



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE

REBECA CAROLINA MORAES DANTAS

**TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL E FRAÇÃO DE CRESCIMENTO
TUMORAL EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA COM A VIA
HEDGEHOG ATIVADA**

Salvador

2018

REBECA CAROLINA MORAES DANTAS

**TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL E FRAÇÃO DE CRESCIMENTO
TUMORAL EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA COM A VIA
HEDGEHOG ATIVADA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde da Universidade Federal da Bahia – UFBA, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Odontologia e Saúde.

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

Salvador
2018

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Universitário de Bibliotecas (SIBI/UFBA), com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Dantas, Rebeca Carolina Moraes
Transição Epitelial-Mesenquimal e Fração de Crescimento
Tumoral em Carcinoma Escamocelular de Boca com a Via Hedgehog
Ativada / Rebeca Carolina Moraes Dantas. -- Salvador, 2018.
84 f. : il

Orientador: Clarissa Araújo Gurgel Rocha.
Tese (Doutorado - Programa de Pós-graduação em Odontologia e
Saúde) -- Universidade Federal da Bahia, Faculdade de
Odontologia, 2018.

1. Carcinoma Escamocelular de Boca. 2. Via Hedgehog. 3.
Transição Epitelial-Mesenquimal. 4. Fração de Crescimento
Tumoral. I. Rocha, Clarissa Araújo Gurgel. II. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ODONTOLOGIA E SAÚDE

TERMO DE APROVAÇÃO

C.D. REBECA CAROLINA MORAES DANTAS

**“TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL E FRAÇÃO DE
CRESCIMENTO TUMORAL EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR
DE BOCA COM A VIA HEDGEHOG ATIVADA”**

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Clarissa Araújo Gurgel Rocha (Orientadora)
Professora da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos (Examinador Interno)
Professor da Universidade Federal da Bahia – Faculdade de Odontologia

Profa. Dra. Jaqueline França Costa (Examinador Externo)
Professora da Universidade Federal da Bahia - ICS

Profa. Dra. Caroline Brandi Schlaepfer Sales (Examinador Externo)
Professora da Universidade Federal da Bahia – ICS

Prof. Dr. Viviane Palmeira da Silva (Examinador Externo)
Pós- Doutoranda Universidade Federal da Bahia

Dedico este trabalho a minha família, fonte de inspiração, incentivo e aprendizado para meu crescimento pessoal e profissional.

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela presença constante em minha vida, conforto nos momentos difíceis e pelas conquistas alcançadas.

À minha mãe Zidalva e minhas irmãs, Rachel e Raíssa, pelo amor incondicional, incentivo e apoio em todos os meus projetos de vida, pelos abraços nos dias de angústia, pelas orações e por sempre acreditarem em mim e em meu potencial.

À família Dantas e Moraes por serem um exemplo de amor, carinho e honestidade. A torcida e o incentivo de vocês foram o impulso para a concretização deste projeto.

Ao meu marido Rafael pelo apoio, incentivo, amor e paciência. Obrigada por estar sempre ao meu lado em todas as etapas da minha formação acadêmica. Te amo!

À minha orientadora Clarissa Araújo Gurgel Rocha, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa e à docência. Obrigada pela confiança, pelo aprendizado muito além do mundo acadêmico, pelas críticas construtivas e pela paciência. Foi um privilégio ser sua aluna!

Ao grupo Biopatologia do Câncer pelo apoio nas atividades acadêmicas e laboratoriais, pela amizade, carinho, conselhos e por serem grandes torcedoras pelo sucesso de toda a equipe. Sem vocês, nada disso seria possível!

Ao Instituto Gonçalo Moniz, em especial o Laboratório de Patologia e Biologia Molecular, por permitir a realização de todos os experimentos e por toda a estrutura necessária para execução de minha pesquisa e ao funcionário do LPBM, Cleiton, por sempre ser solícito e por toda ajuda.

Ao Serviço de Microscopia do Instituto Gonçalo Moniz, em especial a Claudio, pelo apoio no escaneamento e fotografias de minhas lâminas.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde da Universidade Federal da Bahia pelos ensinamentos, pelo empenho na formação profissional e por lutar pela universidade pública em meio a tantas dificuldades.

Ao coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde, Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos pela organização e compromisso com a formação profissional.

Aos colegas do Programa de Pós-graduação em Odontologia e Saúde, em especial a Daniele, Virgínia e Poliana, pela amizade e pelo companheirismo ao longo desses anos.

Às funcionárias Tayla e Sueli, pelo apoio as atividades acadêmicas na Universidade Federal da Bahia.

Aos meus amigos, por torcerem pelo meu sucesso, acreditarem no meu potencial, compreenderem minhas ausências e tornarem meus dias mais felizes.

Aos colegas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Baiano, em especial, ao Diretor-Geral Euro Oliveira Araújo, por incentivar o aperfeiçoamento profissional de todos os servidores, e a minha querida equipe de Coordenação de Assistência Estudantil, pelo carinho, amizade e apoio na concretização deste projeto em minha vida.

Aos colegas da Faculdade de Ilhéus pelo incentivo, apoio e torcida por esta etapa da minha vida.

Aos meus alunos, obrigado por me ensinarem um pouco mais a cada dia, pelo carinho, apoio e por tornarem meu caminho na docência gratificante e me mostrarem que, realmente, fiz a escolha certa!

Por fim, a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“Tudo posso naquele que me fortalece”

Felipenses 4:13

DANTAS, Rebeca Carolina Moraes. Transição epitelial-mesenquimal e fração de crescimento tumoral em Carcinoma Escamocelular de Boca com a via Hedgehog ativada, 84 f Tese (Doutorado). Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2018.

RESUMO

INTRODUÇÃO/OBJETIVO: A via Hedgehog (HH) está ativada no Carcinoma Escamocelular de Boca (CEB) e pode estar relacionada a transição epitelial-mesenquimal (TEM) e a proliferação celular neste tumor. Diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a TEM e potencial proliferativo em CEBs com a via HH ativada. **MATERIAL E MÉTODOS:** Vinte e três casos de CEBs GLI1 positivos foram submetidos à reação imuno-histoquímica para as proteínas Snail, Slug, N-caderina, E-caderina, β -catenina e MCM3. As análises da imunexpressão foram realizadas em *front* de invasão e ilhas tumorais e os dados clínico-patológicos foram avaliados e comparados. **RESULTADOS:** No *front* de invasão, os casos de CEBs apresentaram expressão positiva para Snail, Slug e MCM3 no núcleo das células tumorais e observou-se perda de expressão membranar e citoplasmática de E-caderina e β -catenina. A expressão positiva para N-caderina foi observada em 31,78% dos casos. Imunexpressão de GLI1 foi associada com a perda de expressão de E-caderina ($p < 0,001$), β -catenina membranar ($p < 0,001$) e β -catenina citoplasmática ($p = 0,02$). Nas ilhas tumorais, observou-se expressão nuclear GLI1, Snail, Slug e MCM3. E-caderina e β -catenina exibiram marcação positiva membranar restabelecida. Observou-se uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre GLI1 e Snail ($p = 0,05$), E-caderina ($p = 0,01$) e β -catenina citoplasmática ($p = 0,04$). A expressão de β -catenina membranar estava relacionada com presença de metástase em linfonodos e estadiamento clínico e GLI1 apresentou associação com o estadiamento clínico. **CONCLUSÕES:** A via HH pode atuar na regulação da expressão de fenótipo mesenquimal. A perda de expressão de E-caderina e β -catenina está relacionada a região de *front*, enquanto que a adesão celular se encontra reestabelecida em ilhas tumorais, de forma independente de MCM3. O padrão de expressão de N-caderina e Slug não refletem de forma significativa o processo de TEM em CEBs com a via HH ativada.

Palavras-chaves: Carcinoma Escamocelular, Câncer de Boca, Proteínas Hedgehog, Transição Epitelial-Mesenquimal, Proliferação Celular.

DANTAS, Rebeca Carolina Moraes. Epitelial-mesenchymal transition and tumor growth fraction in Oral Squamous Cell Carcinoma with activated Hedgehog pathway, 84 p. Thesis (PhD). School of Dentistry, Federal University of Bahia, Salvador, 2018.

ABSTRACT

INTRODUCTION/OBJECTIVE: The Hedgehog (HH) pathway is activated in the Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) and may be related to the epithelial-mesenchymal transition (EMT) and cellular proliferation in this tumor. The aim of the present study was to evaluate the EMT and the cell proliferative potential in OSCC with the activated HH pathway. **MATERIAL AND METHODS:** Twenty-three positive GLI1 OSCC cases were submitted to the immunohistochemical reaction for Snail, Slug, N-cadherin, E-cadherin, β -catenin and MCM3 proteins. Immunoexpression analyzes were performed in front of invasion and tumor nests and the clinical and pathological data were evaluated and compared. **RESULTS:** At the invasive *front*, OSCC cases showed positive expression for Snail, Slug and MCM3 in the nucleus of tumor cells and the loss of membrane and cytoplasmic expression of E-cadherin and β -catenin were observed. Positive expression for N-cadherin was observed in 31.78% of the cases. Immunoexpression of GLI1 was associated with loss of E-cadherin expression ($p < 0.001$), membrane β -catenin ($p < 0.001$) and cytoplasmic β -catenin ($p = 0.02$). In the tumor nests, it observes nuclear expression GLI1, Snail, Slug and MCM3. E-cadherin and β -catenin showed re-established membrane positive expression. There was a positive and statistically significant correlation between GLI1, Snail ($p = 0.05$), E-cadherin ($p = 0.01$) and cytoplasmic β -catenin ($p = 0.04$). The expression of β -catenin membrane was related to the presence of metastasis in lymph nodes and to clinical staging and GLI1 was associated with clinical staging. **CONCLUSIONS:** The HH pathway may act to regulate the expression of mesenchymal phenotype. The loss of E-cadherin and β -catenin expression is related to the front region, while cell adhesion is re-established in tumor nests independently of MCM3. The expression pattern of N-cadherin and Slug do not significantly reflect the TEM process in positive GLI1 OSCC.

Keywords: Squamous Cell Carcinoma, Mouth Neoplasms, Hedgehog Protein, Epithelial-Mesenchymal Transition, Cell Proliferation

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 Transdução do sinal da via Hedgehog. | 22 |
| Figura 2 Transição epitelial-mesenquimal (TEM) e Transição mesenquimal-epitelial (TME)..... | 27 |
| Figura 3 Escore de imunoexpressão das proteínas GLI1, marcadores de TEM e MCM3, em região de <i>front</i> e ilhas tumorais | 45 |
| Figura 4 Escore de imunoexpressão de GLI1, marcadores de TEM e MCM3, em região de <i>front</i> e ilhas tumorais, considerando-se os graus de diferenciação dos CEBs..... | 46 |
| Figura 5 Imunomarcção de GLI1, Snail e Slug em CEBs..... | 47 |
| Figura 6 Imunomarcção de N-caderina, E-caderina, β -catenina e MCM3 em CEBs.. | 47 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1 Dados dos anticorpos utilizados | 36 |
| Tabela 2 Escore de imuno-marcação | 37 |
| Tabela 3 Interpretação das medidas de associação | 38 |
| Tabela 4 Características clínicas e histológicas dos CEBs | 40 |
| Tabela 5 Correlação entre a expressão de GLI1, marcadores de TEM e MCM3 em pacientes com CEB pelo Coeficiente de ϕ , em <i>front</i> de invasão e ilha tumoral | 50 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------|---|
| BCL2 | Do inglês, <i>B-cell lymphoma 2</i> |
| Boc | Do inglês, <i>BiregionalCdon-bindingprotein</i> |
| BMP | Proteína Morfogenética Óssea |
| Cdo | Do inglês, <i>Cell-adhesion-molecule-related/downregulatedbyoncogenes protein</i> |
| CEB | Carcinoma Escamocelular de Boca |
| CK1 | Proteína Caseína Quinase 1 |
| DHH | Proteína <i>Desert Hedgehog</i> |
| DHT | Di-hidrotestosterona |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DP | Desvio-padrão |
| G ₀ | Fase do ciclo celular G-zero |
| G ₁ | Fase do ciclo celular G-um |
| G ₂ | Fase do ciclo celular G-dois ou pós-sintética |
| Gas 1 | Do inglês, <i>Growth Arrest Specific 1 protein</i> |
| GLI | Do inglês, <i>Glioma-associatedoncogenehomolog</i> |
| GLI1 | Proteína <i>Glioma-associatedoncogenehomolog 1</i> |
| GLI2 | Proteína <i>Glioma-associatedoncogenehomolog 2</i> |
| GLI3 | Proteína <i>Glioma-associatedoncogenehomolog 3</i> |
| GLI _A | GLI em forma ativa |
| GLI _R | GLI em forma repressora |
| GPC5 | Proteína Glipican-5 |
| GSK3 β | Proteína Glicogênio Sintase Quinase 3 Beta |
| HAM | Hospital Aristides Maltez |
| HH | <i>Hedgehog</i> |
| HRP | Do inglês, <i>Horse Raddish Peroxidase</i> |
| IGM | Instituto Gonçalo Moniz |
| IHH | Proteína <i>Indian Hedgehog</i> |
| Ki-67 | Refere-se ao antígeno Ki-67 ou anticorpo de mesmo nome |
| LPBM | Laboratório de Patologia e Biologia Molecular |
| M | Metástase a Distância |
| MCM | Do inglês, <i>Minichromosome maintenance proteins</i> |

| | |
|----------------|---|
| MCM3 | Do inglês, <i>Minichromosome maintenance proteins 3</i> |
| MEC | Matriz extracelular |
| N | Linfonodos Regionais |
| N-Myc | Refere-se a proteína N-Myc ou ao gene de mesmo nome |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| p21 | Proteína p21 |
| PCNA | Do inglês, <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> |
| PKA | Proteína Quinase A |
| PTCH | Receptor de Proteína <i>Patched</i> |
| PTCH1 | Proteína <i>Patched 1</i> |
| PTCH2 | Proteína <i>Patched 2</i> |
| PTEN | Do inglês, <i>Phosphatase and tensin homolog protein</i> |
| S | Fase ou período S (sintético) |
| SHH | Proteína <i>Sonic Hedgehog</i> |
| Slug | Proteína <i>zinc finger</i> SNAI2 |
| SMO | Do inglês, <i>Smoothened protein or gene</i> |
| SNAIL | Fatores de transcrição das famílias SNAIL |
| Snail | Proteína <i>zinc finger</i> SNAI1 |
| SPSS | Do inglês, <i>Statistical Package for the Social Science</i> |
| SUFU | Do inglês, <i>Suppressoroffused protein or gene</i> |
| T | Tumor Primário |
| TCF/LEF | Fatores de transcrição <i>T cell fator/lymphoidenhancer fator</i> |
| TEM | Transição Epitelial-mesenquimal |
| TGF- β 1 | Via de Sinalização Fator de Transformação do Crescimento Beta 1 |
| TME | Transição Mesenquimal-epitelial |
| TNM | Sistema de classificação de tumores malignos |
| TWIST | Fatores de transcrição da família TWIST |
| Twist1 | Proteína <i>Twist1</i> |
| Twist2 | Proteína <i>Twist2</i> |
| WNT | Via de Sinalização Wingless Type |
| ZEB | Fatores de transcrição da família ZEB |
| ZEB1 | Proteína <i>zinc-finger E-box-binding homeobox 1</i> |
| ZEB2 | Proteína <i>zinc-finger E-box-binding homeobox 2</i> |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA..... | 18 |
| 2.1 CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA | 18 |
| 2.2 VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG..... | 20 |
| 2.3 TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL | 24 |
| 2.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR | 29 |
| 3 HIPÓTESE..... | 32 |
| 4 OBJETIVOS | 33 |
| 4.1 OBJETIVO GERAL..... | 33 |
| 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 33 |
| 5 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS | 34 |
| 5.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA | 34 |
| 5.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO | 34 |
| 5.3 OBTENÇÃO DE DADOS CLÍNICOS | 34 |
| 5.4 ESTUDO HISTOLÓGICO | 35 |
| 5.5 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO | 35 |
| 5.6 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA..... | 36 |
| 5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 37 |
| 6 RESULTADOS..... | 39 |
| 6.1 ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS DO CEB..... | 39 |
| 6.2 IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GLI1, SNAIL, SLUG, N-CADERINA, E-CADERINA, β -CATENINA E MCM3 | 41 |
| 6.2.1 GLI1..... | 41 |
| 6.2.2 Snail | 41 |
| 6.2.3 Slug | 41 |
| 6.2.4 N-caderina..... | 42 |
| 6.2.5 E-caderina | 42 |
| 6.2.6 β-catenina | 43 |
| 6.2.7 MCM3..... | 43 |
| 6.3 CORRELAÇÃO ENTRE GLI1, MARCADORES DA TEM E MCM3 | 46 |
| 7 DISCUSSÃO | 51 |
| 8 CONCLUSÃO | 59 |
| REFERÊNCIAS | 60 |

1 INTRODUÇÃO

O câncer oral é o sexto tumor mais comum em todo o mundo e permanece como um problema de saúde pública em países em desenvolvimento (LEE, A. et al., 2015; QUAN, H. et al., 2016; STASIKOWSKA-KANICKA; WĄGROWSKA-DANILEWICZ; DANILEWICZ, 2017; YANG, W. et al., 2016). Nessa perspectiva, o carcinoma escamocelular de boca (CEB) é o subtipo histológico mais frequente que ocorre na cavidade oral (XIA et al., 2014), correspondendo a mais de 90% das neoplasias malignas nesta região (RIKARDBSEN et al., 2014). Quando diagnosticado tardiamente, a morbi-mortalidade desta doença é elevada, sendo a taxa de sobrevivência dos pacientes acometidos em torno de 50% em cinco anos (RAMOS et al., 2016). As principais causas de morte relacionada ao CEB são a presença de metástase à distância, acometimento linfonodal e a recorrência loco-regional (CHENG, C. et al., 2016; LAI et al., 2016). Diante disso, pesquisas que aprofundem o conhecimento da biologia desse tumor são importantes para identificação de estratégias de diagnóstico e tratamentos mais aprimorados (CHENG, C. et al., 2016; WANG, C. et al., 2011; XIA et al., 2014).

A patogênese dos tumores malignos é complexa, heterogênea e, atualmente, vias de sinalização embrionárias, como a Hedgehog (HH) tem se destacado no contexto da tumorigênese (ZHANG; TIAN; XING, 2016). A via HH atua na formação axial embrionária, na proliferação celular, manutenção de células-troncos e no desenvolvimento embrionário de órgãos (ARNHOLD; BOOS; LANVERS-KAMINSKY, 2016; YOO et al., 2011). Em células adultas, essa via é geralmente inativa e a sua reativação inapropriada desempenha um importante papel no desenvolvimento de diversos tumores humanos (SUN; LIU; HUANG, 2013; YAO; CHUANG, 2015), como meduloblastoma (RALEIGH et al., 2017), carcinoma de células basais (CASAS et al., 2017) e câncer de próstata (SKODA et al., 2017). Basicamente, a ativação da via de sinalização HH ocorre quando um dos ligantes SHH, DHH ou IHH liga-se aos seus receptores *Patched* (PTCH) e culmina com a translocação nuclear de fatores de transcrição *Glioma-associated oncogene homolog* (GLI1, GLI2 e/ou GLI3), sendo GLI1 o fator de transcrição que possui domínio exclusivamente ativador, com consequente ativação de genes alvos, como Snail (GOYAL et al., 2016; ZHANG, X. et al., 2017), BCL2 (SONG, M. et al., 2013), Ciclina D1 (BERMUDEZ et al., 2013; ONISHI; KATANO, 2014), entre outros, contribuindo para eventos

importantes na progressão tumoral, como: transição epitelial-mesenquimal, proliferação, neovascularização, metástase e sobrevivência celular (CHEN, X. et al., 2011; SUN; LIU; HUANG, 2013).

A transição epitelial-mesenquimal (TEM) é um evento biológico reversível que habilita células epiteliais a expressar um fenótipo mesenquimal transitório, resultando em alterações em sua morfologia, menor capacidade de adesão e maior potencial de migração (GUJRAL et al., 2014; LEE, J. et al., 2006; NATARAJAN et al., 2014). A TEM é um importante evento para a progressão tumoral, já que capacita as células neoplásicas a invadir tecidos adjacentes, incluindo nichos metastáticos (SHIRKOOHI, 2013). Neste processo, ocorrem mudanças na expressão, distribuição e/ou função de proteínas, como E-caderina, N-caderina e β -catenina, sendo estas alterações mediadas por ativação de fatores de transcrição (Snail, Slug e Twist), cuja expressão é regulada por vias de sinalização, como HH (LIU, Y. et al., 2015; NATARAJAN et al., 2014; SAVAGNER, 2010; YUE et al., 2014). Diversos estudos demonstraram que a via de sinalização HH pode participar na regulação do processo TEM em células tumorais, como no carcinoma de pâncreas (TANG et al., 2015), carcinoma hepatocelular (CHEN, J. et al., 2014), tumor neuroendócrino gastrointestinal (TANG et al., 2015) e no carcinoma escamocelular de pulmão (YUE et al., 2014).

A proliferação celular aberrante é, também, um evento preponderante no contexto dos tumores malignos (VALVERDE; FREITAS et al., 2016), sendo que a capacidade proliferativa das células neoplásicas representa uma estratégia amplamente estudada como indicadora do prognóstico (BOLOGNA-MOLINA et al., 2013; VALVERDE; FREITAS et al., 2016). Além disso, a proliferação das células tumorais pode ser regulada pela via HH no câncer de mama (CHAI et al., 2013) e no adenocarcinoma pancreático (FEITELSON et al., 2015). Sabe-se que esta via está ativada em CEB (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL et al., 2011) e, portanto, pode participar nos eventos da TEM e proliferação celular neste tumor, contribuindo, dessa forma, para os processos de migração, invasão e metástase (COSTA et al., 2015; LEE, A. et al., 2015; ZHANG, S. et al., 2014; ZHOU, X et al., 2015).

Diante das evidências atuais supracitadas e sabendo-se que a relação de moléculas HH com TEM e proliferação celular ainda não foi estudada em CEBs, o presente trabalho avaliou a relação de GLI1, principal fator de transcrição ativador da via HH, com marcadores teciduais da transição epitelial-mesenquimal e potencial proliferativo neste tumor.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE BOCA

O câncer é um problema de saúde pública e é considerado a segunda maior causa de morte no Brasil. Estima-se, somente em 2018, a ocorrência de 600 mil novos casos da doença no país, o que mostra o quanto os dados são alarmantes (INCA, 2017). Destaca-se ainda, sem contar os casos de câncer de pele não melanoma, que o câncer da cavidade oral em homens é o quinto mais frequente e o décimo primeiro mais frequente em mulheres, na região Nordeste. Adicionalmente, a Bahia é o estado responsável pelo maior número de casos nesta região, ocupando o sexto lugar na prevalência em todo o país (INCA, 2017).

O CEB é o tumor maligno com maior frequência na região de cabeça e pescoço (FAN, S. et al., 2011; PARRIS et al., 2014). Esta neoplasia é responsável por uma grande incidência de óbitos em todo mundo, constituindo a oitava causa de morte por câncer (QUAN, J. et al., 2012). Segundo Parris et al. (2014), aproximadamente 260 mil novos casos e 124 mil óbitos relacionados ao CEB são registrados anualmente, no mundo. A incidência dos tumores de boca tem grande variação geográfica e está fortemente associada à exposição aos fatores de risco (HUBER; TANTIWONGKOSI, 2014).

Os principais fatores de risco associados ao CEB são o uso do tabaco, álcool e fatores genéticos (VARGAS-FERREIRA et al., 2012). O tabaco e o álcool, quando usados de forma independente, aumentam o risco deste tumor, entretanto apresentam um efeito sinérgico quando usados de forma combinada (OLIVEIRA, J. et al., 2015). Observa-se, dessa forma, que indivíduos que consomem dois ou mais maços de cigarro e mais de quatro doses de bebidas alcoólicas por dia apresentam trinta e cinco mais chances de desenvolver CEB (HUBER; TANTIWONGKOSI, 2014; OLIVEIRA, J. et al., 2015).

O CEB é mais comum em homem entre a sexta e sétima década de vida e se localiza com maior frequência na língua, preferencialmente na borda posterior, podendo ocorrer também na mucosa jugal, assoalho da boca e palato duro e mole (RIKARSEN et al., 2014; SANTOS-SILVA et al., 2014). Entretanto, atualmente, tem se observado casos de CEBs em populações mais jovens e acredita-se que, nestes casos, estes tumores apresentam fatores etiológicos distintos dos tumores em indivíduos mais velhos, como

infecções pelo HPV, predisposição genética, alterações imunológicas e nutricionais (BODNER et al., 2014; SANTOS et al., 2016).

Histologicamente, o CEB apresenta características semelhantes a carcinomas encontrados em outros sítios do corpo. Este tumor apresenta-se como uma proliferação de células epiteliais malignas na forma de ninhos, cordões ou pequenos grupos isolados que invadem a membrana basal em direção ao tecido conjuntivo e apresentam alterações em sua morfologia, como hiperchromatismo, aumento de figuras de mitose, típicas ou atípicas e pleomorfismo nuclear e celular (EL-NAGGAR et al., 2017). De acordo com o grau de queratinização, pleomorfismo nuclear e celular e atividade mitótica, o CEB pode ser classificado em três categorias: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado. O bem diferenciado se caracteriza pela semelhança com o epitélio escamoso normal e atípias celulares muito leves; o moderadamente diferenciado contém pleomorfismo nuclear distinto, atividade mitótica presente, incluindo figuras atípicas e pouca queratinização. O pouco diferenciado predominam células imaturas, com numerosas figuras de mitose e queratinização, praticamente, ausente (BONHIN et al., 2014; EL-NAGGAR et al., 2017; FAN, S. et al., 2011).

De acordo com Sharma et al. (2013), o CEB exibe características histológicas variadas em áreas diferentes dentro do mesmo tumor. O *front* de invasão constitui a área com maior profundidade de invasão dos carcinomas (COSTA et al., 2015; RIVERA; VENEGAS, 2014) e é considerada a região mais representativa da neoplasia, podendo ser identificada por quatro características: o grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, infiltração linfocitária e padrão de invasão (RIVERA; VENEGAS, 2014). Nesta área, pode-se observar diversos eventos importantes para progressão tumoral, como ganho e perda de moléculas de adesão, secreção de enzimas proteolíticas, aumento de proliferação celular e iniciação de angiogênese (SHARMA et al., 2013).

Clinicamente, o CEB se apresenta como uma lesão persistente, nodular ou úlcera endurecida. Os sintomas geralmente são ausentes nos estágios iniciais da doença, mas tornam-se frequentes com a invasão local. Pode-se observar dor, disfagia, otites, perda de peso e trismo (HUBER; TANTIWONGKOSI, 2014). Por sua vez, quanto à taxa de sobrevida em cinco anos para os tumores de cabeça e pescoço, nota-se que permanece baixa e sem alterações nas últimas décadas (em torno de 50 a 60%), em parte devido à recorrência loco-regional do tumor, nos dois anos iniciais de tratamento (PARRIS et al., 2014). Além disso, a alta taxa de mortalidade dos pacientes com câncer de boca está

associada, principalmente, com a detecção tardia e a presença de doença regional ou distante no momento do diagnóstico (CAMPION et al., 2016; MAGALHAES; GLOGAUER; GLOGAUER, 2014).

O plano de tratamento do CEB é baseado na avaliação do tamanho da lesão primária (T), metástase nos linfonodos regionais (N) e presença de metástase distante (M) (SHARMA et al., 2013). Dessa forma, esta neoplasia pode ser tratada por uma ou pela combinação de três modalidades terapêuticas: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. O uso de um único protocolo de tratamento ou de um regime depende não apenas do tamanho, localização e do estágio primário tumoral, mas também da condição do paciente, da tolerância e da vontade de aderir ao tratamento (HUBER; TANTIWONGKOSI, 2014).

Diante disso, é clara a necessidade de novas ferramentas auxiliares para o diagnóstico precoce e melhor previsibilidade do tratamento de pacientes com tumores malignos. Investigações de mudanças fenotípicas nas células tumorais que possam refletir no prognóstico são importantes para a melhoria das decisões clínicas e a consequente redução da morbi-mortalidade dos pacientes oncológicos (MATSUOKA et al., 2015; OLIVEIRA; RIBEIRO-SILVA, 2011). Do mesmo modo, observa-se, ainda, que estudos que buscam caracterizar as principais vias de sinalização que regulam a progressão tumoral podem contribuir para um tratamento mais personalizado e menos agressivo para estes pacientes (SOUZA et al., 2014).

2.2 VIA DE SINALIZAÇÃO HEDGEHOG

A via de sinalização Hedgehog (HH) foi primeiramente identificada em 1980, por Christiane Nüsslein-Volhard e Eric Wieschausin, através de um estudo genético para examinar o desenvolvimento segmentar em moscas da fruta, do gênero *Drosophila melanogaster* (ABIDI, 2014; KASAI, 2016; WU, F. et al., 2017). A estrutura básica desta via de sinalização é largamente conservada entre diversas espécies, entretanto divergências evolutivas têm ocorrido, particularmente nos vertebrados. Nos mamíferos, os componentes centrais desta via de sinalização são os três ligantes HH, *Sonic Hedgehog* (SHH), *Desert Hedgehog* (DHH) e *Indian Hedgehog* (IHH), dois receptores transmembrânicos *Patched* (PTCH), PTCH1 e PTCH2, e três fatores de transcrição *Glioma-associated oncogene homolog* (GLI), GLI1, GLI2 e GLI3 (HU et al., 2015). Embora esses fatores de transcrição compartilhem longas sequências homólogas, e também apresentem similaridade em sequências de ligação ao DNA, eles desempenham

papéis distintos no desenvolvimento, TEM e progressão do câncer. O GLI1 apresenta apenas o domínio ativador, enquanto que GLI2 e GLI3 possuem o domínio repressor e ativador (ZHANG; TIAN; XING, 2016).

A via HH desempenha um importante papel no desenvolvimento embrionário, na diferenciação e proliferação do cérebro e medula espinhal e na regulação do padrão de crescimento dos órgãos internos e dos membros (HU et al., 2015). Esta via mantém-se inativa após a embriogênese, entretanto, em alguns tecidos adultos, como no fígado (MACHADO; DIEHL, 2017), ela participa da regulação das células-troncos e também está envolvida no processo de homeostasia e reparo tecidual (ABIDI, 2014; ONISHI; KATANO, 2014; YAO; CHUANG, 2015). Nesse contexto, a reativação inapropriada e a sinalização aberrante da via, em tecidos adultos, está associada com o desenvolvimento de diversos tumores malignos, como o carcinoma de células basais (ABIDI, 2014), meduloblastomas (RALEIGH et al., 2017), carcinoma de pulmão (ABE; TANAKA, 2016), carcinoma escamocelular de boca (CAVICCHIOLI BUIM, GURGEL et al., 2011), carcinoma de pâncreas (ONISHI; KATANO, 2014), carcinoma de mama (CHAI et al., 2013), carcinoma col retal (WU, C. et al., 2017) e leucemias (KASAI, 2016; SHEVDE; SAMANT, 2014).

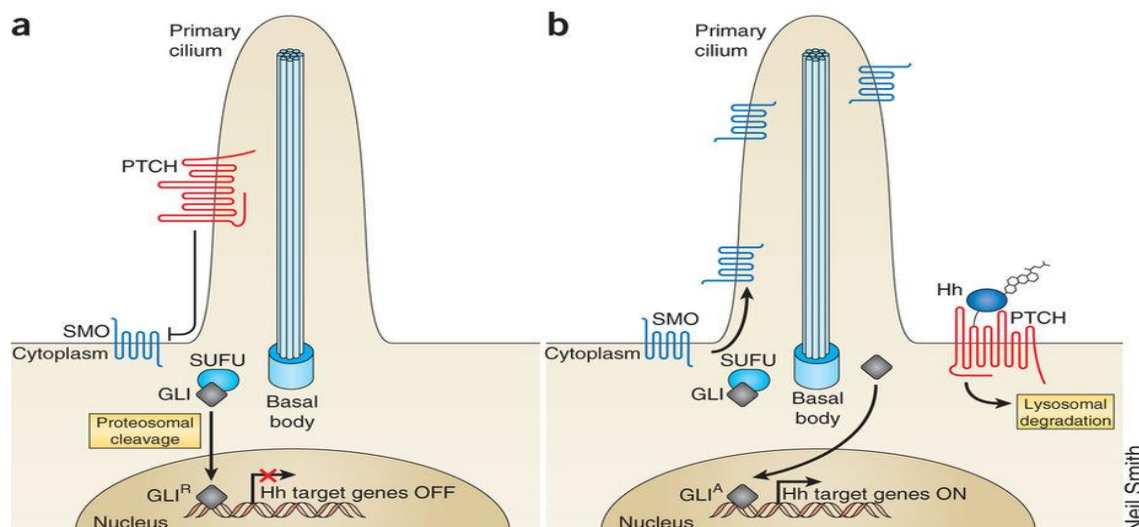
Classicamente, a via HH funciona no cílio primário que é uma organela microtubular conservada entre os vertebrados, representada por uma extensão da membrana plasmática (HAN et al., 2017). Esta estrutura fornece um compartimento celular específico para a distribuição e função dos componentes da via (WU, F. et al., 2017) e sua descoberta teve um profundo impacto no entendimento desta via no contexto das doenças (MUKHOPADHYAY; ROHATGI, 2014), como as ciliopatias (REITER; LEROUX, 2017).

Os ligantes HH apresentam expressão de padrões e funções distintos (ABE; TANAKA, 2016), sendo o ligante SHH a proteína melhor caracterizada atualmente, cuja participação já está bem descrita no desenvolvimento dos membros e tubo neural na embriogênese, determinação do tipo celular no sistema nervoso, além de participar da morfogênese dos pulmão, dentes, pele e cabelos. Por sua vez, o IHH está relacionado ao desenvolvimento de condrócitos e desenvolvimento esquelético e o DHH à espermatogênese e à formação da bainha do nervo em células de Schwann (BANGS; ANDERSON, 2017; DESSINIOTI; ANTONIOU; STRATIGOS, 2017; ZHANG, X. et al., 2017).

A transdução do sinal da via HH no contexto do cílio primário está ilustrada esquematicamente na Figura 1. Na ausência do ligante HH, PTCH1 encontra-se no interior do cílio e promove a supressão da atividade de *Smoothed* (SMO) (ONISHI; KATANO, 2014). Neste estado repressor, o regulador negativo da via *Suppressor of fused* (SUFU) sequestra os fatores de transcrição GLI no citoplasma, na base do cílio primário. Desse modo, a formação do complexo de proteínas SUFU-GLI permite a fosforilação das proteínas GLI pela proteína quinase A (PKA), glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK3 β) e caseína quinase 1 (CK1) (ZHANG, X. et al., 2017). As proteínas GLI são clivadas por ligases ubiquitina, gerando isoformas repressoras transcricionais (GLI_R) (WU, F. et al., 2017), que previnem e interrompem a expressão de genes alvos da via HH (ONISHI; KATANO, 2014; WESSLER et al., 2017) (Figura 1A).

A via de sinalização HH é ativada através da ligação do ligante HH ao seu receptor Patched1 (PTCH1). Este processo é facilitado por diversas proteínas acessórias, incluindo *Cell-adhesion-molecule-related/downregulated by oncogenes* (Cdo), *Biregional Cdon-binding protein* (Boc), *Growth Arrest Specific 1* (Gas 1) e *glipcan-5* (GPC 5), facilitando uma ligação de grande afinidade entre o ligante HH e PTCH1 (TEPERINO et al., 2014; XAVIER et al., 2016). Na presença do ligante HH, a inibição de SMO por PTCH1 é liberada. Segundo Yao e Chuang (2015), o mecanismo molecular pelo qual PTCH1 regula a atividade de SMO permanece um enigma. Isso porque, considerando que PTCH1 não interage diretamente com SMO, acredita-se que uma pequena molécula ou moléculas reguladas por PTCH1 medeiam à interação entre PTCH e SMO. Com a liberação e ativação de SMO, PTCH1 é internalizado e degradado e SMO é mantido no cílio primário. Os fatores de transcrição GLI são processados e a forma ativada (GLI_A) é translocada para o núcleo, levando a transcrição de genes alvos, como Snail (GOYAL et al., 2016; ZHANG, X. et al., 2017), BCL2 (SONG, M. et al., 2013), Ciclina D1 (BERMUDEZ et al., 2013; ONISHI; KATANO, 2014), que desempenham um importante papel na carcinogênese (ONISHI; KATANO, 2014; WESSLER et al., 2017; WU, C. et al., 2017; YAO; CHUANG, 2015) (Figura 1B).

Figura 1 Transdução do sinal da via Hedgehog. (A) Na ausência do ligante HH, PTCH1 encontra-se no interior do cílio e promove a supressão da atividade de SMO. GLI permanecem no citoplasma, na base do cílio primário, onde é clivado, gerando a forma repressora (GLI_R) (B) Na presença do ligante HH, a inibição de SMO por PTCH1 é liberada. SMO é mantido no cílio primário e os fatores de transcrição GLI são processados para a forma ativada (GLI_A), que é translocada para o núcleo, levando a transcrição de genes alvos.



Fonte: Amakye; Jagani; Dorsch (2013).

Segundo Teperino et al. (2014), a via de HH pode ser ativada de diferentes formas: canônica e não canônica, sendo que, na primeira, a ativação é mediada por um dos ligantes, enquanto que, na segunda, não há participação de ligantes e a translocação das proteínas nucleares GLI é mediada por eventos que interferem na sinalização HH, mas não necessariamente envolve os componentes desta cascata, como por exemplo, a ativação mediada por TGF- β ou mutações em receptores PTCH (JAVELAUD; PIERRAT; MAUVIEL, 2012). Independente da forma de ativação, a atividade desta via estimula processos celulares que favorecem o crescimento das células tumorais, disseminação e resistência a drogas (SHEVDE; SAMANT, 2014).

Em adição, os sinais Hedgehog podem ser mediados de forma autócrina, parácrina e parácrina-reversa. Neste último caso, as células estromais sinalizam para as células tumorais (THEUNISSEN; SAUVAGE, 2009; WU, F. et al., 2017). Em tumores malignos, a via HH participa através de diferentes mecanismos. No câncer de pâncreas, por exemplo, a ativação HH é mediada pelo ligante SHH (BAI et al., 2016), enquanto mutações somáticas em PTCH1 e SMO já foram descritas em carcinoma de célula basal e meduloblastoma (ABE; TANAKA, 2016). Em CEB, o mecanismo de ativação ainda não é completamente compreendido, mas estudos de nossa equipe já demonstraram que tanto células tumorais quanto estromais podem ser fonte de ligantes HH (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL et al., 2011; VALVERDE; PEREIRA et al., 2016).

A ativação aberrante da via HH também pode estar associada com metástase, migração e angiogênese em CEB (FAN, H-X. et al., 2014). Isto se deve ao fato da via HH está relacionada à regulação de outras vias de sinalização como *Wingless Type*

(WNT) (SCHNEIDER et al., 2010), Fator de transformação do crescimento beta-1 (TGF- β 1) (FAN, Q. et al., 2010) e com o processo de TEM (YUE et al., 2014). A via HH pode regular o processo de TEM em diversos tipos de carcinoma, como de pulmão (YUE et al., 2014), bexiga (ISLAM et al., 2016), fígado (CHEN, J.-S. et al., 2014) e pâncreas (LEI et al., 2013). Em CEB, esta relação ainda não foi bem explorada e os resultados limitam-se a descrição de ensaios *in vitro* 2D com linhagens de carcinoma de língua, cujos resultados apontam que a atividade HH pode estar relacionada a TEM (XIE et al., 2016). Em outro estudo, foi analisada apenas a associação entre a imunexpressão de E-caderina, GLI1 e SHH (FAN, H-X. et al., 2014), sem avaliar outras moléculas envolvidas na TEM.

A via HH regula a expressão de genes relacionados ao ciclo celular como a ciclina D2 e N-Myc (JIA; WANG; XIE, 2015). A ativação aberrante desta via está relacionada a proliferação celular em diversos tumores, como no carcinoma de pequenas células de pulmão (LEEM et al., 2014) e no carcinoma escamocelular de pele (SUN, Q.; BAI; LV, 2016). Em CEBs, até o momento, não foi encontrado estudos que avaliaram a relação de moléculas HH com marcadores de proliferação celular, como MCM3 e Ki-67.

2.3 TRANSIÇÃO EPITELIAL-MESENQUIMAL

As células epiteliais apresentam-se organizadas em camadas que estão intimamente ligadas por estruturas especializadas de membrana. Esta característica se deve ao arranjo dos diferentes tipos de junções intercelulares (junções aderentes, desmossomos, junções comunicantes, junções estreitas), que são responsáveis pela adesão, vedação e comunicação entre células adjacentes (GUILLOT; LECUIT, 2013). Além disso, a estrutura do citoesqueleto associada com as junções intercelulares permite que os queratinócitos adquiram polaridade apical-basal (BOGACHEK; ANDRADE; WEIGEL, 2015; PANEBIANCO; SARACINO; PAZIENZA, 2014). Apesar disso, o epitélio pode sofrer alterações e adquirir características estruturais e funcionais de células mesenquimais, tanto em processos fisiológicos quanto patológicos (RIBATTI, 2017; VAQUERO et al., 2017).

A transição epitelial-mesenquimal (TEM) é um processo biológico reversível no qual células epiteliais adquirem propriedades mesenquimais, através da alteração de sua morfologia, arquitetura celular, adesão e capacidade migratória (GUJRAL et al., 2014; LEE, J. et al., 2006; SAVAGNER, 2010). A TEM é fundamental em diversos processos

fisiológicos, como nas mudanças morfo-genéticas durante o desenvolvimento embrionário e no processo de cicatrização tecidual (MONTANARI et al., 2017; VAQUERO et al., 2017), bem como tem sido observada em vários eventos patológicos, incluindo a fibrose tecidual e a metástase em tumores malignos (YEUNG; YANG, 2017).

Historicamente, pesquisas sobre a TEM surgiram a partir da década de 20, através de numerosas observações sobre o desenvolvimento embrionário precoce, destacando-se, nesse período, o trabalho de Jahannes Holtfreter sobre a formação e diferenciação do embrião. Por volta da década de 60, a pesquisadora Elizabeth Hay descreveu, pela primeira vez, em seu estudo com embrião de galinha, que as células epiteliais podem sofrer uma “transformação” fenotípica e dar origem ao mesoderma embrionário (BARRIERE et al., 2015; KOVACIC et al., 2012; SVOBODA; GORDON, 2008). Ao longo dos anos, o termo "transformação" foi substituído por "transição", refletindo em parte a reversibilidade do processo de TEM (KALLURI; WEINBERG, 2009).

Além de ocorrer durante o desenvolvimento embrionário dos vertebrados e invertebrados (FRANCO-CHUAIRE; MAGDA CAROLINA; CHUAIRE-NOACK, 2013), a TEM pode ser ativada em condições de estresse celular, como durante o reparo tecidual e progressão dos tumores epiteliais (BOGACHEK; ANDRADE; WEIGEL, 2015; KALLURI; WEINBERG, 2009). Diante disso, em 2007, na conferência sobre de TEM, na Polônia e em uma reunião posterior, em 2008, no *Cold Spring Harbor Laboratories*, em Nova Iorque, foi proposta a classificação da TEM em três subtipos baseados no contexto biológico que elas ocorrem e nos processos funcionais distintos que resultam (KALLURI; WEINBERG, 2009; KIM, Y. et al., 2014; NAYAN et al., 2012).

A TEM tipo 1 está associada à embriogênese e a diversos processos relacionados a ela. Dentre estes, destaca-se: implantação do embrião, formação da placenta, migração de células da crista neural, formação do mesoderma, formação da valva cardíaca, palatogênese, desenvolvimento das glândulas salivares e desenvolvimento de órgãos que são organizados por diversos tipos celulares que compartilham de um fenótipo mesenquimal comum, produzidos no mesoderma e endoderma (KURIOKA et al., 2017; RIBATTI, 2017; SHIRKOOHI, 2013; ZHOU; ZHANG; HAN, 2014).

A TEM tipo 2 está associada à cicatrização, regeneração tecidual e fibrose, quando existe inflamação persistente. Nos tecidos epiteliais, este processo é mediado

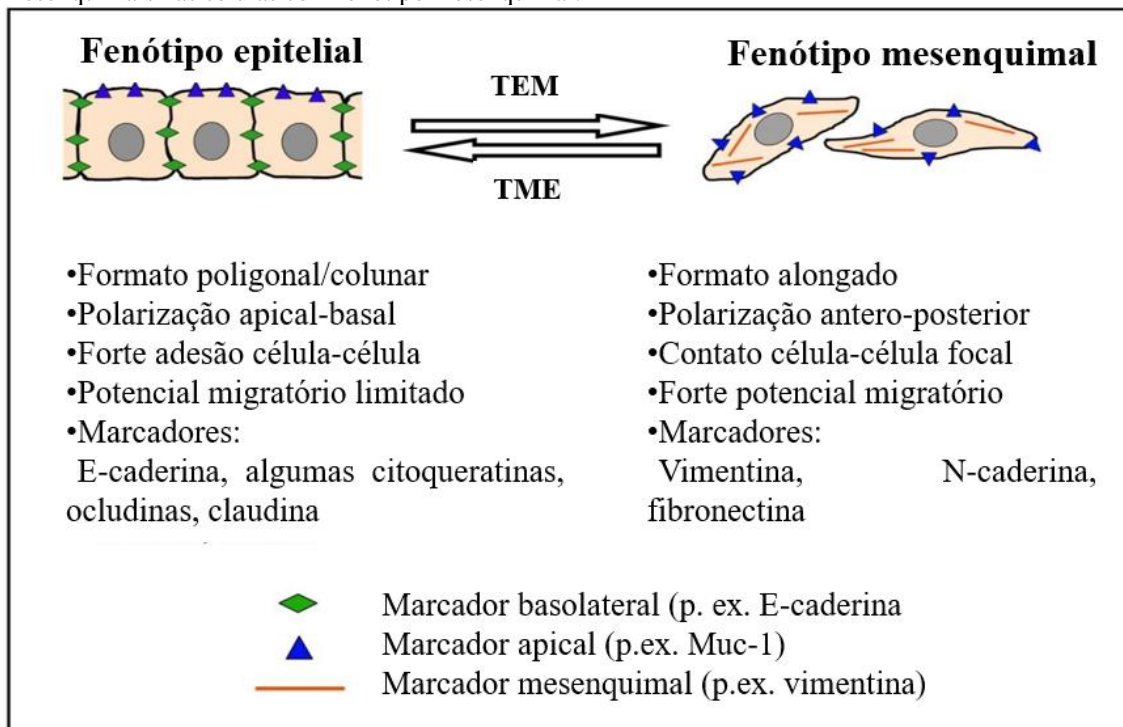
por células inflamatórias e fibroblastos que secretam diferentes componentes inflamatórios, os quais interagem com os componentes da matriz extracelular (MEC), incluindo colágeno, laminina, elastina e tenascina (SHIRKOOHI, 2013). A TEM pode ser identificada em associação com a fibrose em diversos órgãos, tais como rim, pulmão, fígado e intestino. Este tipo de TEM está associada com inflamação e geração de várias classes de moléculas inflamatórias na ativação de fibroblastos adjuvantes (miofibroblastos). As células endoteliais também podem ser submetidas a este processo de transição durante a fibrose (LEE; KIM; PARK, 2014; SHIRKOOHI, 2013).

A TEM tipo 3 está envolvida na progressão de tumores malignos e metástase (RIBATTI, 2017; SCANLON et al., 2013). A TEM, uma vez induzida nas células tumorais, permite que essas células escapem do tumor primário, migrem através da corrente sanguínea e alcancem sítios metastáticos. O processo de transição mesenquimal-epitelial (TME), dessa forma, compõe uma das etapas da cascata metastática e, ao alcançarem os ninchos secundários, estas mesmas células são capazes de adquirir novamente o fenótipo epitelial (KRAWCZYK et al., 2014). Sugere-se que a instabilidade genética e mudanças epigenéticas tornem as células tumorais responsivas aos sinais heterotípicos mediados por células estromais que induzem a TEM (SHIRKOOHI, 2013), como o TGF- β (NAKAZAWA; KYPRIANOU, 2017), SHH (BARRIERE et al., 2015) e as proteínas morfogenéticas ósseas (BMPs) (ZHANG, G. et al., 2018).

Com relação às mudanças estruturais nas células epiteliais, a ativação da TEM torna a célula epitelial mais alongada e em formato fusiforme, com aspecto semelhante aos fibroblastos, há perda da polaridade, formação de pseudopodia, reorganização do citoesqueleto e desestruturação da adesão célula-célula (GURZU et al., 2016; LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014). Em muitos casos, observa-se, também, a capacidade para degradar as proteínas da matriz extracelular (MEC), conferindo a estas células um comportamento invasivo (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014). Do ponto de vista molecular, a TEM é explicada pela perda dos marcadores epiteliais e ganho de marcadores mesenquimais (KURIOKA et al., 2017; PANEBIANCO; SARACINO; PAZIENZA, 2014; SILVA et al., 2014; VAQUERO et al., 2017; YEUNG; YANG, 2017). As primeiras alterações ocorrem nas junções aderentes com a perda de dois componentes principais, E-caderina e β -catenina. Além disso, o rompimento das junções estreitas também ocorre e leva a perda da polaridade apical-basal (VAQUERO

et al., 2017). A Figura 2 ilustra diferenças morfológicas e moleculares entre as células de fenótipo epitelial e mesenquimal.

Figura 2 Transição epitelial-mesenquimal (TEM) e Transição mesenquimal-epitelial (TME). Note presença de marcadores basolaterais e apicais nas células com fenótipo epitelial e marcadores apicais e mesenquimais nas células com fenótipo mesenquimal.



Fonte: Adaptado de Maier, Wirth e Beug, 2010.

O complexo caderina-catenina nas junções aderentes desempenha um importante papel na manutenção da homeostasia do tecido epitelial. A E-caderina é uma glicoproteína transmembranar, que através do seu domínio extracelular, promove a adesão entre células epiteliais adjacentes de maneira dependente de cálcio (CHAW et al., 2012; SHAHBAZI; PEREZ-MORENO, 2015). Intracelularmente, o componente citoplasmático da E-caderina liga-se a p120-catenina e a β -catenina e proporciona uma ligação com o citoesqueleto actínico (CHAW et al., 2012; MEHTA et al., 2015). A principal marca do processo de TEM é a redução da expressão de E-caderina (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014), que prejudica a adesão celular e libera a β -catenina do complexo caderina-catenina, translocando esta catenina para o núcleo, levando à ativação de genes da TEM (SCANLON et al., 2013).

A proteína β -catenina é o regulador central da via WNT (NOUBISSI et al., 2009; SONG, L. et al., 2015). Quando esta via é ativada, GSK3 β , um repressor tumoral, é fosforilado para uma forma inativa. Com a inativação de GSK3 β , a β -catenina não é

degradada e se acumula no citoplasma das células, transloca para o núcleo e se liga ao complexo proteico *T cell factor/lymphoidenhancer fator* (TCF/LEF), iniciando a transcrição de genes alvos, como Snail (LINS et al., 2016; ZHANG; TIAN; XING, 2016). A via WNT está também relacionada a diversas vias de sinalização durante a embriogênese e no desenvolvimento de neoplasias, incluindo a via HH. A ativação da via WNT dependente de GLI tem sido evidenciada durante a transição epitelial-mesenquimal, provavelmente através da ativação de fatores de transcrição da TEM e inibição da imunexpressão de E-caderina (NOUBISSI et al., 2009).

A expressão dos marcadores mesenquimais é também uma característica da TEM, dentre eles, fibronectina, N-caderina e vimentina, além da aquisição de um fenótipo fibroblastóide (RIBATTI, 2017). A N-caderina é uma glicoproteína dependente de cálcio que medeia à adesão intercelular em células neuronais e não neuronais. Esta proteína está relacionada à angiogênese e a manutenção da estabilidade dos vasos sanguíneos (BLASCHUK, 2014). Durante a TEM, há uma troca na expressão das caderinas, ou seja, a perda da expressão de E-caderina está intimamente relacionado ao aumento de expressão de N-caderina. Esta troca de expressão faz com que a célula epitelial consiga fazer interações heterotípicas com outras células (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014). Apesar de ser uma proteína de adesão, a interação celular promovida pela N-caderina é mais fraca do que a interação promovida pela E-caderina, conferindo às células em processo de transição, motilidade e invasividade (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014; NAKAZAWA; KYPRIANOU, 2017).

Segundo Lamouille, Xu e Derynck (2014), as mudanças na expressão gênica, que contribuem para a repressão do fenótipo epitelial e ativação do fenótipo mesenquimal no processo de TEM, envolvem reguladores centrais, incluindo os fatores de transcrição das famílias SNAIL (Snail e Slug), TWIST (Twist1 e Twist2) e ZEB (ZEB1 e ZEB2). Slug ou Snail2 foi inicialmente identificado na formação do mesoderma e na formação das células da crista neural no embrião. Este fator de transcrição está expresso no mesênquima craniofacial, no desenvolvimento ósseo, na saída do trato cardíaco e nos componentes mesenquimais nos pulmões, rins e intestino do embrião (SHIH; YANG, 2011). Os fatores de transcrição da família Snail reprimem a expressão dos genes que codificam as proteínas das junções epiteliais, desmontando as junções aderentes, desmossomos e as junções estreitas e levam à perda da polaridade apical-basal (YEUNG; YANG, 2017). Igualmente, interferem na progressão do ciclo

celular e contribuem para o movimento e sobrevivência celular (SCANLON et al., 2013).

Dessa forma, múltiplas vias de sinalização cooperam para o início e progressão da TEM (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014). A via de sinalização TGF- β está estabelecida como a principal indutora do fenótipo da TEM (NAKAZAWA; KYPRIANOU, 2017). Entretanto, diversas outras vias de sinalização também modulam a TEM e a TME, como a via Notch, WNT (KOVACIC et al., 2012), HH e BMP (BARRIERE et al., 2015). A regulação da TEM pela via de sinalização HH ainda é controversa. Alguns autores sugerem que o fator de transcrição GLI facilita a migração e invasão das células tumorais através da redução da E-caderina em melanoma e câncer de pâncreas (SUN, X.-D.; LIU; HUANG, 2013; YUE et al., 2014). Yamamichi et al. (2014), sugerem que a via HH regula a TEM em câncer de próstata. Contudo, Joost et al. (2012) propuseram que a inibição de GLI promove TEM em câncer de pâncreas.

Islam et al., (2016) avaliaram o papel da via HH na promoção da TEM, tumorigênese e progressão e aquisição de células-tronco tumoral no câncer de bexiga. Os autores concluíram que a indução da via HH por TGF- β 1 pode regular TEM e a tumorigenicidade nesta lesão e que a indução da TEM e da via HH por TGF- β 1 é dependente do tipo celular. Min et al., (2013) avaliaram o papel de GLI na promoção da TEM no carcinoma escamocelular esofágico e observaram que a alta expressão de GLI1 aumentou significativamente a expressão de vimentina e Snail e reduziu significativamente a expressão de E-caderina. Concluiu-se, nesse estudo, que GLI1 pode participar da invasão e metástase neste tumor através da TEM.

Yamamichi et al. (2014), por sua vez, investigaram como a via HH e a di-hidrotestosterona (DHT), um hormônio androgênico, atuam no estroma e no epitélio da próstata normal e como essa via de sinalização promove a TEM no câncer de próstata. Os autores observaram que tanto SHH quanto DHT induziram a expressão de N-caderina, vimentina e osteonectina, bem como notaram a expressão de GLI1 em células tumorais. Concluíram, assim, que a via HH e DHT levam a TEM no tumor de próstata e no estroma da próstata normal, e, portanto, devem desempenhar um importante papel na progressão do câncer de próstata.

2.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular é um evento biológico importante devido ao seu papel no crescimento e manutenção da homeostasia dos tecidos (CARREÓN-BURCIAGA et al.,

2015; DIEST, VAN; BRUGAL; BAAK, 1998). A replicação do DNA é um passo essencial da divisão celular e requer um controle rigoroso de todas as etapas (ZHONG et al., 2017). Este processo permite a cópia de uma dupla hélice de DNA em duas hélices, que são divididas em células “filhas” na mitose, ou seja, há uma transmissão fidedigna de informações hereditárias/genéticas da célula parental para a célula “filha” (LEMAN; NOGUCHI, 2013).

Nesse sentido, observa-se que a proliferação celular consiste em duas fases principais: interfase e mitose (SYRED et al., 2013). A célula que não está replicando apresenta-se na fase G_0 , em cuja etapa o DNA encontra-se enovelado, com atividade nuclear baixa (ALMEIDA et al., 2005). Na fase G_1 do ciclo celular, os processos regulatórios de replicação de DNA são iniciados (LEMAN; NOGUCHI, 2013). De acordo com Bruck e Kaplan (2015), a replicação do DNA é restrita à fase S, na qual todo genoma é desenrolado e duplicado para formar duas cópias “filhas”. Na fase G_2 , há síntese de componentes para mitose e erros de replicação ou qualquer DNA danificado são corrigidos (ALMEIDA et al., 2005; LEMAN; NOGUCHI, 2013). Após a divisão do material nuclear, há a citocinese, finalizando o ciclo celular. Desse modo, cada célula filha pode entrar na fase G_0 ou iniciar uma nova fase G_1 (DIEST, VAN; BRUGAL; BAAK, 1998).

As células tumorais, por sua vez, encontram-se com a atividade proliferativa desregulada (CARREÓN-BURCIAGA et al., 2015). Estas células não finalizam o ciclo de replicação celular, ou seja, não retornam à fase G_0 , e passam da mitose para uma nova fase G_1 (ALMEIDA et al., 2005). De acordo com Valverde; Freitas et al. (2016), a capacidade proliferativa das células neoplásicas, ou melhor, a fração de crescimento das células tumorais é considerada um importante indicador prognóstico, já que as proteínas envolvidas no ciclo celular desempenham um importante papel em eventos biológicos, como na formação e progressão tumoral, e podem ser utilizadas como marcadores de proliferação (ASHKAVANDI et al., 2013).

Marcadores como Ki-67 e *Proliferating Cell Nuclear Antigen* (PCNA), são os marcadores de fração de crescimento mais utilizados no diagnóstico de diversas neoplasias, a exemplo de osteosarcoma (WANG, X. et al., 2017), câncer gástrico (LI, N. et al., 2015), câncer de próstata (DILLEHAY; LU; DONG, 2014), câncer de mama (ÁCS et al., 2017) e câncer de pulmão (ISHIBASHI et al., 2017). Mais recentemente, *Minichromosome maintenance proteins* (MCM) tem despontado como um grupo de proteínas que melhor refletem a proliferação de células tumorais (CHENG, D. et al.,

2017), com estudos em carcinoma escamocelular de boca (VALVERDE; FREITAS et al., 2016), carcinoma de células renais (ZHONG et al., 2017), tumor de glândulas salivares (ASHKAVANDI et al., 2013) e linfoma (JANKOWSKA-KONSUR et al., 2015).

A proteína Ki-67 está presente no núcleo das células nas fases G₁, S e G₂ do ciclo celular e durante a mitose (JANKOWSKA-KONSUR et al., 2015). Esta proteína não está expressa em células quiescentes (fase G₀), por conta disso Ki-67 tem sido utilizado como um importante marcador de prognóstico tumoral (CARREÓN-BURCIAGA et al., 2015). Por outro lado, Ki-67 também pode estar expresso em células em apoptose ou quando a síntese de DNA é bloqueada (ASHKAVANDI et al., 2013). Outra desvantagem desta proteína é a possibilidade de Ki-67 oferecer informações imprecisas sobre a neoplasia maligna, já que ela incorpora a fração total de células dentro do ciclo celular, independentemente das células sofrerem diferenciação, seja ela de fenotipo maligno ou não (LAMEIRA et al., 2014; VALVERDE; FREITAS et al., 2016).

Por sua vez, PCNA é uma proteína reguladora do ciclo celular, que está superexpressa durante a fase G₁/S do ciclo celular, atingindo um pico e reduz a expressão na fase G₂/Mitose (WANG, X. et al., 2017). De acordo com Juríková et al. (2016), esta proteína está pouco expressa em células quiescentes. Entretanto, PCNA não é específica para proliferação, já que também está envolvida no reparo do DNA, ou seja, na ausência do ciclo celular, os níveis elevados desta proteína podem ser induzidos por fatores de crescimento ou como resultado de dano ao DNA (BOLOGNA-MOLINA et al., 2013) e, por isso, este marcador não é amplamente utilizado na rotina da patologia cirúrgica (JURÍKOVÁ et al., 2016).

Por fim, MCM3 é um membro de um grupo de proteínas MCM com papel importante na iniciação da replicação do DNA (REZVANI et al., 2015). De acordo com Jankowska-Konsur et al. (2015), esta proteína previne a re-replicação durante o mesmo ciclo celular. A expressão de MCM3 encontra-se ausente durante a fase G₀, entretanto a imunomarcagem apresenta-se positiva durante a proliferação celular de tecidos normais, células pré-malignas e neoplásicas (REZVANI et al., 2015). Em contraste com Ki-67, a expressão de MCM3 apresenta-se no início da fase G₁. Estas características tornam este marcador relevante para a caracterização da fração de crescimento tumoral (CARREÓN-BURCIAGA et al., 2015).

3 HIPÓTESE

Em carcinoma escamocelular de boca, a imunexpressão de GLI1 nuclear está relacionada a transição epitelial mesenquimal e manutenção do estado proliferativo tumoral.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a relação de GLI1 com marcadores teciduais da transição epitelial-mesenquimal e potencial proliferativo em CEBs.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a imunexpressão da proteína GLI1 em CEB;
- Analisar o padrão de expressão e localização das proteínas Snail, Slug, N-caderina, E-caderina, β -catenina e MCM3;
- Analisar a relação entre as proteínas GLI1 e marcadores de transição epitelial-mesenquimal (Snail, Slug, N-caderina, E-Caderina e β -catenina) e proliferação (MCM3), considerando-se a região de invasão e ilhas tumorais;
- Analisar a relação de GLI1, marcadores de transição epitelial-mesenquimal e proliferação, com os parâmetros clínicos desta casuística.

5 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS DA PESQUISA

Esta pesquisa foi realizada atendendo as diretrizes e normas da Resolução N° 466, de 12 de dezembro de 2012, do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz (IGM, Fiocruz, Bahia), sob parecer n° 2.295.634.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente trabalho é um estudo de corte transversal, retrospectivo e sua casuística foi composta inicialmente por 37 casos de CEB de pacientes admitidos no Hospital Aristides Maltez (HAM), na cidade Salvador, Bahia, no período compreendido de 2011 - 2013. Todos os pacientes incluídos na pesquisa foram esclarecidos quanto aos objetivos do trabalho e, se de acordo com as informações fornecidas, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecidos.

Os critérios de inclusão adotados para seleção dos casos que seguiram para a avaliação imuno-histoquímica dos marcadores de TEM e proliferação foram: tecido preservado e passível de análise microscópica, dados clínicos e histológicos disponíveis, diagnóstico de carcinoma escamocelular localizado na cavidade bucal – língua (dois terços anteriores), assoalho bucal, palato duro, mucosa jugal, região retromolar e gengiva e marcação positiva nuclear para o fator de transcrição GLI1. Como critérios de exclusão, considerou-se ausência de preservação do tecido, blocos de parafina com pouco material, lesões de recorrência do tumor, lesões localizadas em lábio e marcação negativa nuclear de GLI1.

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, a amostra deste estudo foi composta por 23 casos de CEBs, já que, após a reação imuno-histoquímica, 14 casos apresentaram marcação nuclear negativa para o fator de transcrição GLI1 e foram excluídos das análises.

5.3 OBTENÇÃO DE DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos (idade, sexo, localização, TNM, invasão muscular, óssea, vascular, perineural e consumo de tabaco e álcool) foram obtidos a partir dos prontuários dos pacientes, confirmados durante acompanhamento por um integrante da

equipe e pelo cirurgião responsável do HAM, no período de 2010-2013. O estadiamento dos pacientes foi categorizado de acordo com a TNM Classificação de tumores malignos para lábio e cavidade oral (GREENE et al., 2002).

5.4 ESTUDO HISTOLÓGICO

Para o estudo morfológico dos casos de CEB, cortes de 4µm de espessura obtidos dos espécimes fixados em solução de paraformaldeído 4% e embebidos em parafina, foram submetidos à coloração pela hematoxilina/eosina, conforme protocolo estabelecido pelo Serviço de Histotecnologia do IGM. Todos os cortes foram examinados por um patologista experiente para confirmar o diagnóstico e o grau de diferenciação tumoral, de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) (EL-NAGGAR et al., 2017):

- **CEB bem diferenciado:** quando as características arquiteturais e citológicas se assemelham ao epitélio escamoso normal.
- **CEB moderadamente diferenciado:** presença de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica, incluindo mitoses atípicas, menor queratinização.
- **CEB pouco diferenciado:** presença de células imaturas com numerosas mitoses típicas e atípicas e mínima queratinização.

5.5 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

As reações de imuno-marcação das proteínas GLI1, Snail, Slug, N-caderina, E-caderina, β-catenina e MCM3 seguiram as rotinas do Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) do IGM. Inicialmente, foram efetuadas reações de padronização para determinar as melhores diluições, métodos de recuperação antigênica e tempo de incubação de cada anticorpo. Dados sobre fabricante, clone, diluição, recuperação e controle positivo dos anticorpos estão descritos na tabela 1.

Cortes parafinados de 4µm de espessura foram submetidos ao método de imunoperoxidase. Inicialmente, realizou-se a desparafinização em xilol e reidratação com álcool. Seguida pela recuperação antigênica, em banho-maria por 45 minutos. Foi feito o bloqueio da peroxidase endógena (PeroxidaseBlockingSolution™, Dako, Santa Clara, USA), por 10 minutos, protegido da luz e o bloqueio das proteínas não-específicas (ProteinBlockingSolution™, Dako, Santa Clara, USA), por 20 minutos.

Para o anticorpo Snail, além do bloqueio das proteínas não-específicas citado, foi realizado bloqueio com BSA a 2%, por 10 minutos, a fim de reduzir o *background* das reações. Os anticorpos primários foram incubados, *overnight* (18 h), à temperatura de 4° C, em câmara úmida.

As lâminas foram incubadas com o sistema polimérico *AdvanceTM*, os reagentes *HRP Link e HRP Enzyme* (Dako, Carpinteria, USA), por 20 minutos cada, em temperatura ambiente. O kit LSAB, *Biotinylated Link e Streptavidin-HRP* (Dako, Carpinteria, USA), foi utilizado como sistema polimérico para o anticorpo Snail, por 20 minutos cada. A imunoreatividade das proteínas foi revelada com uma solução de 3,3-diaminobenzidina (Dako, Carpinteria, USA), por 5 minutos, em câmara escura. Por fim, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 1 minuto e montadas com bálsamo do Canadá sintético. Para o controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por soro animal de mesmo isotipo.

Tabela 1 Dados dos anticorpos utilizados

| Anticorpo | Marca | Clone | Controle | Recuperação | Diluição |
|-------------------|------------------|----------------------|--------------------|--------------------|-----------------|
| GLI1 | NovusBiologicals | Policlonal | Placenta | Citrato pH 6,0 | 1:600 |
| E-caderina | Dako | NHC38 | Mucosa Oral | Citrato pH 6,0 | 1:50 |
| β -catenina | BD | 14/ β -Catenin | Mucosa Oral | Citrato pH 6,0 | 1:100 |
| N-caderina | NovusBiologicals | EPR1792Y | Câncer de Próstata | Citrato pH 6,0 | 1:500 |
| Snail | Abcam | ab53519 | Câncer de Mama | Citrato pH 6,0 | 1:25 |
| Slug | NovusBiologicals | 1A6 | Ameloblastoma | EDTA pH 9,0 | 1:150 |
| MCM3 | Dako | 101 | Câncer de Mama | EDTA pH 9,0 | 1:50 |

5.6 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para avaliação semi-quantitativa das das proteínas estudadas, as lâminas foram escaneadas em microscópio Olympus BX61VSF e escâner VS110-AS (Olympus Corporation, Hambrugo, Alemanha) no aumento de 200x e analisadas com auxílio do programa Olyvia 2.4 (Olympus Corporation, Hambrugo, Alemanha). Todas as proteínas foram analisadas em locais coincidentes, em duas áreas específicas: *front* de invasão e

ilhas tumorais mais profundas. Cabe ressaltar que, em 4 casos, não foi possível localizar a região correspondente ao *front* de invasão e, nestes casos, avaliamos as ilhas tumorais. A semi-quantificação foi realizada por dois examinadores, sendo que um deles analisou apenas GLI1 e, o outro, fez a análise das demais proteínas, sem conhecimento dos resultados obtidos para GLI1. Áreas tumorais próximas a tecido muscular e adiposo não foram consideradas, neste estudo.

Inicialmente, foi realizada uma análise descritiva dos marcadores, considerando-se a localização da imunomarcagem (membrana, citoplasma e/ou núcleo) e os tipos celulares (células tumorais e/ou estromais). Para os marcadores positivos em membrana (E-Caderina, β -catenina, N-caderina) avaliamos ainda a continuidade da imunomarcagem. Positividade para os fatores de transcrição (Snail, Slug) foi considerada apenas quando estes estavam em núcleo. Os marcadores, em cada caso de CEB, foram classificados conforme critérios semi-quantitativos proposto por Zhang, S. et al. (2014) e descritos na Tabela 2.

Tabela 2 Escore de imuno-marcagem

| Escore | Células Positivas |
|---------------|---|
| 0 | 0-5% de células epiteliais imuno-marcadas |
| 1+ | 6 – 25% de células epiteliais imuno-marcadas |
| 2+ | 26 – 50% de células epiteliais imuno-marcadas |
| 3+ | >50% de células epiteliais imuno-marcadas |

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As informações clínico-patológicas e imuno-histoquímicas foram tabuladas em planilha eletrônica no programa Excel (Microsoft Office 2016). Em seguida, realizou-se a análise descritiva das variáveis estudadas, obtendo-se as frequências simples e relativas. A variável idade foi descrita por meio de média e desvio-padrão. Os dados foram organizados em tabelas de contingência ($r \times c$) e submetidos a análise estatística, através do programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 17.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL), utilizando o Teste Exato de Fisher, com extensão de Montecarlo. Para avaliar a correlação entre os marcadores, foi realizado o cálculo do coeficiente de ϕ (Phi), conforme tabela 3 abaixo. O nível de significância de 5% foi adotado para todos os testes, sendo considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

Tabela 3 Interpretação das medidas de associação

| Valores obtidos de ϕ | Interpretação |
|---|------------------------------------|
| + 0,70 ou maior | Associação positiva muito forte |
| + 0,50 a + 0,69 | Associação positiva forte |
| + 0,30 a + 0,49 | Associação positiva moderada |
| + 0,10 a + 0,29 | Associação positiva fraca |
| + 0,01 a + 0,9 | Associação positiva insignificante |
| 0,00 | Não há associação |
| - 0,01 a - 0,9 | Associação negativa insignificante |
| - 0,10 a - 0,29 | Associação negativa fraca |
| - 0,30 a - 0,49 | Associação negativa moderada |
| - 0,50 a - 0,69 | Associação negativa forte |
| - 0,70 ou menos | Associação negativa muito forte |

Fonte: James A. Davis (1971)

6 RESULTADOS

6.1 ASPECTOS CLÍNICOS E HISTOLÓGICOS DO CEB

A amostra deste estudo foi composta por 23 CEBs, sendo que 15 (65,22%) lesões acometeram homens e 8 (34,78%) mulheres. A idade dos pacientes variou de 41 a 78 anos, apresentando uma média 55,70 (DP±10,20) anos. O sítio anatômico predominante foi a língua (n=12; 52,17%), seguido pelo assoalho de boca (n=8; 34,78%), região retromolar (n=2; 8,70%) e gengiva (n=1; 4,35%). Dezesete pacientes (73,91%) relataram ser tabagistas, 15 (65,22%) etilistas, 15 (65,22%) tabagistas e etilistas.

Clinicamente, os tumores foram classificados de acordo com a TNM Classificação de tumores malignos para lábio e cavidade oral (GREENE et al., 2002). Com relação ao sítio do tumor primário, 14 CEBs (60,87%) foram considerados T1-T2, 9 (39,13%) foram classificados como T3-T4. Considerando o envolvimento de linfonodos regionais, 17 (73,91%) casos foram classificados como N1-N3, 6 casos (26,09%) não apresentaram comprometimento de linfonodo regional (N0). Em nenhum dos casos foi observada a metástase à distância. Dezenove (82,61%) tumores foram classificados no estágio clínico III-IV, 4 (17,39%) no estágio I-II.

Foi observada invasão muscular da neoplasia em 10 (43,48%) pacientes, invasão óssea em 4 (17,39%), perineural (n=1; 6,67%) e vascular (n=2; 8,70%). Em 2 anos de acompanhamento, 5 (21,74%) pacientes apresentaram recidiva de lesões e 5 (21,74%) foram a óbito por câncer.

De acordo com a classificação da OMS (EL-NAGGAR et al., 2017), 13 (56,52%) casos foram classificados como CEBs bem diferenciados, 9 (39,13%) como moderadamente diferenciado e 1 (4,35%) como pouco diferenciado. As características clínicas e histológicas dos CEBs estão descritas na tabela 4.

Tabela 4 Características clínicas e histológicas dos CEBs.

| Parâmetros Clínicos | Total (n) | % |
|----------------------------|-----------|-------|
| Sexo | | |
| Homem | 15 | 65,22 |
| Mulher | 8 | 34,78 |
| Tamanho | | |
| T1-T2 | 14 | 60,87 |
| T3-T4 | 9 | 39,13 |
| Metástase – Linfonodo | | |
| N0 | 6 | 26,09 |
| N1-N3 | 17 | 73,91 |
| Metástase - Distância | | |
| M0 | 17 | 78,26 |
| Mx | 6 | 26,08 |
| Estádio clínico | | |
| I-II | 4 | 17,39 |
| III-IV | 19 | 82,61 |
| Invasão muscular | | |
| Sim | 10 | 43,48 |
| Não | 13 | 56,52 |
| Invasão óssea | | |
| Sim | 4 | 17,39 |
| Não | 19 | 82,60 |
| Invasão vascular | | |
| Sim | 2 | 8,70 |
| Não | 21 | 91,30 |
| Invasão perineural | | |
| Sim | 1 | 6,67 |
| Não | 22 | 95,65 |
| Gradação histológica | | |
| Bem diferenciado | 13 | 56,52 |
| Moderadamente diferenciado | 9 | 39,13 |
| Pouco diferenciado | 1 | 4,35 |
| Sítio Anatômico | | |
| Língua | 12 | 52,17 |
| Assoalho bucal | 8 | 34,78 |
| Região retromolar | 2 | 8,70 |
| Gengiva | 1 | 4,35 |

6.2 IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS GLI1, SNAIL, SLUG, N-CADERINA, E-CADERINA, β -CATENINA E MCM3

6.2.1 GLI1

A imunoposição desta proteína foi observada principalmente no núcleo e citoplasma das células do parênquima tumoral. No estroma, observou-se marcação positiva desta proteína em vasos sanguíneos e em células semelhantes a fibroblastos (Figura 5). No *front* de invasão, o escore 3+ foi o mais prevalente (n=10; 52,63%), seguido pelo escore 1+ (n=5; 26,32%), 2+ (n=3; 15,79%) e 0 (n=1; 5,26%). Nas ilhas tumorais, o escore mais frequente foi 3+ (n=16; 69,56%), seguido do escore 2+ (n=5; 21,74%) e 1+ (n=2; 8,70%), como pode ser observado na Figura 3. Os escores de imunomarcação nas regiões de *front* e ilhas tumorais, considerando-se os graus de diferenciação dos CEBs estão ilustrados na Figura 4. O caso de CEB pouco diferenciado (n=1) apresentou escore 3+, tanto no *front* quanto nas ilhas tumorais.

6.2.2 Snail

A expressão positiva de Snail foi observada em todos os casos de CEB, tanto no *front* (n=19) quanto nas ilhas tumorais (n=23). A imunoposição desta proteína foi observada principalmente no núcleo e citoplasma das células tumorais. No estroma, observou-se marcação positiva desta proteína em células semelhantes a fibroblastos (Figura 5). No *front* de invasão, o escore 3+ (n=12; 68,42%) foi o mais prevalente, seguido pelo escore 2+ (n=5; 26,32%) e 1+ (n=2; 10,53%). Nas ilhas tumorais, os escores 3+ (n=22; 95,65%) e 2+ (n=1; 4,35%) foram os mais prevalentes (figura 3). Os escores de imunomarcação nas regiões de *front* e ilhas tumorais, considerando-se os graus de diferenciação dos CEBs estão ilustrados na Figura 4. O caso de CEB pouco diferenciado (n=1) apresentou escore 3+, tanto no *front* quanto nas ilhas tumorais.

6.2.3 Slug

No *front* de invasão, a expressão positiva para Slug foi encontrada em 11 (57,89%) casos, enquanto que nas ilhas tumorais, em 22 (95,65%) casos. Esta proteína apresentou-se como grânulos acastanhados no núcleo e no citoplasma das células neoplásicas. Em estroma tumoral, observou-se marcação em células semelhante a fibroblastos e marcação em vasos sanguíneos (Figura 5). No *front* de invasão, o escore 0

(n=8; 42,11%) foi o mais prevalente, seguido pelo escore 3+ (n= 7; 36,84%), 2+ (n=2; 10,53%) e 1+ (n=2; 10,53%). Já nas ilhas tumorais, o escore 3+ (n=12; 52,17%) foi o mais prevalente, seguido pelo escore 1+ (n= 6; 26,09%), 2+ (n= 4; 17,39%) e 0 (n=1; 4,35%) (figura 3). Os escores de imunomarcacão nas regiões de *front* e ilhas tumorais, considerando-se os graus de diferenciação dos CEBs estão ilustrados na Figura 4. O caso de CEB pouco diferenciado (n=1) apresentou escore 3+, tanto no *front* quanto nas ilhas tumorais.

6.2.4 N-caderina

No *front* de invasão, a expressão positiva para N-caderina foi encontrada em 6 (31,58%) casos, enquanto que nas ilhas tumorais, em 12 (52,17%) casos. A membrana e o citoplasma das células tumorais foram os locais de imunoexpressão desta proteína. Observou-se descontinuidade da integridade membranar em células neoplásicas no *front* de invasão enquanto que nas ilhas tumorais, observou-se a membrana contínua nessas células. No estroma, observou-se expressão positiva em células endoteliais e semelhante a fibroblastos (Figura 6). Entre as amostras com marcação positiva para este anticorpo, o escore 1+ (n=4; 21,05%) foi o mais prevalente no *front* de invasão, seguido pelos escores 2+ (n=1, 5,26%) e 3+ (n=1, 5,26%). Nas ilhas tumorais, o escore 1+ (n=6; 26,09%) foi o mais prevalente, seguido pelos escores 2+ (n=5, 21,74%) e 3+ (n=1, 4,35%) (figura 3). Os escores de imunomarcacão nas regiões de *front* e ilhas tumorais, considerando-se os graus de diferenciação dos CEBs estão ilustrados na Figura 4. O caso de CEB pouco diferenciado (n=1) apresentou escore 1+ no *front* de invasão e escore 3+ nas ilhas tumorais.

6.2.5 E-caderina

A expressão de E-caderina foi observada em 5 (26,32%) casos de CEB, no *front* de invasão, e em 20 (89,96%) casos, nas ilhas tumorais. Em todas as amostras que apresentaram expressão positiva para esta proteína, a localização de imunoexpressão apresentou-se na membrana e em alguns casos, observou-se expressão no citoplasma das células neoplásicas. Vale ressaltar a descontinuidade da integridade membranar das células tumorais no *front* de invasão enquanto que nas ilhas tumorais, observou-se a membrana contínua nessas células. Não se observou expressão deste marcador no estroma tumoral (Figura 6). No *front*, o escore 0 (n=14; 73,68%) foi o mais

predominante, seguido pelo escore 1+ (n=4; 21,05%) e escore 2+ (n=1, 5,26%). Já nas ilhas tumorais, o escore 1+ (n=9; 39,13%) foi o mais frequente, seguido pelo escore 3+ (n=8; 34,78%) e escore 2+ (n=3; 13,04%) e 0 (n=3; 13,04%) (figura 3). Os escores de imunomarcção nas regiões de *front* e ilhas tumorais, considerando-se os graus de diferenciação dos CEBs estão ilustrados na Figura 4. No CEB pouco diferenciado (n=1) encontrou-se escore 0 no *front* de invasão e escore 2+ nas ilhas tumorais.

6.2.6 β -catenina

Nos casos que apresentaram expressão positiva para β -catenina, a localização da imunexpressão foi membranar e citoplasmática nas células tumorais. No *front* de invasão, a expressão em membrana foi encontrada em 12 (63,16%) casos e a expressão citoplasmática, em 11 (57,89%) casos de CEB, já nas ilhas tumorais, a expressão em membrana ocorreu em todos os casos (n=23), enquanto que em citoplasma se apresentou em 18 (78,26%). Observou-se descontinuidade na membrana das células tumorais no *front* de invasão, entretanto nas ilhas tumorais, a membrana apresentou-se contínua nessas células. A marcação nuclear foi escassa (<5% de células positivas) nas células tumorais. No estroma, foi observada expressão nuclear deste marcador em células semelhantes a fibroblastos (Figura 6). No *front*, a expressão membranar de β -catenina apresentou o seguinte escore: 1+ (n=10; 52,63%), 0 (n=7; 36,84%), 2+ (n=1; 5,26%) e 3+ (n=1; 5,26%). No citoplasma, o escore 0 (n=8; 42,11%) foi o mais prevalente, seguido pelo escore 1+ (n=6; 31,58%), 3+ (n=3; 15,79%) e 2+ (n=2; 10,53%). Nas ilhas tumorais, a expressão positiva em membrana apresentou os escores: 3+ (n=13; 56,52%), 2+ (n=5; 21,74%) e 1+ (n=5; 21,74%), e no citoplasma, os escores: 3+ (n=10; 43,48%), 1+ (n=5; 21,74%), 0 (n=5; 21,74%) e 2+ (n=3; 13,04%) (figura 3). Os escores de imunomarcção nas regiões de *front* e ilhas tumorais, considerando-se os graus de diferenciação dos CEBs estão ilustrados na Figura 4. O caso de CEB pouco diferenciado (n=1) apresentou, no *front* de invasão, escore 1+, na membrana e escore 0, no citoplasma, enquanto que, nas ilhas tumorais, observou-se escore 3+, em membrana e citoplasma.

6.2.7 MCM3

Todos os casos de CEB apresentaram marcação positiva nuclear para MCM3, tanto no *front* de invasão quanto nas ilhas tumorais. Não se observou expressão desta

proteína em células do estroma (Figura 6). No *front*, o escore 3+ (n=8, 42,11%) foi o mais frequente, seguido pelo escore 1+ (n=7; 36,84%) e escore 2+ (n=4; 21,05%). Já nas ilhas tumorais, observou-se os seguintes escores: 3+ em 17 (73,91%) casos, 2+ em 3 (13,04%) casos e 1+, também, em 3 (13,04%) casos (figura 3). Os escores de imunomarcção nas regiões de *front* e ilhas tumorais, considerando-se os graus de diferenciação dos CEBs estão ilustrados na Figura 4Figura 3. O caso de CEB pouco diferenciado (n=1) apresentou escore 3+ tanto no *front* quanto nas ilhas tumorais.

Figura 3 Escore de imunexpressão das proteínas GLI1, marcadores de TEM e MCM3, em região de *front* e ilhas tumorais. Escores: 0 = 0 - 5% de células imuno-marcadas; 1+ = 6 - 25% de células imuno-marcadas; 2+ = 26 - 50% de células imuno-marcadas e 3+ = >50% de células imuno-marcadas.

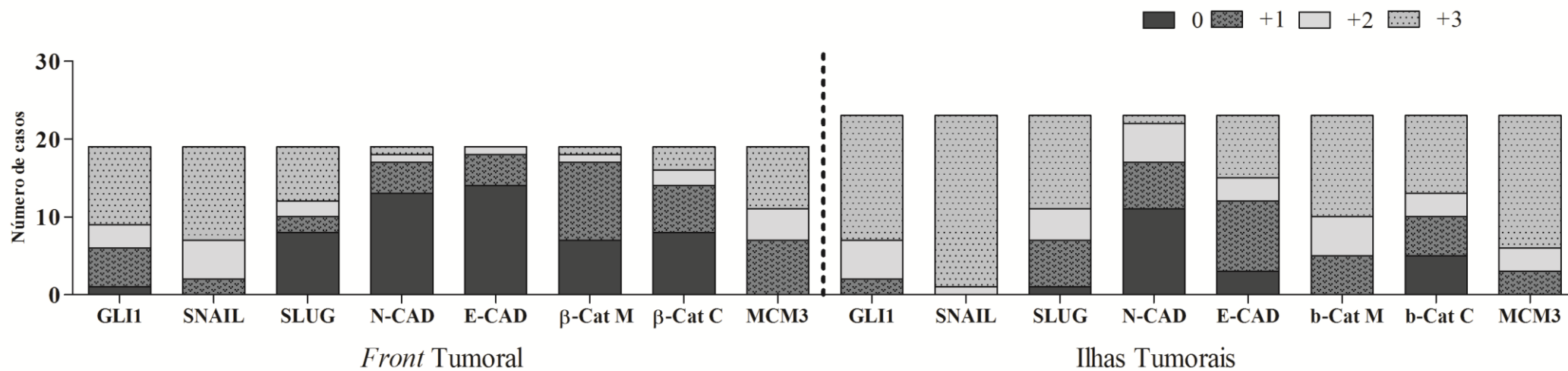


Figura 4 Escore de imunexpressão de GLI1, marcadores de TEM e MCM3, em região de *front* e ilhas tumorais, considerando-se os graus de diferenciação dos CEBs. (A) GLI1; (B) Snail; (C) Slug; (D) N-caderina; (E) E-caderina; (F) MCM3 e (G) β -catenina membrana e citoplasmática. BD= Bem diferenciado e MD= Moderadamente diferenciado.

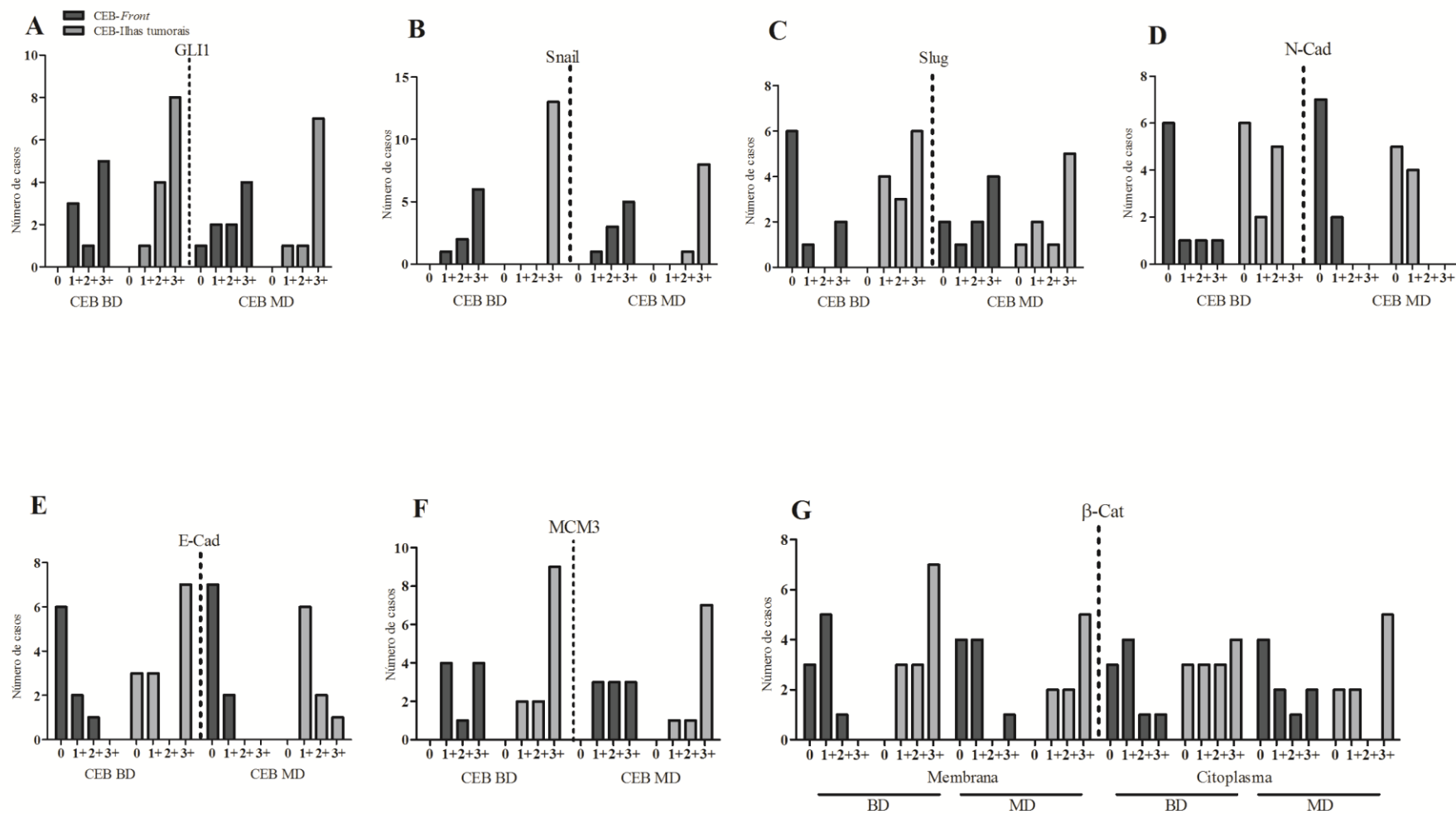


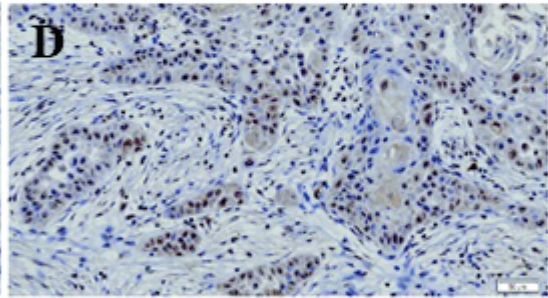
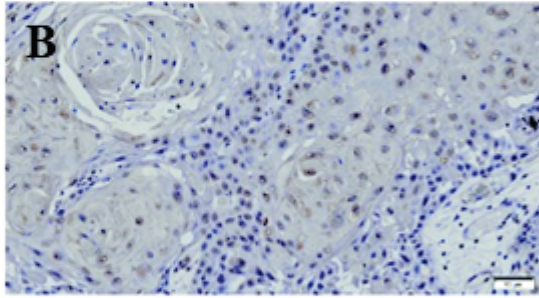
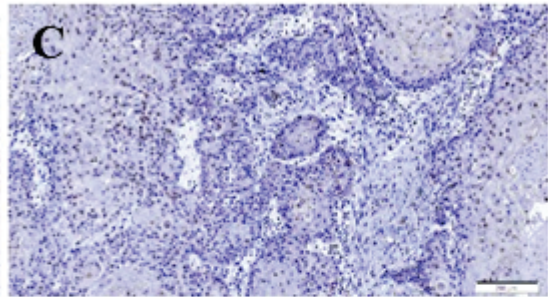
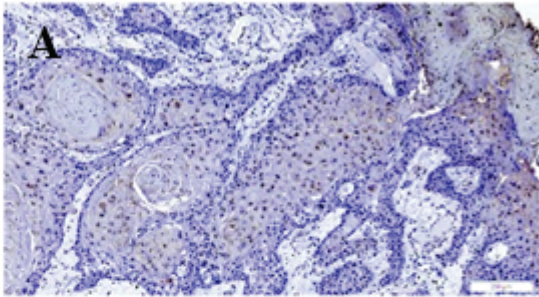
Figura 5 Imunomarcção de GLI1, Snail e Slug em CEBs. (A e B) Marcação nuclear de GLI1 em região de *front* de invasão no aumento de 20X e 40X, respectivamente. (C e D) Marcação nuclear de GLI1 em região de ilha tumoral no aumento de 20X e 40X, respectivamente. (E e F) Marcação nuclear de Snail em região de *front* de invasão no aumento de 20X e 40X, respectivamente. (G e H) Marcação nuclear de Snail em região de ilha tumoral no aumento de 20X e 40X, respectivamente. (I e J) Marcação nuclear de Slug em região de *front* de invasão no aumento de 20X e 40X. (K e L) Marcação nuclear de Slug nas ilhas tumorais no aumento de 20X e 40X, respectivamente.

Figura 6 Imunomarcção de N-caderina, E-caderina, β -catenina e MCM3 em CEBs. (A e B) Escassas marcações de N-caderina em região de *front* de invasão no aumento de 20X e 40X, respectivamente e ilha tumoral (C e D) no aumento de 20X e 40X, respectivamente. (E e F) Perda de expressão de E-caderina em região de *front* de invasão no aumento de 20X e 40X, respectivamente e marcação membranar e citoplasmática em ilha tumoral (G e H) - Aumento de 20X e 40X, respectivamente. (I e J) Perda de expressão de β -catenina em região de *front* de invasão e (K e L) marcação membranar e citoplasmática em ilha tumoral, respectivamente (Aumento de 20X e 40X). Marcação nuclear de MCM3 em região de *front* de invasão (M e N) e ilha tumoral (O e P), no aumento de 20X e 40X.

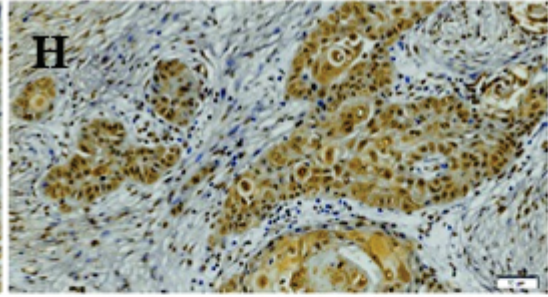
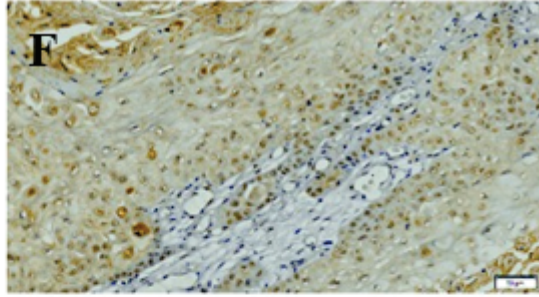
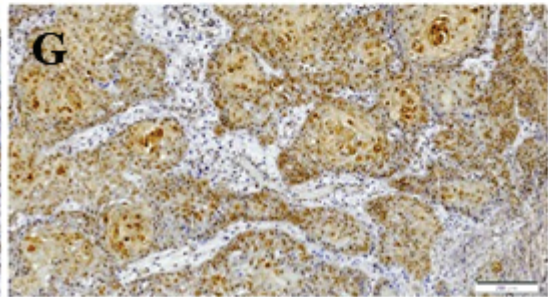
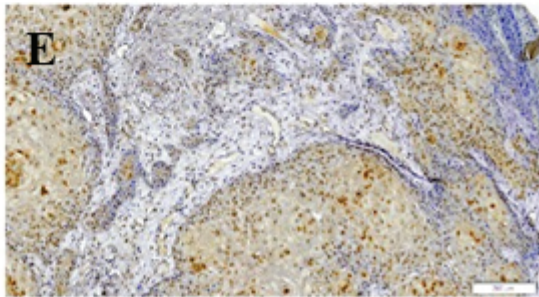
Front de Invasão

Ilhas Tumorais

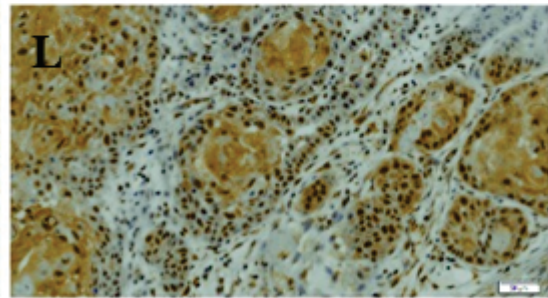
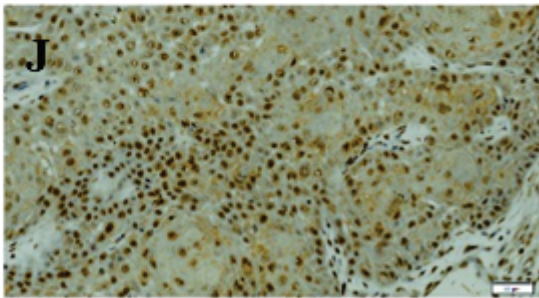
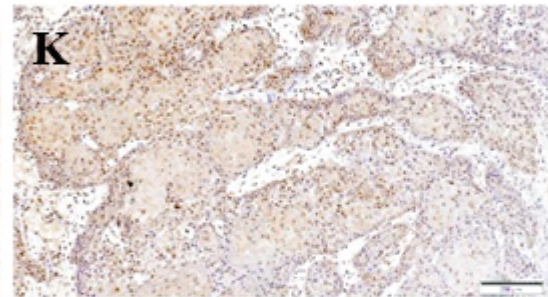
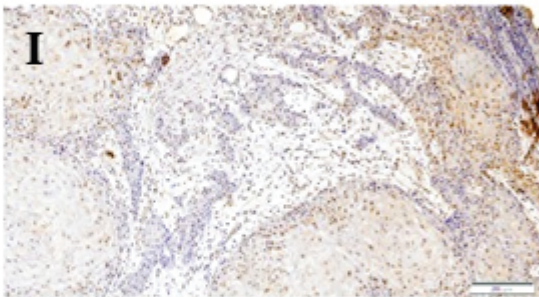
GLI1



Snail



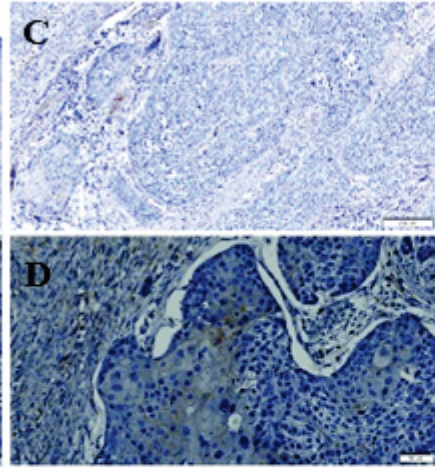
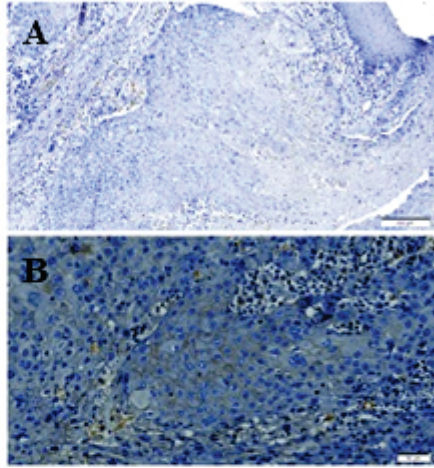
Slug



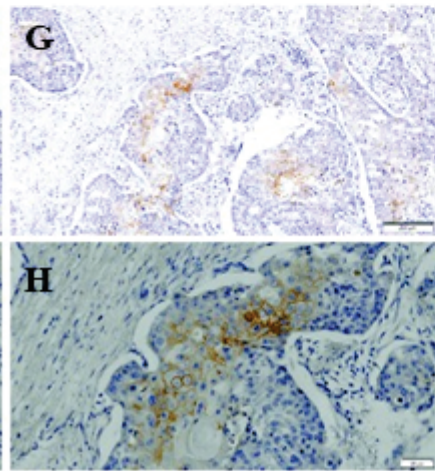
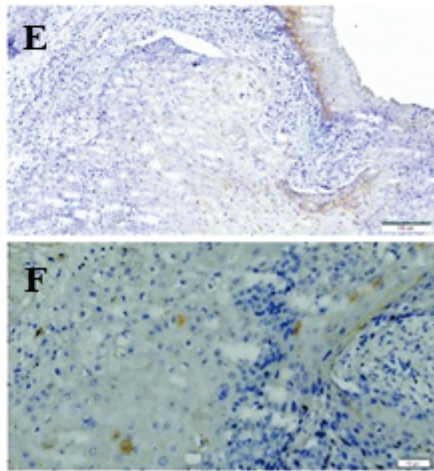
Front de Invasão

Ilhas Tumorais

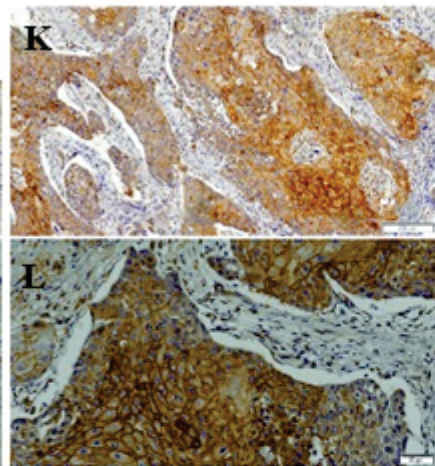
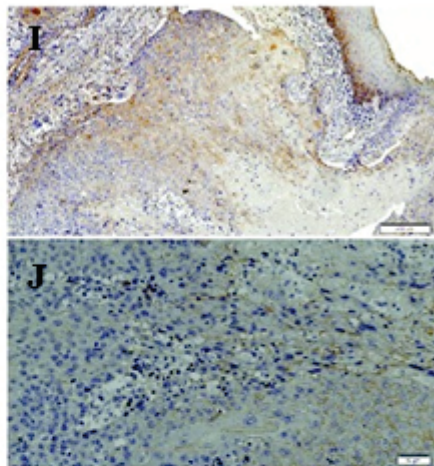
N-caderina



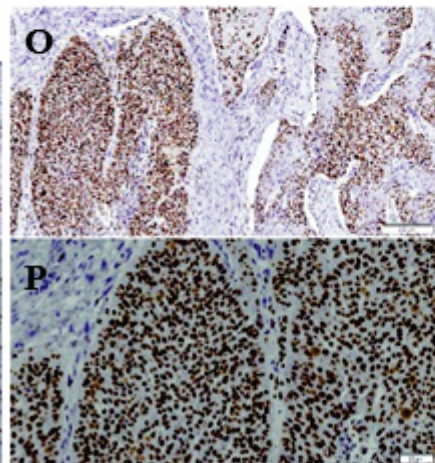
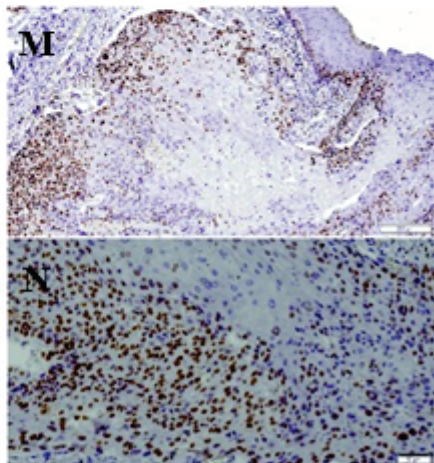
E-caderina



β -catenina



MCM3



6.3 CORRELAÇÃO ENTRE GLI1, MARCADORES DA TEM E MCM3

A associação entre a expressão de GLI1, marcadores de TEM e potencial proliferativo está descrita na Tabela 5. No *front* de invasão, as correlações entre GLI1 e N-caderina ($\phi=-0,68$; $p<0,001$), E-caderina ($\phi=-0,72$; $p<0,001$), β -catenina membranar ($\phi=-0,39$; $p<0,001$) e β -catenina citoplasmática ($\phi=-0,51$; $p=0,02$) apresentaram-se negativas e estatisticamente significante. Snail apresentou uma alta associação positiva com GLI1 ($\phi=0,90$; $p=0,43$), mas não estatisticamente significante. Observou-se também uma correlação entre a imunexpressão de GLI1 e Slug ($\phi=0,10$; $p=0,06$), porém não estatisticamente significante.

Já nas ilhas tumorais, houve correlações positivas e estatisticamente significantes entre GLI1 e Snail ($\phi=0,97$; $p=0,05$), β -catenina citoplasmática ($\phi=0,83$; $p=0,04$) e E-caderina ($\phi=0,42$; $p=0,01$). GLI1 e N-caderina ($\phi=-0,90$; $p<0,01$) estavam negativamente correlacionados. GLI1, Slug ($\phi=0,92$; $p=0,33$) e β -catenina membranar ($\phi=0,96$; $p=0,57$) exibiram uma associação muito forte, entretanto não se apresentaram estatisticamente significante.

No *front* de invasão, a associação entre MCM3/GLI1 ($\phi=0,88$; $p=0,75$) e MCM3/Snail ($\phi=0,70$; $p=0,26$) foi muito forte, mas sem significância estatística. MCM3 e Slug ($\phi=-0,35$; $p=0,006$) apresentaram uma correlação negativa e estatisticamente significante. N-caderina ($\phi=-0,82$; $p<0,001$) e E-caderina ($\phi=-0,84$; $p<0,001$) exibiram uma correlação negativa e estatisticamente significante com MCM3, sendo a associação considerada muito forte entre os marcadores. Observou-se correlação entre MCM3 e β -catenina membranar ($\phi=-0,17$; $p<0,001$) e β -catenina citoplasmática ($\phi=-0,55$; $p=0,007$).

Nas ilhas tumorais, observou-se as correlações entre MCM3 e GLI1 ($\phi=0,98$; $p=0,80$), Snail ($\phi=0,99$; $p=0,16$), Slug ($\phi=0,96$; $p=0,39$), β -catenina membranar ($\phi=0,96$; $p=0,51$) e β -catenina citoplasmática ($\phi=0,90$; $p=0,06$), mas sem significância estatística. Observou-se uma correlação positiva, forte e estatisticamente significante entre MCM3 e E-caderina ($\phi=0,54$; $p=0,02$) e uma correlação negativa, muito forte e estatisticamente significante entre MCM3 e N-caderina ($\phi=-0,87$; $p<0,001$).

No *front* de invasão foi possível observar uma correlação entre os marcadores de TEM da seguinte forma: E-caderina/Snail ($\phi=-0,77$; $p<0,001$), E-caderina/Slug ($\phi=0,52$; $p=0,01$), N-caderina/E-caderina ($\phi=0,99$; $p=1,00$), β -catenina membranar/E-caderina ($\phi=0,56$; $p=0,06$) e β -catenina citoplasmática/E-caderina ($\phi=0,90$; $p=0,15$) e, nas ilhas

tumorais, E-caderina/Snail ($\phi=0,45$; $p<0,001$), E-caderina/Slug ($\phi=0,73$; $p=0,48$), N-caderina/E-caderina ($\phi=-0,56$; $p=0,01$), β -catenina membranar/E-caderina ($\phi=0,62$; $p=0,14$) e β -catenina citoplasmática/E-caderina ($\phi=0,58$; $p=0,61$)

O grau de diferenciação tumoral, o tamanho do tumor, a presença de metástase em linfonodos e o estadiamento clínico foram associados com GLI1, marcadores de TEM e MCM3. Não se observou diferença estatística entre os graus de diferenciação tumoral com relação a expressão dos marcadores avaliados. No *front* de invasão, observou-se uma correlação entre a expressão de GLI1 ($p=0,01$) e β -catenina membranar ($p=0,02$) com o estadiamento clínico. Nas ilhas tumorais, houve uma correlação entre a β -catenina membranar com a presença de metástase em linfonodos ($p=0,04$) e estadiamento clínico ($p=0,05$). Adicionalmente, a imunexpressão de N-caderina com o tamanho do tumor apresentou significância estatística, tanto no *front* de invasão ($p=0,03$) quanto nas ilhas tumorais ($p=0,04$).

Tabela 5 Correlação entre a expressão de GLI1, marcadores de TEM e MCM3 em pacientes com CEB pelo Coeficiente de ϕ , em *front* de invasão e ilha tumoral

| | <i>Front de Invasão</i> | | | | | | <i>Ilha Tumoral</i> | | | | | |
|---|-------------------------|-------------------|--------|-------------------|------------|-------------------|---------------------|-------------------|--------|-------------------|------------|-------------------|
| | GLI1 | | MCM3 | | E-caderina | | GLI1 | | MCM3 | | E-caderina | |
| | ϕ | <i>P</i> | ϕ | <i>P</i> | ϕ | <i>P</i> | ϕ | <i>P</i> | ϕ | <i>P</i> | ϕ | <i>P</i> |
| GLI1 | - | - | 0,88 | 0,75 | - | - | - | - | 0,98 | 0,80 | - | - |
| Snail | 0,90 | 0,43 | 0,70 | 0,26 | -0,77 | <0,001* | 0,97 | 0,05* | 0,99 | 0,16 | 0,45 | <0,001* |
| Slug | 0,10 | 0,06 | -0,35 | 0,006* | 0,52 | 0,01* | 0,92 | 0,33 | 0,96 | 0,39 | 0,73 | 0,48 |
| N-caderina | -0,67 | <0,001* | -0,82 | <0,001* | 0,99 | 1,00 | -0,90 | <0,001* | -0,87 | <0,001* | -0,56 | 0,01* |
| E-caderina | -0,72 | <0,001* | -0,84 | <0,001* | - | - | 0,42 | 0,01* | 0,54 | 0,02* | - | - |
| β-catenina membrana | -0,39 | <0,001* | -0,17 | <0,001* | 0,56 | 0,06 | 0,96 | 0,57 | 0,96 | 0,51 | 0,62 | 0,14 |
| β-catenina citoplasma | -0,51 | 0,02* | -0,55 | 0,007* | 0,90 | 0,15 | 0,83 | 0,04* | 0,90 | 0,06 | 0,58 | 0,61 |

*Valor estatisticamente significante ($p \leq 0,05$)

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos a relação de GLI1 com marcadores teciduais da transição epitelial-mesenquimal em 23 casos de carcinoma escamocelular de boca, através da expressão imuno-histoquímica dos marcadores GLI1, Snail, Slug, N-caderina, E-caderina e β -catenina. Investigamos também a relação deste fator de transcrição da via HH com o marcador MCM3, a fim de melhor compreender a participação de GLI1 na proliferação de células tumorais. Estes aspectos supracitados foram investigados em duas áreas distintas do tumor: *front* de invasão e ilhas tumorais.

No presente estudo, indivíduos do sexo masculino foram os mais acometidos pelo CEB e a média etária foi 55,7 anos. Resultados similares que indicam que homens entre a quinta e a sexta década de vida são o grupo de maior prevalência desta doença foram encontrados nos trabalhos de Lopes et al. (2017), Ozaki-Honda et al. (2017); Wang, B. et al. (2013). Os sítios anatômicos mais acometidos, língua e assoalho de boca, também foram os locais comumente descritos em outros estudos (CAMPION et al., 2016; LIMA et al., 2017; OLIVEIRA, J. et al., 2015). Em torno de 65,22% dos pacientes eram tabagistas e etilistas, esse resultado corrobora com estudos que indicam que o uso sinérgico de álcool e tabaco são os principais fatores etiológicos para o desenvolvimento desta neoplasia (HERNÁNDEZ-GUERRERO et al., 2013; JADHAV; GUPTA, 2013; SILVA et al., 2014). Quanto a gradação histológica, tumores bem diferenciados representaram o grau de diferenciação mais prevalente, corroborando com os trabalhos que descrevem este grau como o mais frequente (FAN, H-X. et al., 2014; LIU, C et al., 2013; ZHAO, D. et al., 2012).

Observamos uma associação estatisticamente significativa entre GLI1 e o estadiamento clínico corroborando com os trabalhos recentes que descrevem esta proteína como provável biomarcador relacionado à agressividade de tumores, como nos cânceres gástricos (LU et al., 2016), cervicais (CHEN, H. et al., 2016) e adenocarcinoma de pulmão (ISHIKAWA et al., 2014). Em CEBs, este aspecto ainda não foi completamente compreendido, apesar de Fan, H-X. et al. (2014) também ter ressaltado esta relação e, dessa forma, estudos com uma casuística maior, bem como coortes retrospectivas são necessários. Por outro lado, a compreensão de que β -catenina membranar está associada com o estadiamento clínico e presença de metástase em

linfonodos, como observado em nosso trabalho, foi previamente descrita (AYED-GUERFALI et al., 2014; KAUR et al., 2013; SASAYA et al., 2013).

A ativação aberrante da via HH desempenha um importante papel no desenvolvimento de diversos tumores malignos e sua reativação inapropriada pode estar relacionada com progressão tumoral e metástase, em CEBs (CAVICCHIOLI BUIM; GURGEL et al., 2011; WANG, Z. et al., 2014). Ainda são escassos os estudos que relacionam essa cascata com eventos biológicos que ocorrem neste tipo tumoral, sendo a maioria *in vitro*, cujos resultados apontam para uma relação de moléculas HH em eventos de invasão (GAI et al., 2014; LEI et al., 2013, 2015; SUN; BAI; LV, 2016; YUE et al., 2014) e proliferação (BERMUDEZ et al., 2013; CHEN, J. et al., 2014; COSTA et al., 2015; SUN, J. et al., 2017; SUN; BAI; LV, 2016). Diante disso, avaliamos a participação da via HH na transição epitelial-mesenquimal (TEM) e potencial proliferativo em biópsias excisionais de pacientes com CEBs.

De forma a melhor responder a nossa hipótese, utilizamos como critério de inclusão em nossa casuística, a marcação positiva nuclear para o fator de transcrição GLI1, uma vez que a translocação desta proteína para o núcleo é o evento que melhor caracteriza a atividade da via HH (CHEN, J. et al., 2014; CHUN; HONG, 2016; JUSTILIEN; FIELDS, 2015; KASAI, 2016; RIMKUS et al., 2016), independente do mecanismo de ativação da mesma (canônica e/ou não canônica). Além disso, GLI1 é alvo da via TGF- β , cujas ações na TEM já são bem definidas (LI, H. et al., 2015; LIU, Q. et al., 2015; PERROT; JAVELAUD; MAUVIEL, 2013). O acúmulo de GLI1 no núcleo das células tumorais é crucial para a ativação de genes importantes para progressão tumoral, como aqueles relacionados a TEM (LIU, X. et al., 2014), proliferação (JENG et al., 2013) e sobrevivência de células tumorais (JUSTILIEN; FIELDS, 2015).

Sendo assim, a via HH contribui para uma heterogeneidade de funções típica das subpopulações dos clones das células malignas, cuja principal consequência é a diversidade de funções biológicas, contribuindo para um microambiente tumoral que exhibe grupos de células com comportamentos e funções biológicas distintas. Apesar das neoplasias malignas terem origem a partir de uma única célula, as subpopulações celulares são diversas e possuem características variadas, como invasividade, elevada capacidade proliferativa e potencial metastático, e expressam proteínas diferentes de acordo com a sua localização no microambiente tumoral (YANG, T. et al., 2011).

Corroborando com a compreensão desta heterogeneidade de comportamentos biológicos das células tumorais e, de forma a melhor caracterizar o papel da via HH na TEM, analisamos o *front* de invasão e ilhas tumorais imediatamente adjacentes a esta região. Isso porque, no *front* de invasão tumoral, as células neoplásicas perdem marcadores de fenótipo epitelial e adquirem um perfil mesenquimal, através da ativação da TEM (PEREIRA et al., 2016) e apresentam características moleculares distintas das ilhas tumorais (RIVERA; VENEGAS, 2014). Acredita-se que informações sobre a capacidade metastática e invasiva, inclusive, possam ser avaliadas no *front* de invasão tumoral, onde as células exibem características que refletem uma maior agressividade (SHARMA et al., 2013).

Em nosso estudo, a redução da expressão de E-caderina no *front* de invasão foi um achado frequente, sendo notada pela observação da perda total de imunoposição desta proteína e, quando esta existia, havia uma marcante descontinuidade de imunopositividade membranar. Apesar de menores escores de imunomarcção nas ilhas tumorais, observamos, nitidamente, que estas voltavam a exibir marcação positiva desta proteína, mesmo que descontínua. Resultados similares foram encontrados nos trabalhos de Costa et al. (2015), Wang, Z. et al. (2014), e Hashimoto et al. (2012), e, conforme estes autores, esta redução da expressão de E-caderina no *front* de invasão pode estar relacionada ao aumento das capacidades de invasão e migração das células tumorais.

A perda de expressão de E-caderina é a característica mais marcante da TEM (ELASKALANI et al., 2017; KIM, S. et al., 2016; LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014; NAKAZAWA; KYPRIANOU, 2017; WU, C-L. et al., 2016; ZIDAR et al., 2017) e os fatores de transcrição Snail e Slug se destacam como os principais repressores da expressão do gene que codifica esta proteína (CAO et al., 2017; CERCELARU et al., 2017; KÖVECSI et al., 2017; SUN, M. et al., 2016; ZHANG, Y. et al., 2018) e, ao mesmo tempo, GLI1 é um dos fatores de transcrição relacionado a regulação da expressão de Snail (FAN, H. et al., 2017; HEIDEN et al., 2014; LU et al., 2016; XU et al., 2014). No *front* de invasão e nas ilhas tumorais, encontrou-se uma forte correlação positiva entre Snail e GLI1, apesar de, provavelmente, o *n* amostral ter influenciado na significância estatística, na primeira área. Esses achados corroboram com os estudos de Zheng et al. (2012) em hepatocarcinoma, Wang, Z. et al. (2014) em câncer gástrico e Min et al. (2013), em carcinoma escamocelular esofágico, que observaram que a superexpressão de GLI1 regulou positivamente a expressão de Snail. Nosso resultado,

portanto, sugere que GLI1 e Snail estão relacionados entre si e com a perda de expressão de E-caderina, especialmente no *front* de invasão.

O Slug é um outro fator de transcrição da família SNAIL e a sua expressão está relacionada com invasão, resistência a apoptose e com a aquisição de características típicas de células-tronco, pelas células tumorais (ZHAO, X. et al., 2015). Este marcador também atua na supressão da expressão de E-caderina e ajuda a regular a estabilidade dos desmossomos e a expressão de proteases (MENDES et al., 2017). Entretanto, de acordo com Pan et al. (2016) e Shirley et al. (2012), o papel específico de Slug na perda de expressão de E-caderina não está esclarecido.

Em nosso trabalho, detectamos uma associação positiva entre Slug e E-caderina, no *front* de invasão e corroborou com o estudo de Joseph et al. (2009), que observaram preservação dos níveis de E-caderina em células de carcinoma oral com expressão positiva para Slug. Neste trabalho, GLI1 e Slug apresentaram uma correlação positiva fraca, independente da região avaliada (*front* e ilhas tumorais). Sendo assim, além de estudos funcionais relacionados a possível regulação de Slug pelo GLI1, a avaliação desta proteína em tecidos de CEB humano deve ser avaliada em casuística com uma maior heterogeneidade de casos que possuam diferentes graus histológicos de malignidade. Ressalta-se que a expressão dos fatores de transcrição da TEM, Snail e Slug, parece ocorrer de forma independente e complementar, ou seja, enquanto Snail controla a resposta rápida e inicial da TEM, Slug atua na manutenção deste evento em estágios posteriores relacionados a remodelação da matriz extracelular e aumento da motilidade das células tumorais (QIAO; W; GAO, 2010).

O *switch* de caderinas é outro evento peculiar da TEM e refere-se a perda de expressão de E-caderina, com aumento de expressão de N-caderina (MERZOUG-LARABI et al., 2017; ORTIZ et al., 2015; OZAKI-HONDA et al., 2017; TANAKA et al., 2016). Entretanto, há uma dificuldade de avaliação deste processo, dada a transitoriedade e interdependência entre expressão desta molécula e as interações heterotípicas com células mesenquimais, como fibroblastos associados ao câncer (KÖVECSI et al., 2017; LABERNADIE et al., 2017). Mesmo que tenhamos observado correlação inversamente proporcional e estatisticamente significativa entre a expressão de N-caderina e E-caderina nas ilhas tumorais, este aspecto não foi evidente na região de *front* e não podemos desconsiderar que as interações entre células tumorais e estromais, nesta região, ainda são pouco definidas. Além disso, há uma discrepância na

avaliação da expressão de N-caderina, em tumores, uma vez que, a maioria dos trabalhos considera que qualquer detecção desta proteína é importante na TEM (ANGADI et al., 2016; COSTA et al., 2015; PYO et al., 2007), ao contrário do nosso estudo que esmerou-se em agrupar os casos, considerando escores e continuidade da imunomarcagem.

Ainda que tenhamos encontrado uma associação entre a imunexpressão de N-caderina com o tamanho do tumor e que Ozaki-honda et al. (2017) tenham considerado que esta proteína tem potencial como marcador de prognóstico, dados do consórcio internacional que avalia o interactoma humano (THE HUMAN PROTEIN ATLAS, 2018a) não apontam relevância para este marcador, em tumores de cabeça e pescoço. Por outro lado, a atividade HH tem relação com a expressão desta molécula em células neuroepiteliais (JAROV et al., 2003). Em nossa casuística, a expressão de GLI1 e N-caderina foi discrepante e, provavelmente, este dado tenha relação com a forma de análise e critérios de semi-quantificação adotados, uma vez que tivemos altos escores para GLI1 e não avaliamos se as células positivas para N-caderina, em estroma imediatamente adjacente as ilhas tumorais, estavam realizando TEM. Além disso, conforme ressaltado anteriormente, a regulação dos níveis de N-caderina é dependente de interação com células de fenótipo mesenquimal e os níveis transcricionais deste gene melhor traduzem a regulação da expressão desta proteína, limitando a interpretação dos resultados descritos neste trabalho (HASHIMOTO et al., 2012; YANG, H. et al., 2015).

Uma das consequências da perda de expressão de E-caderina é a liberação da β -catenina do complexo de adesão celular formado por caderinas-cateninas, levando ao acúmulo no citoplasma e, posteriormente, translocação para o núcleo, com consequente ativação de genes alvo da TEM (LAMOUILLE; XU; DERYNCK, 2014; SCANLON et al., 2013). Em nosso estudo, a expressão de β -catenina foi avaliada em membrana, citoplasma e núcleo, sendo raramente positiva neste último compartimento celular. Esta proteína apresenta funções distintas, a depender do compartimento onde esteja localizado. Por exemplo, a expressão de β -catenina no citoplasma está relacionada a tumores menos agressivos e, em células de osteosarcoma murino, a imunopositividade neste compartimento celular foi relacionada com a perda do potencial metastático (KIDANI et al., 2014). Confrontando com os resultados deste estudo, a β -catenina citoplasmática foi um achado mais importante nas ilhas tumorais e também coincidente com a maior imunomarcagem membranar. Em adição, nenhum dos casos incluídos

tinham metástases a distância e a grande maioria foi classificada como bem diferenciado.

Nos CEBs avaliados, foi nítida a perda de imunomarcagem membranar de β -catenina em região de *front* de invasão, enquanto que, nas ilhas tumorais, observamos expressão marcante e contínua, corroborando com os resultados encontrados para a E-caderina, bem como em outros estudos em CEBs (SASAYA et al., 2013; ZAID, 2014), câncer vulvar (RODRIGUES et al., 2013) e câncer colorretal (KAMPOSITORAS et al., 2013). Apesar da β -catenina nuclear ter um significado mais amplo quanto a participação na TEM (GURZU et al., 2016; MORGAN et al., 2014; RIBATTI, 2017; VAQUERO et al., 2017), em tumores de cabeça e pescoço, os dados depositados no biorepositório de interactoma apontam que β -catenina nuclear não é frequentemente encontrada em CEBs (THE HUMAN PROTEIN ATLAS, 2018), apesar de muitos trabalhos mostrarem resultados contrários (KAUR et al., 2013; MOLES et al., 2016; SCANLON et al., 2013; ZAID, 2014).

Já está bem descrita na literatura, a relação positiva entre as vias WNT e HH (ARNOLD; POHLIG; SIMS-MOURTADA, 2017; FARAHMAND et al., 2017; FOTOPOULOS et al., 2015), sendo que a atividade WNT é importante para o aumento dos níveis de GLI1 citoplasmático e nuclear, promovido pela desestabilização do complexo citoplasmático regulado pela axina, tubulina e SUFU (PENG et al., 2017; YADAV et al., 2016). Maiores níveis de GLI1 e perda de expressão de β -catenina no *front* tumoral podem ratificar, portanto, a relação entre estas moléculas. Nesta região, assim como observado para E-caderina, a perda de adesão celular foi um evento preponderante, ao mesmo tempo que alta expressão de Snail e GLI1 corroboram para a participação da via HH na TEM. YUE et al. (2014) também observaram esta relação em carcinoma de pulmão.

Outrossim, observamos uma alta correlação entre os níveis citoplasmáticos de β -catenina e GLI1. Considerando-se que ambas moléculas estão imobilizadas em um mesmo complexo protéico citoplasmático (PARCHURE; VYAS; MAYOR, 2018; SONG, L. et al., 2015; WILS; BIJLSMA, 2018) e que, diante da desestabilização deste, a porção ativadora de GLI1 transloca-se para o núcleo, este resultado fortalece ainda mais nossa hipótese de que a expressão nuclear de GLI1 está relacionada à TEM mediada pelas vias HH e WNT em CEBs.

Se, por um lado, a TEM é um evento biológico peculiar em tumores, a proliferação celular representa uma das mais importantes características relacionadas à progressão de neoplasias malignas. Isso é bem evidente quando se percebe, na literatura, uma grande quantidade de trabalhos que descrevem o potencial proliferativo dos tumores humanos (BOLOGNA-MOLINA et al., 2013; DILLEHAY; LU; DONG, 2014; JURÍKOVÁ et al., 2016; LI, N. et al., 2015; LOPES et al., 2017; NOWINSKA et al., 2016; PEREIRA et al., 2016; REZVANI et al., 2015; VALVERDE; FREITAS et al., 2016; VIDAL et al., 2016; WANG, X. et al., 2017). Biologicamente, espera-se que células malignas que estão em TEM não priorizem a entrada em mitose (COMAILLS et al., 2016; SAVAGNER, 2015). Entretanto, o estudo destes eventos de forma concomitante é dificultado pelas diferenças das populações de células malignas, no contexto do ambiente tumoral. Neste sentido, muitos estudos já contribuíram para o reconhecimento da atividade de GLI1 para o estabelecimento de um perfil proliferativo das células malignas (BERMUDEZ et al., 2013; CHEN, S. et al., 2015; LIU, X. et al., 2014; ZINKE et al., 2015). Dentre os marcadores atualmente disponíveis para o estudo da fração de crescimento celular, destacam-se o Ki-67 e MCM3.

MCM3 é uma proteína presente na replicação do DNA e tem sido utilizada como marcador de fração de crescimento tumoral (LOPES et al., 2017). Estudo de Valverde; Freitas et al. (2016) indicou que MCM3 não sofre influência de fatores externos, como a inflamação, e por isso é considerado um marcador confiável para avaliação de proliferação celular em CEBs. Além disso, esta proteína está expressa apenas em células em divisão celular (NOWINSKA et al., 2016). Neste estudo, observamos grande quantidade de MCM3 no núcleo celular, principalmente nas ilhas tumorais, demonstrando que são estas regiões as que mais podem contribuir para o crescimento tumoral.

A despeito do potencial proliferativo ter sido importante no *front* de invasão do tumor neste estudo, a análise descritiva foi muito consistente com o aumento da quantidade de células ciclizantes em ilhas tumorais. O parâmetro "ciclo celular" em tumores malignos é muