taxa de recorrência de TOQC de acordo com a terapêutica empregada, resultando em considerável variação, os critérios de inclusão foram baseados no diagnóstico histológico de TOQC, em uma descrição clara do tratamento e um período

de seguimento definido. Dentre os diferentes tipos de conduta, a enucleação apresentou maior taxa de recorrências em contraposição à ressecção, que teve a menor. De acordo com esse e outros trabalhos, três diferentes hipóteses podem justificara alta recorrência dessas lesões: através do crescimento de um novo tumor a partir de um pequeno cisto satélite ou de remanescentes epiteliais deixados pelo ato cirúrgico, pela remoção incompleta do TOQC ou ainda pelo desenvolvimento de um novo tumor adjacente à região do anterior, mas não relacionado a ele, sendo facilmente interpretado como recorrente (8,25,38,44).

Visto que a casuísta dos trabalhos é pouca, e que alguns não distinguem os TOQCs isolados dos associados à SCBCN e que a conduta cirúrgica varia muito de acordo com o profissional, o melhor tratamento e a correta taxa de recorrência permanecem incertos (45). Em teoria, qualquer antagonista de receptor ativo ou de fatores transcricionais da via de sinalização Hedgehog irá ser adequado para o tratamento de TOQC. Assim, baseados em evidências acerca das mutações genéticas, alguns pesquisadores tentam desenvolver ou descobrir inibidores de resposta celular ao sinal Hedgehog através do bloqueio das proteínas transmembrânicas Ptch e Smo (28,46). Dentre os diversos antagonistas específicos da via identificados, a ciclopamina foi avaliada em tratamentos de ratos com tumores dependentes do sinal da via Shh, causando regressão do tecido tumoral com pouco ou nenhum efeito tóxico nas células não-dependentes dessa via através do bloqueio específico da Smo. Além desse inibidor, pequenas moléculas chamadas Cur61414 e GDC0449 têm sido investigadas em carcinomas de células basais, um tumor com patogênese relacionada à mutação do *Ptch1* também, suprimindo a proliferação celular e induzindo a apoptose no carcinoma sem afetar as células normais da pele (28).

Outros autores sugerem a reintrodução da forma comum do *Ptch1* e uma injeção intracística de proteínas antagonistas à Smo que impeçam a sinalização dos fatores de transcrição como estratégias promissoras do tratamento do TOQC (28). Alguns ainda relatam os microRNAs (miRNA) como futuras abordagens moleculares, uma vez que se tratam de mediadores de expressão gênica em nível pós-transcricional, degradando ou reprimindo RNAs mensageiros. Dessa forma, a superexpressão de miRNAs oncogênicos pode reduzir produtos protéicos de genes supressores de tumor, enquanto a menor expressão de miRNAs supressores de tumor pode elevar a de proteínas oncogênicas. Apesar da expressão de miRNAs estar relacionada com importantes

eventos em neoplasias humanas, ainda não foi relatada nenhuma evidência sobre sua atividade na patogênese de cistos ou tumores odontogênicos (39).

Embora estejam surgindo diversas linhas de pesquisa acerca de tratamentos moleculares do TOQC, ainda não há um parâmetro certo que avalie a real influência de determinado tratamento sobre a evolução do quadro em recorrências e talvez malignizações do TOQC. Espera-se que em breve seja possível remover o tumor de maneira conservadora através da terapia molecular e, ainda desenvolver métodos preventivos em casos de recorrência e associação com a SCBCN, melhorando a qualidade de vida desses pacientes.

2.7 RECORRÊNCIA

O TOQC é considerado como um dos tumores odontogênicos mais agressivos, principalmente por apresentar altas taxas de recorrência e tendência a invadir tecidos adjacentes. A recorrência pode ser justificada pela alta atividade mitótica epitelial, cistos satélites, restos epiteliais na cápsula cística e epitélio mais calibroso do que encontrado em outros cistos odontogênicos (11,47).

A completa remoção do TOQC é geralmente complicada, devido à natureza friável e à espessura fina da cápsula que envolve a lesão. Ao contrário de outros cistos odontogênicos, os TOQCs tendem a recorrer após tratamento, não sendo possível determinar com certeza se é devido a presença de fragmentos do cisto que não foram removidos completamente no momento da cirurgia ou a um novo cisto que se desenvolveu de remanescentes da lâmina dentária no local do cisto. A recorrência é mais frequente na mandíbula, principalmente na região posterior e no ramo ascendente (48).

A literatura mostra altas discrepâncias quanto ao índice de recorrências dos TOQC, variando de 22% a 60% (22,38). Isto pode ser justificado devido às variações no período de seguimento, a técnica cirúrgica empregada, localização e ao tamanho do tumor, à presença ou ausência de infecção, associação com dentes, ao envolvimento da mucosa e número de casos analisados nos estudos (22,40,49). A maioria dos casos de TOQC apresenta recorrências nos primeiros 2 anos após a remoção da lesão (50),

embora existam outros relatos onde se citem casos em que as recorrências ocorreram 5 a 7 anos após o tratamento. Estes achados enfatizam a importância de um longo período de acompanhamento no planejamento terapêutico (41–43,51).

2.8 SÍNDROME DO CARCINOMA BASOCELULAR NEVOIDE (SCBCN) OU SÍNDROME DE GORLIN-GOLTZ

A SCBCN é uma doença rara, hereditária autossômica dominante, com alta penetrância e expressividade variável, com características bem definidas, caracterizadas por Gorlin e Goltz (52). Ocorre devido a uma alteração genética produzida no *Patched* (*Ptch*), um gene supressor de tumor mapeado no cromossomo 9q22.3-q31. A síndrome apresenta-se em todos os grupos étnicos e afeta tanto a homens como a mulheres, manifestando-se na primeira, segunda ou terceira décadas de vida (30,53,54).

As manifestações clínicas da SCBCN são extremamente variadas, sendo as mais comuns os carcinomas basocelulares (CBCs), os TOQCs, a macrocefalia e as depressões palmares e/ou plantares (54).

Os CBCs, manifestam-se clinicamente entre a puberdade e os 35 anos de idade (54). Variam em número desde alguns poucos a centenas, ocorrendo em qualquer área do corpo, principalmente na pele exposta à luz solar. Qualquer tipo clínico pode estar presente, assim como ulceração, entretanto processo invasivos e evolução para metástase são raros (53,54). Compromete principalmente as superfícies epiteliais torácicas e cervico-faciais, sendo as áreas periorbitais, pálpebras, nariz, região malar e lábio superior as áreas faciais mais afetadas. Outras alterações cutâneas também podem ser encontradas, como cistos sebáceos e “pits” palmares e/ou plantares que se desenvolvem na segunda década da vida e aumentam em número com a idade (54).

Também frequentes são os TOQCs, que podem ser as primeiras características da síndrome, geralmente são múltiplos e afetam a maxila ou a mandíbula, surgem durante a primeira década de vida e acometem até 75% dos pacientes (54), tendo maior tendência à recorrência. O aparecimento de novos tumores é comum até os 30 anos de idade (55,56).

Na literatura, têm sido relatadas algumas diferenças entre os TOQCs associados à SCBCN e TOQCs esporádicos. Microscopicamente, os TOQCs sindrômicos tendem a ter mais cistos-satélites, ilhas sólidas de proliferação epitelial e restos de epitélio odontogênico na cápsula fibrosa do que os não sindrômicos. Os TOQCs associados à síndrome têm maior potencial de crescimento, capacidade de infiltração e tendência a desenvolver mais recorrências se comparados aos TOQCs esporádicos(17,25,38). Clinicamente os TOQCs poder se apresentar na maxila ou na mandíbula, a diferença dos esporádicos que são mais frequentes na mandíbula. Assim mesmo os TOQCs sindrômicos são presentes na maioria dos casos na primeira década de vida a diferença dos esporádicos que se apresentam com maior frequência entre a 2^{da} e a 3^{ra} décadas da vida (38).

Calcificações ectópicas do sistema nervoso central também podem ocorrer, a calcificação da foice e da tenda do cerebelo, além da ponte em sela túrcica são alterações que não resultam em nenhuma manifestação clínica, mas podem ser úteis para confirmar o diagnóstico (56). As anomalias esqueléticas estão presentes em quase 70% dos pacientes, a mais comum é a costela bífida, fusionada ou alargada. Alterações vertebrais também podem ser observadas e surgem em até 31% dos pacientes e incluem espinha bífida oculta, cifoesciose, defeitos de fusão, hemivértebra, além da deformidade de Sprengel, que é a elevação da escápula com rotação em direção à coluna com escoliose (57). Facies típicas, com fronte alta e larga, saliência frontal e parietal e aumento da circunferência da cabeça também podem ocorrer, o alargamento da base do nariz é comum e pode estar associado com hipertelorismo ocular, a maxila pode ser hipoplásica e pode haver hiperplasia mandibular com variável prognatismo. Outras anomalias menos comuns incluem palato ogival, fissura de lábio palatino, má oclusão, impacção e agenesia dentária. Também raro, mas pode ocorrer sindactilia e polidactilia (30,54).

Outra manifestação menos usual, mas importante devido à causa precoce potencial de morte, é o meduloblastoma, tumor maligno da fossa posterior, está presente em até 10% do pacientes sendo geralmente diagnosticado em crianças com idade média de cinco anos (53,58). O tratamento requer terapia intensiva multidisciplinar. Os melhores resultados provêm do tratamento com ressecção agressiva, quimioterapia e radioterapia. No entanto, o uso de radioterapia pode ser discutível devido à sensibilidade dos pacientes para desenvolverem centenas de carcinomas basocelulares (58,59).

Com o fim de facilitar o diagnóstico da SCBCN, Bree et al (60), fizeram um consenso onde separaram critérios maiores e menores, assim o diagnóstico para a síndrome deve ser feita com a presença de um critério maior e confirmação molecular, ou dois critérios maiores, ou um critério maior e dois menores como mostrado abaixo (60).

- Critérios maiores: manifestação de CBCs antes dos 20 anos de idade, de TOQC antes dos 20 anos de idade, presença de depressões palmares e/ou plantares, calcificação da foice cerebral, meduloblastoma (desmoplásico) e parente de primeiro grau com SCBCN.

- Critérios menores: anormalidades em costelas, outras malformações esqueléticas específicas (anomalias vertebrais, cifoescioses, polidactilia), macrocefalia, fenda palatina ou labial, fibromas de ovário ou cardíaco, cistos linfomesentéricos, anormalidades oculares (estrabismo, hipertelorismo, cataratas congênitas, glaucomas).

Devido ao seu frequente envolvimento com a patogênese do tumor, os testes genéticos para a detecção de mutações no gene *Ptch1* são realizados nos seguintes casos: testes pré-natais se houver conhecimento de alguma mutação familiar; diagnóstico confirmatório em pacientes com alguns sinais clínicos, mas não suficientes para conclusão de diagnóstico; ou testes de predição para pacientes que possuem um membro da família afetado e que está em risco, mas que não cumpre os critérios diagnósticos.

Uma vez realizado o diagnóstico de SCBCN, é importante conhecer o protocolo de conduta, a fim de limitar a morbidade e mortalidade nos pacientes afetados pela síndrome. O protocolo de conduta em pacientes pediátricos inclui: ressonância magnética do cérebro com contraste, ultrassom cardíaco, exame dermatológico uma vez ao ano ou a cada 6 meses após o diagnóstico do primeiro CBC, radiografia panorâmica uma vez ao ano, avaliação rotineira de desenvolvimento e oftalmológica (60). Já em pacientes adultos, o protocolo de conduta baseia-se em ressonância magnética do cérebro com contraste, acompanhamento dermatológico a cada 4 meses, radiografia panorâmica uma vez ao ano, aconselhamento genético para casais de risco (pré-concepção e pré-natal), avaliação neurológica anual em caso de diagnóstico de meduloblastoma, avaliação obstétrico-ginecológica a cada ano para pacientes mulheres (60).

Abaixo seguem as possíveis manifestações clínicas encontradas em pacientes portadores da SCBCN:(54)

- Pele: Depressões palmo plantares (30-85%), múltiplos CBCs (30-90%), cistos Dermoides (50%).

- Sistema estomatognático: TOQCs, dentes ectópicos, heterotópicos, dentes impactados, agenesia dental, maloclusão, ameloblastoma, mixoma odontogênico, carcinoma de células fusiformes, fendas palatinas ou labiais (5%), carcinoma de células escamosas, mordida aberta, pseudocistos idiopáticos, hiperplasia do processo coronoide.

- Sistema esquelético e muscular: Anomalias congênicas: costelas bífidas, fusionadas, alargadas ou ausentes (30-60%), vértebras fusionadas ou bífidas, escoliose, frontal (25%), bossa temporal e parietal, polidactilia, sindactilia, quarto metacarpo curto, ombro de Sprengel (escápula alta e hipoplásica), cistos ósseos.

- Sistema gênito-urinário: Homens: hipogonadismo (5-10%), criptorquidia. Mulheres: calcificações no ovário, cistos no ovário (25-50%), fibroma no ovário.

- Sistema respiratório: Cistos broncogênicos, doença da membrana hialina.

- Sistema gastro-entenal: Cistos linfomesentéricos, pólipos gástricos.

- Sistema nervoso central: Calcificações ectópicas: calcificação da foice cerebral (70-85%), tentorium cerebella (20-40%), calcificações meníngeas, calcificação da sela túrcica (25%), meningioma, meduloblastoma, glioblastoma multiforme, atraso mental moderado (5%), epilepsia, hidrocefalia congênita, corea de Huntington.

- Sistema ocular: Catarata, coloboma, microftalmia, chalazions (Cistos na pálpebra), estrabismo, nistagmo rotatório, exoftalmia, hipertelorismo (70%), cegueira congênita.

- Sistema cardio-vascular: Fibroma cardíaco, ausência da artéria carótida interna.

- Sistema auditivo: Otosclerose, perda do conduto auditivo, orelhas anguladas.

O diagnóstico da SCBCN é baseado na história familiar, exame intra-oral, exame da pele, radiografias de tórax e crânio, radiografia panorâmica dos maxilares, ressonância magnética do cérebro e ultrasonografia pélvica em mulheres (61).

O manejo da síndrome de Gorlin deve ser feito por equipe multidisciplinar, devido ao comprometimento de vários órgãos. O diagnóstico precoce da síndrome deve

ser realizado para que terapias menos agressivas sejam adotadas. O meduloblastoma tem remoção cirúrgica facilitada quando seu diagnóstico ocorre numa fase inicial. O acompanhamento dental frequente se faz relevante devido aos TOQCs e cabe ao dermatologista detectar as lesões cutâneas indicando a melhor forma de abordagem. A investigação e avaliação de todos os irmãos e filhos do paciente são importantes para que tomem conhecimento dos prováveis riscos hereditários da desordem (53,54).

3 PROPOSIÇÃO

-) Avaliar a expressão imunohistoquímica das proteínas da via de sinalização Sonic Hedgehog (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2, Gli3) em TOQCs associados ou não à SCBCN, com o fim de entender melhor a biologia e patogêneses deste tumor.
-) Proporcionar ferramentas para o profissional, na hora de fazer um diagnóstico precoce nos casos onde outras manifestações da SCBCN ainda não são evidentes.
-) Comparar a expressão das proteínas da via de sinalização Shh nos TOQCs recorrentes e não recorrentes, com o fim de ajudar a prever o risco de recorrência e agressividade destas lesões.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 CONSTITUIÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados através dos resultados anátomo-patológicos do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Câncer Center 118 TOQCs que correspondiam a 78 pacientes. Destes 13 foram excluídos, um por ser externo à Instituição, 3 por indisponibilidade de prontuários e 9 por não apresentar material em parafina suficiente para realização das reações imunohistoquímicas. Com isso, a amostra foi constituída por 62 pacientes e 86 TOQCs.

Os pacientes foram classificados em dois grupos: Grupo 1, composto por 49 pacientes (57 TOQCs). Grupo 2, composto por 13 pacientes que apresentavam SCBCN (29 TOQCs).(60).

Foram considerados tumores recorrentes, quando a lesão ocorria na mesma região de um tumor previamente tratado. Dos 86 tumores, 52 eram TOQCs primários (38 do Grupo 1 / 14do Grupo 2), e 34, lesões recorrentes (19 do Grupo 1 / 15 do Grupo 2).

4.2 METODOLOGIA

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do AC Camargo Câncer Center, São Paulo, conforme registro 1322/09.

Trata-se de um estudo retrospectivo onde foram avaliados pacientes com o diagnóstico de TOQC atendidos no AC Camargo Câncer center no período entre 1970 e 2009. Os dados clínicos dos pacientes incluindo idade, gênero, recorrência e associação

com a síndrome SCBCN, foram obtidos a partir dos prontuários médicos localizados no Serviço de Arquivo Médico (SAME).

4.3 TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA

Para a realização das reações imunoistoquímicas, foram selecionados os blocos em parafina mais representativos de cada caso. As reações foram padronizadas para cada anticorpo para estabelecer a diluição e método de recuperação antigênica adequados.

Foi utilizada a técnica da biotina-estreptavidina e os cortes submetidos aos anticorpos Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2, Gli3, separadamente. Cortes de 3 μ m de espessura do material incluído em parafina foram estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com solução de 3-aminopropiltrióxido (Sigma St. Louis, MO, USA) 10% em etanol absoluto. Em seguida, permaneceram por 24 horas em estufa a 60°C. Foram desparafinizados em xilol a 60°C por 20 minutos e à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida passados em etanol nas concentrações de 100%, 85% e 70%, 30 segundos cada troca. Posteriormente os cortes foram passados em água corrente e água destilada. Após a lavagem, as lâminas com os anticorpos Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli3, receberam o tratamento para recuperação antigênica com ácido cítrico pH 6,0 e Gli2 com solução Tris –EDTA pH 9.0 em panela de pressão (Solar, Rapid Express, Tramontina®) destampada, mergulhando as lâminas e lacrando a panela com a válvula seletora de pressão no número 2. Após a pressurização total, as lâminas foram mantidas por 4 minutos.

Ao final do tratamento para recuperação antigênica, os cortes foram lavados em água corrente, durante 10 minutos, passados por água destilada e foram para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, realizada pela incubação em 3 trocas de 10 minutos cada e em seguida as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada. Posteriormente lavadas com solução salina tamponada com fosfatos (PBS-phosphate buffered saline) 10mM pH7.4 por 5 minutos. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em títulos pré-estabelecidos em tampão PBS contendo

albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1% por 30 minutos a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida. Em seguida, as lâminas foram lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada. Para amplificação das reações, as lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37°C com Post Primary Block (Novolink Polymer cod #RE7260-k, Reino Unido) e lavadas com 3 trocas de 3 minutos cada em tampão PBS. A seguir, as lâminas foram incubadas com o Novolink Polymer por 30 minutos a 37°C e lavadas em tampão com 3 trocas de 3 minutos cada.

A revelação das lâminas foi realizada com solução substrato: 100mg 3,3' Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, D-5637, EUA); 1mL de Dimetilsulfóxido (DMSO); 1 ml de H_2O_2 6% (água oxigenada 20 volumes); 100 mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e destilada por 3 minutos.

A contra-coloração foi realizada com Hematoxilina de Harris por 30 segundos e lavadas em água corrente e destilada. Em seguida, procedeu-se duas vezes a imersão das lâminas em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio 0,5%) e lavadas, em seguida, em água corrente e destilada. A desidratação das lâminas foi realizada em etanol nas concentrações 80% por 1 minuto e 100% por 1 minuto, em xilol por 2 minutos. A montagem das lâminas foi realizada em Entellan neu (Merk, 1.07961, Alemanha). Para todos os anticorpos testados foram realizadas lâminas controle da reação. Como controle positivo foi utilizado um tecido sabidamente com expressão da proteína a ser pesquisada. Para o controle negativo, foi realizada a omissão do anticorpo primário. (Tabela 4.1).

Anticorpo	Clone	Diluição	Origem
Shh	Monoclonal	1:100	Abcam, Cambridge, MA, EUA
Ptch1	Policlonal	1:400	Abcam, Cambridge, MA, EUA
Ptch2	Policlonal	1:300	Lifespan, Seattle, Washington, EUA
Smo	Policlonal	1:100	Abcam, Cambridge, MA, EUA
Gli1	Policlonal	1:500	Thermo Scientific, Rockford, IL, EUA
Gli2	Policlonal	1:200	Abcam, Cambridge, MA, EUA
Gli3	Policlonal	1:50	Sigma, St. Louis, EUA

Tabela 4.1: Anticorpos primários e seus respectivos clones, diluição e origem utilizados no estudo.

4.4 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

A avaliação imunoistoquímica foi realizada por 2 observadores previamente calibrados. Para análise das proteínas da via de sinalização Shh em TOQCs foi utilizado o microscópio de luz (Olympus) com aumento final de 400x, sob um foco fixo e clareza de campo. Desta forma, 5 campos aleatórios representativos de TOQC foram selecionados. A análise foi semi-quantitativa, avaliando critérios como negatividade, positividade e localização da marcação. A intensidade não foi considerada.

A análise foi realizada apenas nas células do epitélio dos TOQC divididos em 2 grupos: Camada basal e suprabasal e a expressão das proteínas se nuclear, citoplasmática ou ambas. A expressão das proteínas foi considerada como positiva ou negativa para os marcadores, sendo obedecida uma graduação para a análise da quantidade das células marcadas determinadas a seguir:(29)

- 0: Negativo;
- 1: de 1 a 10% de células positivas;
- 2: de 11 a 50% de células positivas;
- 3: mais de 50% de células positivas

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram construídas as respectivas tabelas com as distribuições de frequências, tanto para os dados clínicos dos pacientes quanto para os dados imunoistoquímicos das lesões.

Para verificar a correlação entre a expressão das proteínas Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2 e Gli3 e a ocorrência ou não de síndrome bem como a presença ou ausência de recorrência, foi utilizado o teste Qui-Quadrado de Pearson. Nos casos em que as frequências esperadas foram menores do que 5, foi aplicado o teste Exato de Fisher. Para análise estatística dos dados foi usado o software GraphPad Prism 5

(GraphPad software Inc, La Jolla, Ca, EUA) e valores de significância estatística menores que 0,05 foram considerados como diferença significativa ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS 62 PACIENTES

A idade dos 62 pacientes variou de 8 a 74 anos, com média de 35,37 anos ($\pm 18,81$ anos, mediana de 31,5 anos). No grupo de pacientes não sindrômicos (Grupo 1) a idade média foi de 37,18 ($\pm 18,90$) anos em um intervalo entre 9 e 74 anos (mediana 34 anos). Houve predominância dos tumores na 3^o década da vida. No grupo de pacientes sindrômicos (Grupo 2) a idade média foi de 28,53 ($\pm 17,50$) anos em um intervalo de idade de 8 a 66 anos (mediana 26 anos), com predominância dos tumores na 2^o década da vida. (Tabela 5.1).

Ao categorizar a variável idade pela mediana nos dois Grupos (31 anos), não foi observada diferença estatística significativa ($p=0,53$) entre idade e a presença de síndrome.

Faixa Etária	Grupo 1		Grupo 2	
	n	%	n	%
0-9	1	2,04	1	7,69
10-19	8	16,32	4	30,76
20-29	13	26,53	3	23,07
30-39	8	16,32	3	23,07
40-49	5	10,20	-	-
50-59	5	10,20	1	7,69
60-69	6	12,24	1	7,69
70	3	6,12	-	-
TOTAL	49	100	13	100

Tabela 5.1: Faixa etária distribuída em classes de 10 anos.

O sexo feminino predominou em ambos os grupos 1 e 2. No Grupo 1 53,06% dos pacientes eram do sexo feminino e no Grupo 2 69,3%. Com respeito a etnia predominaram os pacientes leucodermas, em ambos os grupos. Grupo 1 (85,71%) e Grupo 2 (92,3%). Não foi observada correlação estatística significativa entre os grupos nas variáveis sexo e etnia (Sexo $p=0.35$ / Etnia $p=1.00$) (Tabela 5.2).

Variáveis	Categoria	Grupo 1		Grupo 2		Valor de significância
		n	%	n	%	
Sexo	Feminino	26	53,06	9	69,23	$p = 0,35$
	Masculino	23	46,93	4	30,76	
Etnia	Leucoderma	42	85,71	12	92,3	$p = 1,00$
	Melanoderma	7	14,28	1	7,69	

Tabela 5.2: Variáveis clínicas sexo e etnia

Dos 86 TOQCs, 52 foram primários (60,4%) e 34 recorrentes (39,5%). Do grupo de lesões recorrentes, 19 TOQCs (33,3%) pertencem ao Grupo 1, e 15 (51,7%), ao Grupo 2 (Tabela 5.3). A porcentagem de recorrência foi maior nos tumores de pacientes que apresentaram a SCBCN quando comparados com os tumores esporádicos, porém não foi observada diferença estatística significativa entre os grupos 1 e 2 dos TOQCs recorrentes ($p=0,10$).

VARIÁVEL	GRUPO 1		GRUPO 2	
	n	%	n	%
Tumores recorrentes	19	33,3	15	51,7
Tumores primários	38	66,6	14	48,2
Total	57	100	29	100

Tabela 5.3: Número de tumores recorrentes e primários com relação aos grupos esporádicos (1) e sindrômicos (2), totalizando 86 TOQCs

5.2 AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

A reações imunoistoquímicas para as proteínas Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2 e Gli3 foram realizadas nas 86 lesões e a expressão de cada marcador foi correlacionado com a presença ou ausência da SCBCN (Tabela 5.4).

Expressão da proteína Shh

A expressão nuclear da proteína Shh foi score 1 em 100% das células, nas camadas basal e suprabasal em ambos os grupos. Contudo, a expressão citoplásmica foi intermediária (score 2), sendo estatisticamente significativa na camada basal dos tumores do grupo 2 ($p=0,03$). (Figura 5.1 A, B).

Expressão das proteínas Ptch1 e Ptch2

As proteínas Ptch1 e Ptch2 apresentaram maior porcentagem de células com expressão nuclear e citoplasmática dentro do score 3, em ambos os grupos e em ambas as camadas (Figura 5.1 C à F). Não foi observada diferença estatística significativa entre a expressão das proteínas e os grupos.

Expressão da proteína Smo

Esta proteína apresentou discreta expressão nuclear e citoplasmática (score 1) na maioria dos casos dos grupos 1 e 2, em ambas as camadas (Figura 5.1 G, H). A expressão nuclear foi maior no grupo 2 na camada basal ($p=0,01$) e na suprabasal ($p=0,02$). A expressão citoplasmática, também foi maior no grupo 2, sendo estatisticamente significativa na camada basal ($p=0,03$).

Expressão das proteínas Gli1, Gli2 e Gli3

A expressão nuclear e citoplasmática da proteína Gli1, foi mais expressa nos tumores do grupo 2 (score 2-3), nas camadas basal e suprabasal.

A proteína Gli1, mostrou diferença estatística significativa, na expressão da marcação do citoplasma na camada suprabasal dos tumores síndrômicos, quando comparada com os tumores esporádicos ($p=0,03$).

Já a expressão nuclear e citoplasmática de Gli2 foi forte (score 3) em ambas as camadas e em ambos os grupos. A proteína Gli3 apresentou fraca expressão (score 1) em ambos os grupos e camadas (Figura 5.1 I à N)..

PROTEÍNA	SCORE	BASAL										SUPRABASAL									
		NÚCLEO					CITOPLASMA					NÚCLEO					CITOPLASMA				
		Grupo 1		Grupo 2		P	Grupo 1		Grupo 2		P	Grupo 1		Grupo 2		P	Grupo 1		Grupo 2		P
(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)		(n)	(%)	(n)	(%)		(n)	(%)	(n)	(%)		(n)	(%)	(n)	(%)	
Shh	1	57	100	29	100	NA	20	35.0	4	13.8	0.03	57	100	29	100	NA	22	38.6	7	26.9	0.10
	2	0	0	0	0		37	64.9	25	86.2		0	0	0	0		35	61.4	22	75.8	
	3	0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0	
Ptch1	1	13	22.8	7	24.1	0.92	18	31.6	7	26.9	0.38	13	22.8	7	26.9	0.45	21	36.8	7	26.9	0.23*
	2	3	5.2	1	3.4		3	5.2	0	0		3	5.2	0	0		0	0	0	0	
	3	41	71.9	21	72.4		36	63.1	22	75.8		41	71.9	22	75.8		36	63.1	22	75.8	
Ptch2	1	19	33.3	6	20.7	0.45	19	33.3	6	20.7	0.34	5	8.7	2	6.9	0.45	7	12.3	2	6.9	0.51
	2	6	10.5	3	10.3		6	10.5	2	6.9		9	15.8	2	6.9		7	12.3	2	6.9	
	3	32	56.1	20	68.96		32	56.1	21	72.4		43	75.4	25	86.2		43	75.4	25	86.2	
Smo	1	48	84.2	17	58.6	0.01	45	78.9	17	58.6	0.03	47	82.4	16	55.2	0.02	44	77.1	16	55.2	0.09
	2	6	10.5	5	17.2		9	15.8	5	17.2		6	10.5	8	27.5		9	15.8	8	27.6	
	3	3	5.2	7	24.1		3	5.2	7	24.1		4	7.0	5	17.2		4	7.0	5	17.2	
Gli1	1	30	52.6	10	34.4	0.25	27	47.4	10	34.4	0.38	23	40.3	7	24.1	0.10	25	43.8	6	20.7	0.03
	2	13	22.8	8	27.6		16	28.0	8	27.6		25	43.8	12	41.4		23	40.3	12	41.4	
	3	14	24.5	11	37.9		14	24.5	11	37.9		9	15.8	10	34.4		9	15.8	11	37.9	
Gli2	1	24	42.1	10	34.4	0.69	22	38.6	10	34.4	0.38	2	3.5	2	6.8	0.63	0	0	1	3.4	0.15*
	2	3	5.2	1	3.4		3	5.2	0	0		4	7.0	1	3.4		0	0	0	0	
	3	30	52.6	18	62.1		32	56.1	19	65.5		51	89.4	26	89.7		57	100	28	96.5	
Gli3	1	52	91.2	23	79.3	0.25	50	87.7	22	75.8	0.16	49	85.9	22	75.8	0.36	48	84.2	22	75.8	0.20
	2	4	7.0	4	13.8		6	10.5	4	13.8		7	12.3	5	17.2		0	14.0	4	13.8	
	3	1	1.7	2	6.9		1	1.7	3	10.3		1	1.7	2	6.9		1	1.7	3	10.3	

Tabela 5.4-Análise semi-quantitativa das proteínas da via de sinalização Shh no Grupo1 e Grupo 2. *As frequências esperadas para as proteínas Ptch1 e Gli2 foram inferiores a 5, portanto, o teste exato de Fisher foi aplicado e os valores de pontuação foram agrupados em 1 e 2 + 3.

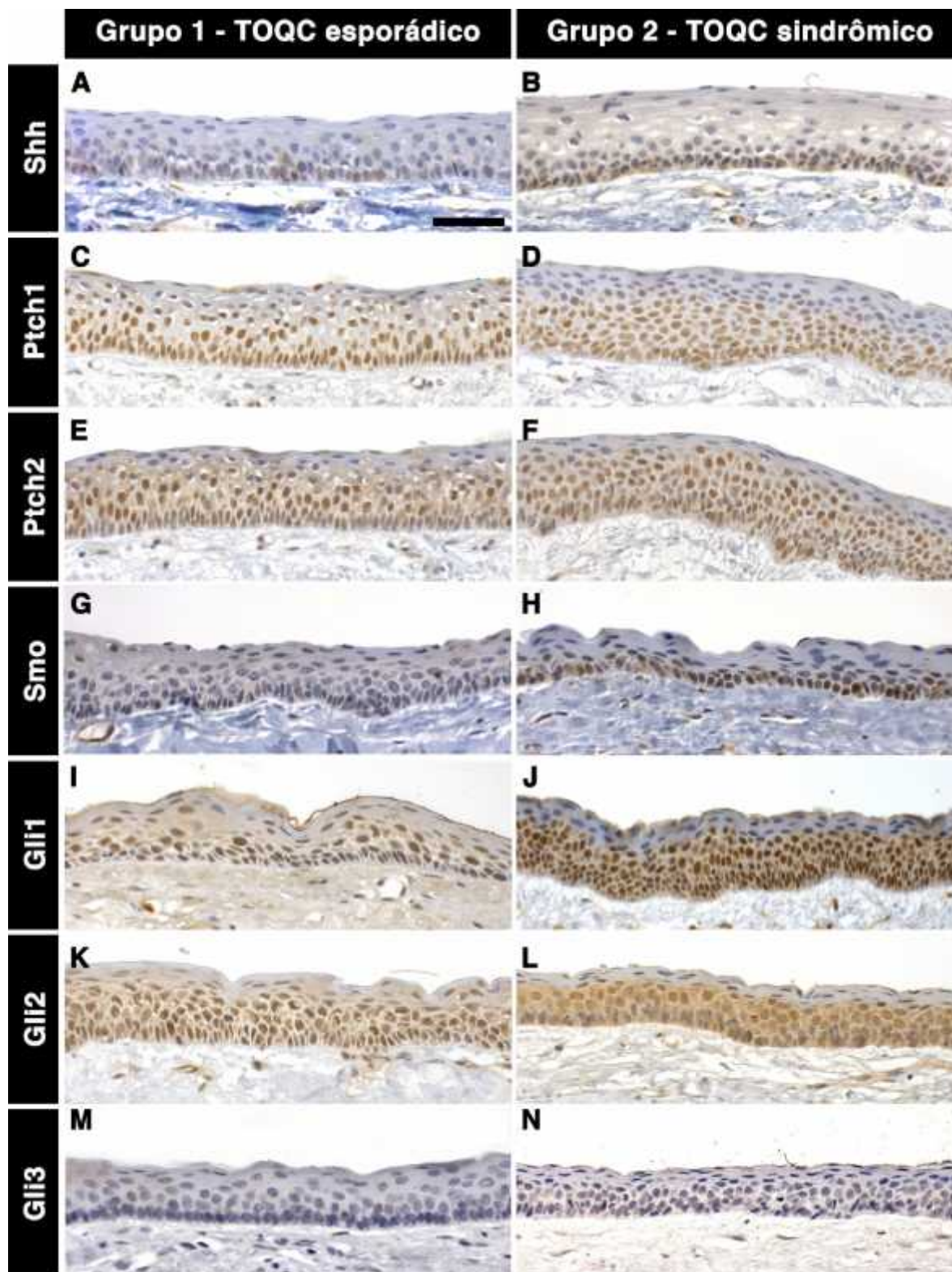


Figura 5.1: Expressão das proteínas da via de sinalização Shh em TOQCs esporádicos e associados com SCBCN

Expressão das proteínas nos tumores recorrentes e não-recorrentes do grupo 1

A totalidade dos tumores (recorrentes e não recorrentes), apresentaram expressão nuclear da proteína Shh score 1, a diferença da expressão citoplasmática onde a maioria dos casos apresentaram score 2 nas camadas basal e suprabasal.

As proteínas Ptch1 e Ptch2 apresentaram marcada expressão nuclear e citoplasmática (score 3) em ambas as camadas, sendo que a expressão citoplasmática do **Ptch1** nas lesões recorrentes, foi mais expressa dentro das camadas basal e suprabasal respectivamente ($p=0,01$ / $p=0,00$). (Figura 5.2 A, B).

Smo teve pouca marcação nuclear e citoplasmática (score 1), em ambas as camadas e em ambas as lesões. A expressão nuclear desta proteína, na camada basal dos tumores não recorrentes, apresentou diferença estatística significativa ($p=0,04$).

A expressão nuclear e citoplasmática da proteína **Gli1**, é mais evidente nos tumores recorrentes, quando comparada com os tumores não recorrentes. A expressão desta proteína no citoplasma da camada suprabasal, foi mais expressa nas lesões recorrentes ($p=0,00$) (Figura 5.2 C,D)

Gli 2 apresentou maior expressão nuclear e citoplasmática (score 3), na camada basal dos tumores recorrentes, sendo estatisticamente significativa ($p=0,00$ / $p=0,01$) (Figura 5.2 E,F), a diferença dos tumores não recorrentes que apresentaram fraca expressão. Já na camada suprabasal ambos os tumores expressaram marcação score 3 tanto no núcleo quanto no citoplasma, sem diferenças estatísticas significantes.

A expressão nuclear e citoplasmática da proteína Gli3, mostrou na maioria dos casos marcação score 1, tanto na camada basal quanto na suprabasal em ambos os tumores, sendo que os tumores não recorrentes, tem pouca expressão desta proteína e mostraram diferença estatística significativa no núcleo e no citoplasma, de ambas as camadas, quando comparados com lesões recorrentes (Tabela 5.5) (Figura 5.2).

Expressão das proteínas nos tumores recorrentes e não recorrentes do grupo 2

A expressão nuclear da proteína Shh, foi fraca (score 1) em 100% dos casos, tanto na camada basal, quanto na suprabasal de ambos os tumores. Já a expressão citoplasmática, foi intermediária (score 2).

As proteínas Ptch1 e Ptch2, expressaram marcação nuclear e citoplasmática forte (score 3) na maioria dos casos recorrentes e não recorrentes, sem diferença estatística significativa.

Smo mostrou marcação nuclear e citoplasmática fraca (score 1), na maioria dos casos, em ambas as lesões. No citoplasma da camada suprabasal, esta proteína, apresentou diferença estatística significativa nos tumores recorrentes ($p=0,02$).

A marcação nuclear e citoplasmática da proteína **Gli1** foi mais expressa nos tumores recorrentes (score 3), quando comparada com os tumores não recorrentes (score 2) em ambas as camadas. Esta proteína apresentou diferença estatística significativa, na marcação tanto nuclear quanto citoplasmática, nos tumores recorrentes (Figura 5.2 G,H)

A proteínas Gli2, mostrou expressão nuclear e citoplasmática forte (score 3) nos tumores recorrentes, em ambas as camadas, já os tumores não recorrentes apresentaram marcação fraca (score 1) na maioria dos casos da camada basal e forte (score 3) na suprabasal.

A expressão nuclear e citoplasmática da proteína Gli3 foi fraca (score 1), em ambos os tumores e em ambas as camadas, sem apresentar diferença estatística significativa. (Tabela 5.6).

PROTEÍNA	SCORE	BASAL										SUPRABASAL									
		NÚCLEO					CITOPLASMA					NÚCLEO					CITOPLASMA				
		R (n)	(%)	NR (n)	(%)	P	R (n)	(%)	NR (n)	(%)	P	R (n)	(%)	NR (n)	(%)	P	R (n)	(%)	NR (n)	(%)	P
<i>Shh</i>	1	19	100	38	100	NA	4	21	16	42.1	0.14	19	100	38	100	NA	4	21.0	18	47.3	0.08
	2	0	0	0	0		15	78.9	22	57.9		0	0	0	0		15	78.9	20	52.6	
	3	0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0	
<i>Ptch1</i>	1	3	15.8	10	26.3	0.50	2	10.5	16	42.1	0.01	3	15.8	10	26.3	0.50	2	10.5	19	50	0.00
	2	0	0	3	7.9		0	0	3	7.9		0	0	3	7.9		0	0	1	2.6	
	3	16	84.2	25	65.7		17	89.4	19	50		16	84.2	25	65.7		17	89.5	18	47.3	
<i>Ptch2</i>	1	5	26.3	14	36.8	0.17	5	26.3	14	36.8	0.17	2	10.5	3	7.9	0.72	3	15.8	4	10.5	0.22
	2	4	21.0	2	5.2		4	21.0	2	5.2		2	10.5	7	18.4		1	5.2	6	15.8	
	3	10	52.6	22	57.9		10	52.6	22	57.9		15	78.9	28	73.6		15	78.9	28	73.6	
<i>Smo</i>	1	13	68.4	35	92.1	0.04	12	63.1	33	86.8	0.08	13	68.4	34	89.4	0.10	12	63.1	32	84.2	0.11
	2	3	15.8	3	7.9		4	21.0	5	13.1		3	15.8	3	7.9		4	21.0	5	13.1	
	3	3	15.8	0	0		3	15.8	0	0		3	15.8	1	2.6		3	15.8	1	2.6	
<i>Gli1</i>	1	6	31.6	24	63.1	0.06	5	26.3	22	57.9	0.07	4	21.0	19	50	0.11	3	15.8	22	57.9	0.00
	2	7	36.8	6	15.8		8	42.1	8	21.0		11	57.9	14	36.8		12	63.1	11	28.9	
	3	6	31.6	8	21.0		6	31.6	8	21.0		4	21.0	5	13.1		4	21.0	5	13.1	
<i>Gli2</i>	1	3	15.8	21	55.2	0.00	3	15.8	19	50	0.01	1	5.2	1	2.6	1.00	0	0	0	0	1.00
	2	1	5.2	2	5.2		0	0	3	7.9		1	5.2	3	7.9		2	10.5	5	13.1	
	3	15	78.9	15	39.5		16	84.2	16	42.1		17	89.5	34	89.4		17	89.5	33	86.8	
<i>Gli3</i>	1	15	78.9	37	97.3	0.03	14	73.7	36	94.7	0.04	13	68.4	36	94.7	0.03	13	68.4	35	92.1	0.04
	2	3	15.8	1	2.6		4	21.0	2	5.2		5	26.3	2	5.2		5	26.3	3	7.9	
	3	1	5.2	0	0		1	5.2	0	0		1	5.2	0	0		1	5.2	0	0	

Tabela 5.5-Análise semi-quantitativa das proteínas da via de sinalização Shh em TOQCs esporádicos, comparando lesões recorrentes (R) e não-recorrentes (NR). Score 1=0-10%, 2= 11-50%, 3= >50% de células positivas. P value <0.05

PROTEÍNA	SCORE	BASAL										SUPRABASAL									
		NÚCLEO					CITOPLASMA					NÚCLEO					CITOPLASMA				
		R (n)	(%)	NR (n)	(%)	P	R (n)	(%)	NR (n)	(%)	P	R (n)	(%)	NR (n)	(%)	P	R (n)	(%)	NR (n)	(%)	P
<i>Shh</i>	1	15	100	14	100	NA	3	20	1	7.1	0.59	15	100	14	100	NA	5	33.3	2	14.2	0.39
	2	0	0	0	0		12	80	13	92.8		0	0	0	0		10	66.6	12	85.7	
	3	0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0	
<i>Ptch1</i>	1	4	26.6	3	21.4	1.00	3	20	4	28.5	0.68	4	26.6	3	21.4	1.00	4	26.6	3	21.4	1.00
	2	0	0	1	7.1		0	0	0	0		0	0	0	0		0	0	0	0	
	3	11	73.3	10	71.4		12	80	10	71.4		11	73.3	11	78.5		11	73.3	11	78.5	
<i>Ptch2</i>	1	3	20	3	21.4	1.00	3	20	3	21.4	1.00	1	6.7	1	7.1	1.00	1	6.7	1	7.1	1.00
	2	3	20	0	0		2	13.3	0	0		1	6.7	1	7.1		1	6.7	1	7.1	
	3	9	60	11	78.5		10	66.6	11	78.5		13	86.6	12	85.7		13	86.6	12	85.7	
<i>Smo</i>	1	10	66.6	7	50	0.29	10	66.6	7	50	0.29	10	66.6	7	50	0.29	10	66.6	6	42.8	0.02
	2	1	6.7	4	28.5		1	6.7	4	28.5		1	6.7	4	28.5		1	6.7	7	50	
	3	4	26.6	3	21.4		4	26.6	3	21.4		4	26.6	3	21.4		4	26.6	1	7.1	
<i>Gli1</i>	1	6	40	4	28.5	0.02	6	40	4	28.5	0.02	5	33.3	2	14.2	0.05	4	26.6	2	14.2	0.05
	2	1	6.7	7	50		1	6.7	7	50		3	20	9	64.3		3	20	9	64.3	
	3	8	53.3	3	21.4		8	53.3	3	21.4		7	46.6	3	21.4		8	53.3	3	21.4	
<i>Gli2</i>	1	3	20	7	50	0.12	3	20	7	50	0.12	1	6.7	1	7.1	1.00	1	6.7	0	0	1.00
	2	0	0	1	7.1		0	0	0	0		0	0	1	7.1		0	0	2	14.2	
	3	12	80	6	42.8		12	80	7	50		14	93.3	12	85.7		14	93.3	12	85.7	
<i>Gli3</i>	1	11	73.3	12	85.7	0.65	10	66.6	12	85.7	0.38	10	66.6	12	85.7	0.38	10	66.6	12	85.7	0.38
	2	3	20	1	7.1		3	20	1	7.1		4	26.6	1	7.1		3	20	1	7.1	
	3	1	6.7	1	7.1		2	13.3	1	7.1		1	6.7	1	7.1		2	13.3	1	7.1	

Tabela 5.6-Análise semi-quantitativa das proteínas da via de sinalização Shh em TOQCs associados à SCBCN, comparando lesões recorrentes (R) e não-recorrentes (NR). Score 1=0-10%, 2= 11-50%, 3= >50% de células positivas. Valor de significância<0.05

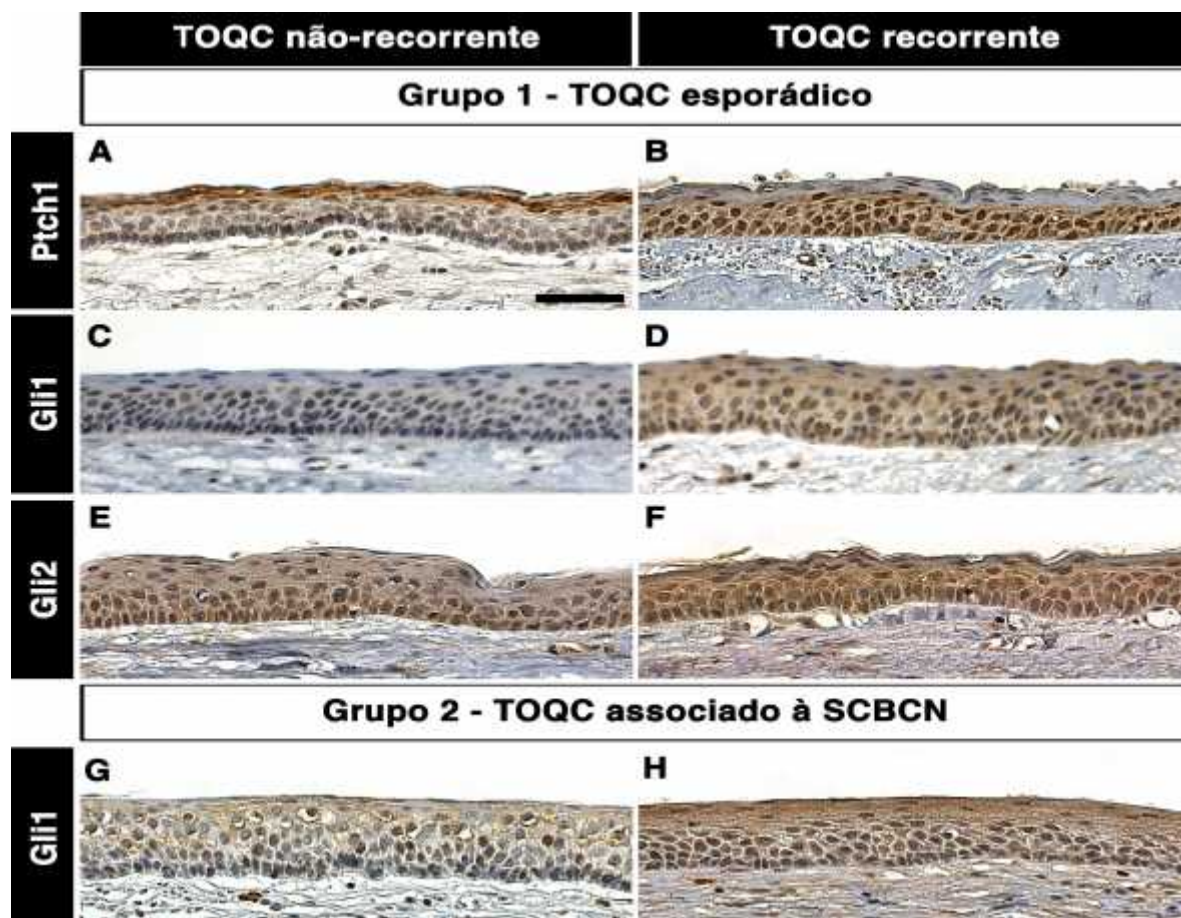


Figura 5.2: Padrão de expressão das proteínas Ptch1, Gli1 e Gli2 em TOQCs recorrentes e não-recorrentes

6. DISCUSSÃO

Dadas as peculiaridades das características histopatológicas específicas, o comportamento agressivo, à associação com anormalidades cromossômicas e com à SCBCN, os TOQCs têm despertado o interesse de muitos pesquisadores (1,2). Este estudo revelou a imunexpressão das proteínas da via de sinalização Shh (Shh, Ptch1, Ptch2, Smo, Gli1, Gli2, Gli3) em 86 TOQCS, comparando a expressão de cada uma das proteínas entre lesões esporádicas e associadas a SCBCN, assim como entre lesões recorrentes e não recorrentes. No geral, nossa casuística apresentou expressão intracelular mista (nuclear e citoplasmática) da maioria das proteínas, tanto no grupo 1 quanto no grupo 2.

Os organismos vivos precisam de uma comunicação de forma organizada entre suas células para atingir objetivos específicos, como o desenvolvimento, o crescimento, a diferenciação e a morte celular. As vias de sinalização não só, fazem referência a uma simples transmissão de sinais através de células, mas sim a mecanismos altamente evoluídos e regulados, dos quais ainda falta muito por compreender (62), o presente estudo, foi encaminhado no sentido de compreender melhor a via de sinalização Shh, já que foi demonstrado que desempenha um papel importante em diferentes processos de progressão do câncer, mas o mecanismo exato de ação ainda não foi elucidado.

Além da quantidade da marcação de cada proteína é importante analisar a localização, para conhecer melhor sua função (63), Neste estudo, a expressão da proteína Shh foi predominantemente citoplasmática nas lesões do grupo 2, sendo estatisticamente significativa na camada basal ($p=0,03$), o que pode indicar ativação autocrina da via de sinalização e também aumento na proliferação celular. Na literatura existem poucos relatos comparando a expressão de esta proteína entre TOQCs esporádicos e associados com a síndrome, os nossos resultados são semelhantes a os encontrados em tumores de mama, os quais também apresentaram alta expressão citoplasmática de esta proteína quando comparados com tecidos normais (64). Ohki et al. (65), relataram que a expressão das

proteínas Shh, Ptch, Smo e Gli1 em TOQCS esporádicos e sindrômicas foi positiva nas camadas epiteliais. No entanto, não houve diferença da expressão entre os grupos, em contraste com os nossos resultados que mostraram maior expressão de Shh, Smo e Gli1 no grupo 2 em comparação com o grupo 1.

Em relação a imunexpressão de Smo, encontramos semelhanças com o trabalho feito por Vered et al. (29), onde ao igual que nosso estudo observaram um padrão de marcação entre baixo e intermédio (score 1-2) para esta proteína em TOQCs esporádicos, a diferença dos tumores em associação com a SCBCN onde houve maior expressão Smo desempenha um papel importante na via de sinalização Shh e pode ser o responsável pelo desenvolvimento de TOQCs e à SCBCN (66). Este achado foi apoiado por nosso estudo onde a expressão nuclear e citoplasmática de Smo foi maior nos tumores do grupo 2 quando comparada com os tumores do grupo 1.

Diferente deste trabalho, foi relatada por outros pesquisadores a alta expressão nuclear de Gli1, quando comparada com a expressão citoplasmática em tumores sindrômicos (67). Nossos resultados não encontraram nenhuma diferença entre as expressões dos componentes celulares (núcleo e citoplasma). Além disso, em concordância com este trabalho, diferentes estudos têm descrito a alta expressão nuclear e citoplasmática de Gli1 em outros tipos de câncer, tais como o câncer de mama (64) e de cólon (68).

Rui et al. (66), relataram que a sobre expressão das proteínas Gli1 e Gli2 conduz ao desenvolvimento de tumores em ratos transgênicos, mostrando que estes fatores de transcrição podem contribuir para a tumorigênese associada com alterações em componentes da via Shh. A expressão nuclear de Gli1 não está envolvida na ativação neoplásica da via, já que em ausência de ativação, Gli1 pode mudar para o núcleo e suprimir a proliferação de células alvo. Por conseguinte sugerimos que Gli1 pode ser utilizado como marcador de diagnóstico nos TOQCS associados à síndrome, além de que pode ser um foco terapêutico para este tipo de lesões (69).

Além da associação com a SCBCN e as alterações cromossômicas, os TOQCs, representam lesões de interesse para os pesquisadores, devido às altas taxas de recidiva. Na literatura a taxa de recorrência dos TOQCs varia de 5 -62.5%, e tem sido correlacionada com alta atividade mitótica do epitélio, presença de cistos de satélite e restos epiteliais da

cápsula cística (11,56,70,71). Em nosso estudo 39.5% das 86 lesões foram recorrentes, dos quais 33,33% faziam parte do grupo 1 e 51,7% do grupo 2. Em concordância com este trabalho, Gorlin et al. (72), relataram que os TOQCs associados à SCBCN apresentam maior tendência à recorrência (30-60%), em comparação com lesões esporádicas (7%). Neste trabalho também foi possível observar que a expressão das proteínas da via de sinalização Shh, revelam diferenças quanto a marcação, neste tipo de lesões, assim, a expressão das proteínas Ptch1, Gli1 e Gli2 foi maior em TOQCs recorrentes recorrentes esporádicos e associados com a síndrome e a sobre expressão de Gli1 foi maior em TOQCs, o que pode ser de ajuda na hora de fazer o diagnóstico de (73).

No entanto, relatos anteriores mostraram positividade mais evidente de Smo em TOQCs esporádicos recorrentes, sugerindo Smo como um marcador para a recorrência, em contraste com nossos resultados (70,73). Além disso, Takahiro et al. (70) encontraram células positivas para Smo, Shh e Ptch principalmente na camada intermédia, enquanto que os nossos resultados mostraram expressão destas proteínas concentradas nas camadas basais e suprabasais.

Não há relatos que mostram a expressão de proteínas da via Shh em TOQCs recorrentes em pacientes sindrômicos. Curiosamente, nossos resultados revelaram maior expressão de Gli1 em lesões recorrentes nestes pacientes, o que indica que a sobre expressão desta proteína pode promover a proliferação e diferenciação celular. Um estudo feito por Yoon et al. (62) mostrou que a ativação de Gli1, pode levar a divisão celular acelerada, diminuição da aderência, ancoragem celular e apoptose, o que tem concordância com o nosso estudo.

Nosso estudo destaca maior expressão das proteínas Shh, Smo e Gli1 nesta via o que pode representar que estes marcadores sejam valiosos para o diagnóstico precoce de TOQCs associados à SCBCN. Isto é de extrema relevância clínica, tendo em conta que um dos principais critérios para o diagnóstico da SCBCN são os carcinomas basocelulares e estes raramente aparecem antes dos 20 anos de idade (63,74). Assim, a expressão destas proteínas pode representar uma nova ferramenta para o diagnóstico precoce da SCBCN, sendo de grande importância na identificação de alvos terapêuticos. Sugerimos, portanto, que a alta expressão nuclear e citoplasmática das proteínas da via de sinalização Sonic

Hedgehog (Shh, Smo e Gli1) pode ajudar na detecção de TOQCs associados com à SCBCN. Além disso, este estudo indica que a forte positividade de Ptch1, Gli1 e Gli2 pode, por sua vez contribuir para predizer o risco de recorrência, sendo que a expressão de Ptch1 e Gli2 se evidencia mais forte dentro das lesões esporádicas recorrentes, enquanto Gli1 foi mais evidente nos TOQCs sindrômicos e recorrentes.

O estudo das vias de sinalização, entre elas a via Shh, é essencial para compreender a biologia do desenvolvimento de diferentes tipos de tumores e câncer, no entanto, os mecanismos de ativação de muitas de elas permanecem ainda obscuros e requerem de uma investigação mais profunda (23,53,68,75)

7 CONCLUSÕES

-) Os TOQCs aparecem mais precocemente quando associados com a SCBCN e assim mesmo apresentam maior porcentagem de recorrências.
-) A forte expressão tanto nuclear quanto citoplasmática das proteínas da via de sinalização Shh (Shh, Smo e Gli1) podem contribuir para a detecção precoce de TOQCs associados ao síndrome.
-) A expressão das proteínas Shh, Smo e Gli1 em TOQCs síndrômicos pode representar uma nova ferramenta para a identificação de alvos terapêuticos.
-) A forte positividade de Ptch1 e Gli2 em TOQCs esporádicos, e Gli1 em tumores síndrômicos, pode contribuir a predizer o risco de recorrência.

REFERÊNCIAS

1. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. WHO Classif Tumour. 2005;(9):163–75.
2. González-Alva P, Tanaka A, Oku Y, Yoshizawa D, Itoh S, Sakashita H, et al. Keratocystic odontogenic tumor: a retrospective study of 183 cases. *J Oral Sci.* 2008;50(2):205–12.
3. Menon S. Keratocystic odontogenic tumours: Etiology, pathogenesis and treatment revisited. *J maxillofac Oral surg.* 2015;14(3):541-7.
4. Mosqueda-Taylor A, Ledesma-Montes C, Caballero-Sandoval S, Portilla-Robertson J, Ruíz-Godoy Rivera LM, Meneses-García A. Odontogenic tumors in Mexico: a collaborative retrospective study of 349 cases. *Oral surgery, oral med, oral pathol, oral radiol and endod.* 1997;84(6):672-5.
5. De Amezaga AOG, Arregui OG, Nuño SZ, Sagredo AA, Urizar JMA. Gorlin-Goltz syndrome: Clinicopathologic aspects. *Med Oral, Patol Oral Cir Bucal.* 2008;13(6):E338-43.
6. Song YL, Zhang WF, Peng B, Wang CN, Wang Q, Bian Z. Germline mutations of the PTCH gene in families with odontogenic keratocysts and nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Tumor Biol.* 2006;27(4):175–80.
7. Philipsen HP, Reichart PA. Classification of odontogenic tumours. A historical review. *Journal of Oral Pathology and Medicine.* 2006;35(9):525–9.
8. Li T. The odontogenic keratocyst: a cyst, or a cystic neoplasm? *J Dent Res* 2011;90(2):133–42.
9. Madras J, Lapointe H. Keratocystic odontogenic tumour: Reclassification of the odontogenic keratocyst from cyst to tumour. *J Can Dent Assoc.* 2008;74(2):165-165h.
10. Bornstein MM, Filippi A, Altermatt HJ, Lambrecht JT, Buser D The odontogenic keratocyst--odontogenic cyst or benign tumor? *Schweizer Monatsschrift Zahnmedizin.* 2005;115(2):110–28.
11. Myoung H, Hong SP, Hong SD, Lee J Il, Lim CY, Choung PH, et al. Odontogenic keratocyst: Review of 256 cases for recurrence and clinicopathologic parameters. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91(3):328–33.
12. Zhao YF, Wei JX, Wang SP. Treatment of odontogenic keratocysts: A follow-up of

- 255 Chinese patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;94(2):151–6.
13. Boffano P, Ruga E, Gallesio C. Keratocystic odontogenic tumor (odontogenic keratocyst): Preliminary retrospective review of epidemiologic, clinical, and radiologic features of 261 lesions from University of Turin. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(12):2994–9.
 14. Habibi A, Saghravanian N, Habibi M, Mellati E, Habibi M. Keratocystic odontogenic tumor: a 10-year retrospective study of 83 cases in an Iranian population. *J Oral Sci.* 2007;49(3):229–35.
 15. Chirapathomsakul D, Sastravaha P, Jansisyanont P. A review of odontogenic keratocysts and the behavior of recurrences, *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, and Endod.* 2006;101(1):5-9
 16. Li T, Sun L, Luo H, Yuan J, Gao L, Gu X, et al. Studies on keratocystic odontogenic tumors. *Beijing Da Xue Xue Bao* 2009;41(1):16–20.
 17. Jordan RC. Histology and ultrastructural features of the odontogenic keratocyst. *Oral Maxillof Surg Clin North Am.* 2003;108(2):325–33.
 18. Aragaki T, Michi Y, Katsube KI, Uzawa N, Okada N, Akashi T, et al. Comprehensive keratin profiling reveals different histopathogenesis of keratocystic odontogenic tumor and orthokeratinized odontogenic cyst. *Hum Pathol.* 2010;41(12):1718–25.
 19. Crowley TE, Kaugars GE GJ. Odontogenic keratocysts: a clinical and histology comparison of the parakeratin and orthokeratin variants. *J Oral Maxillo Surg.* 1992;101(1):22–6.
 20. Vuhahula E, Nikai H, Ijuhin N, Ogawa I, Takata T, Koseki T, et al. Jaw cysts with orthokeratinization: Analysis of 12 cases. *J Oral Pathol Med.* 1993;22(1):35–40.
 21. Thosaporn W, Iamaroon A, Pongsiriwet S, Ng KH. A Comparative study of epithelial cell proliferation between the odontogenic keratocyst, orthokeratinized odontogenic cyst, dentigerous cyst, and ameloblastoma. *Oral Dis.* 2004;10(1):22–6.
 22. Kuroyanagi N, Sakuma H, Miyabe S, Machida J, Kaetsu A, Yokoi M, et al. Prognostic factors for keratocystic odontogenic tumor (odontogenic keratocyst): Analysis of clinico-pathologic and immunohistochemical findings in cysts treated by enucleation. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(4):386–92.
 23. Wicking C, Smyth I, Bale A. The hedgehog signalling pathway in tumorigenesis and development. *Oncogene.* 1999;18(55):7844–51.
 24. Zhang H, Ping XL, Lee PK, Wu XL, Yao YJ, Zhang MJ, et al. Role of PTCH and p53 genes in early-onset basal cell carcinoma. *Am J Pathol.* 2001;158(2):381–5.
 25. Mendes RA, Carvalho JF, Van der Waal I Biological pathways involved in the aggressive behavior of the keratocystic odontogenic tumor and possible implications for molecular oriented treatment - An overview. *Oral Oncol.* 2010;46(1):19-24

26. Pan S, Dong Q, Sun LS, Li TJ. Mechanisms of inactivation of PTCH1 gene in nevoid basal cell carcinoma syndrome: Modification of the two-hit hypothesis. *Clin Cancer Res.* 2010;16(2):442–50.
27. Bhargava D, Deshpande A, Pogrel MA. Keratocystic odontogenic tumour (KCOT)-a cyst to a tumour. *Oral Maxillofac Surg.* 2012;16(2):163–70.
28. Li T. The odontogenic keratocyst: a cyst, or a cystic neoplasm? *J Dent Res.* 2011;90(2):133–42.
29. Vered M, Peleg O, Taicher S BA. The immunoprofile of odontogenic keratocyst (keratocystic odontogenic tumor) that includes expression of PTCH, SMO, GLI-1 and bcl-2 is similar to ameloblastoma but different from odontogenic cysts. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(7):597–604.
30. Fujii K, Miyashita T. Gorlin syndrome (nevoid basal cell carcinoma syndrome): update and literature review. *Pediatr Int.* 2014;56(5):667–74.
31. Taipale J, Chen JK, Cooper MK, Wang B, Mann RK, Milenkovic L, et al. Effects of oncogenic mutations in Smoothed and Patched can be reversed by cyclopamine. *Nature.* 2000;406(6799):1005–9.
32. Adolphe C, Narang M, Ellis T, Wicking C, Kaur P, Wainwright B. An in vivo comparative study of sonic, desert and Indian hedgehog reveals that hedgehog pathway activity regulates epidermal stem cell homeostasis. *Development.* 2004;131(20):5009–19.
33. Chari NS, McDonnell TJ. The sonic hedgehog signaling network in development and neoplasia. *Adv Anat Pathol.* 2007; 14(5):344-52.
34. Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development.* 1998;125(15):2803–11.
35. Riobo NA, Lu K EC, Jr. Hedgehog signal transduction: signal integration and cross talk in development and cancer. *Cell cycle.* 2006;5(15):1612–5.
36. Evangelista M, Tian H, de Sauvage FJ. The Hedgehog Signaling Pathway in Cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12(20):5924–8.
37. Hidalgo M MA. The Hedgehog pathway and pancreatic cancer. *N Engl J Med.* 2009;361(21):2803–11.
38. Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: Is it a benign cystic neoplasm? Part 1. Clinical and early experimental evidence of aggressive behaviour. *Oral Oncol* 2002;38(3):219-26.
39. Gomes CC, Diniz MG, Gomez RS. Review of the molecular pathogenesis of the odontogenic keratocyst. *Oral Oncol* 2009;45(12):1011-4.
40. Bataineh AB, al Qudah M. Treatment of mandibular odontogenic keratocysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;86(1):42–7.

41. Morgan TA, Burton CC, Qian F. A retrospective review of treatment of the odontogenic keratocyst. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63(5):635–9.
42. Meara JG, Shah S, Li KK, Cunningham MJ. The odontogenic keratocyst: a 20-year clinicopathologic review. *Laryngoscope.* 1998;108(2):280–3.
43. Lam KY, Chan a C. Odontogenic keratocysts: a clinicopathological study in Hong Kong Chinese. *Laryngoscope.* 2000;110(8):1328–32.
44. Zecha JAEM, Mendes RA, Lindeboom VB, Van Der Waal I. Recurrence rate of keratocystic odontogenic tumor after conservative surgical treatment without adjunctive therapies - A 35-year single institution experience. *Oral Oncol.* 2010;46(10):740–2.
45. Grasmuck EA NB. keratocystic odontogenic tumor. *Head Neck Pathol.* 2010;4(1):94–6.
46. Mahindroo N, Punchihewa C, Fujii N. Hedgehog-Gli Signaling Pathway Inhibitors as Anticancer Agents. *J Med Chem.* 2009;52(13):3829–45.
47. Cottom HE, Bshena FI, Speight PM, Craig GT, Jones A V. Histopathological features that predict the recurrence of odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(5):408–14.
48. Kaczmarzyk T, Mojsa I, Stypulkowska J. A systematic review of the recurrence rate for keratocystic odontogenic tumour in relation to treatment modalities, *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2012;41(12):1585-6.
49. Hyun H-K, Hong S-D, Kim J-W. Recurrent keratocystic odontogenic tumor in the mandible: a case report and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;108(2):e7–10.
50. Boyne PJ, Hou D, Moretta C, Pritchard T. The multifocal nature of odontogenic keratocysts. *J Calif Dent Assoc.* 2005;33(12):961–5.
51. Voorsmit RACA, Stoelinga PJW, van Haelst UJGM. The management of keratocysts. *J Maxillofac Surg.* 1981;9(C):228–36.
52. Friedrich RE. Diagnosis and treatment of patients with nevoid basal cell carcinoma syndrome [Gorlin-Goltz syndrome (GGS)]. *Anticancer Res.* 2007; 27(4A):1783–7.
53. Evans DG, Farndon PA, Burnell LD, Gattamaneni HR, Birch JM. The incidence of Gorlin syndrome in 173 consecutive cases of medulloblastoma. *Br J Cancer.* 1991;64(5):959–61.
54. Kimonis VE, Goldstein AM, Pastakia B, Yang ML, Kase R, Digiovanna JJ, et al. Clinical manifestations in 105 persons with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Am J Med Genet.* 1997;69(3):299–308.
55. Lo Muzio L, Nocini P, Bucci P, Pannone G, Consolo U, Procaccini M. Early diagnosis of nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Am Dent Assoc.* 1999;130(5):669–74.

56. Lo Muzio L. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Orphanet J Rare Dis.* 2008;3:32.
57. Manfredi M, Vescovi P, Bonanini M, Porter S. Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(2):117–24.
58. Lacombe D, Chateil JF, Fontan D, Battin J. Medulloblastoma in the nevoid basal-cell carcinoma syndrome: case reports and review of the literature. *Genet Couns* 1990;1(3-4):273–7.
59. Mancuso M, Pazzaglia S, Tanori M, Hahn H, Merola P, Rebessi S, et al. Basal Cell Carcinoma and Its Development : Basal Cell Carcinoma and Its Development : Insights from Radiation-Induced Tumors in Ptch1-Deficient Mice. *Cancer Res.* 2004;64(1):934–41.
60. Bree AF, Shah MR. Consensus statement from the first international colloquium on basal cell nevus syndrome (BCNS). *Am J Med Genet A.* 2011;155A(9):2091–7.
61. Bitar GJ, Herman CK, Dahman MI, Hoard MA. Basal cell nevus syndrome: Guidelines for early detection. *Am Fam Physician* 2002;65(12):2501–4.
62. Yoon JW, Kita Y, Frank DJ, Majewski RR, Konicek BA, Nobrega MA, et al. Gene expression profiling leads to identification of GLI1-binding elements in target genes and a role for multiple downstream pathways in GLI1-induced cell transformation. *J Biol Chem.* 2002;277(7):5548–55.
63. Daya-Grosjean L, Couvé-Privat S. Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. *Cancer Lett.* 2005;225(2):181–92.
64. Ge X, Lyu P, Gu Y, Li L, Li J, Wang Y, et al. Sonic hedgehog stimulates glycolysis and proliferation of breast cancer cells: Modulation of PFKFB3 activation. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;464(3):862–8.
65. Ohki K, Kumamoto H, Ichinohasama R, Sato T, Takahashi N, Ooya K. PTC gene mutations and expression of SHH, PTC, SMO, and GLI-1 in odontogenic keratocysts. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(6):584–92.
66. Rui Z, Li-Ying P, Jia-Fei Q, Ying-Ying H, Feng C, Tie-Jun L. Smoothed gene alterations in keratocystic odontogenic tumors. *Head Face Med* 2014;10(1):36.
67. Zhang T, Chen M, L?? Y, Xing Q, Chen W. A novel mutation of the PTCH1 gene activates the Shh/Gli signaling pathway in a Chinese family with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;409(2):166–70.
68. Zhang X, Zhang SS, Wei GJ, Deng ZM HY. Dysregulation of hedgehog signaling pathway related components in the evolution of colonic carcinogenesis. *Int J Clin Exp Med.* 2015;8(11):21379–85.
69. Ruiz i Altaba A, Sánchez P, Dahmane N, Altaba A i, Sánchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2002;2(5):361–72.
70. Yagyuu T, Kirita T, Sasahira T, Moriwaka Y, Yamamoto K, Kuniyasu H.

Recurrence of keratocystic odontogenic tumor: clinicopathological features and immunohistochemical study of the Hedgehog signaling pathway. *Pathobiology*. 2008;75(3):171–6.

71. MacDonald-Jankowski DS. Keratocystic odontogenic tumour: systematic review. *Dentomaxillofac Radiol*. 2011;40(1):1–23.
72. Gorlin RJ GR. Nevoid basal-cell carcinoma syndrome. *Med*. 1987;66(2):98–113.
73. Gurgel CA, Buim ME, Carvalho KC, Sales CB, Reis MG, de Svoza RO, de Faro Valverde L, de Azevedo RA, Dos Santos JN, Soares FA RE. Transcriptional profiles of SHH pathway genes in keratocystic odontogenic tumor and ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*. 2014;43(8):619–26.
74. Fujii K, Miyashita T. Gorlin syndrome (nevoid basal cell carcinoma syndrome): update and literature review. *Pediatr Int*. 2014;56(5):667–74.
75. Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(12):903–11.

ANEXO A - Dados clínicos dos pacientes com TOQCs

A) DADOS CLÍNICOS DO PACIENTE

Identificação: _____

Dados Gerais:

Nome: _____

RGH: _____ Data admissão: _____

1. Idade: _____

2. Data Nascimento: _____

3. Etnia: 1- Branca 2- negra 3- parda 4- amarela 5- NI

4. Sexo: 1- masculino 2- Feminino

5. Queixa: 1-inchaço 2-dor 3-parestesia 4-nenhuma 5-outra 6-NI

6. Tempo de queixa: _____ meses

7. Biópsia prévia: 1- sim 2- não

8. Data biópsia prévia: _____ / Laudo: _____

9. Tratamento prévio: 1- nenhum 2- ressecção 3- marsupialização 4- curetagem

5- enucleação 6- enucleação+crio 7- enucleação+carnoy

8-curetagem+criot 9- curetagem+carnoy 10- NI

10. Data tratamento prévio: _____ /Laudo: _____

11. Número de TOQCs: _____

12. Data última informação da estômatologia: _____

13. Situação da última informação: 1-vivo s/doença 2-vivo c/ doença 3- óbito 4- perdido de vista

14. Data do óbito: _____

15. Associação com SCBCN: 1-sim 2-não

ANEXO B -TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 18 de Novembro de 2009.

Ao
Dr. Fábio de Abreu Alves

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1322/09

“Avaliação dos parâmetros clínicos, histopatológicos e perfil imunoistoquímico do tumor odontogênico queratocístico associado ou não à Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 20/10/2009, aprovaram a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do CNS;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento Financeiro detalhado;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Estomatologia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Dr. Alexandre Sa de Andrade
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa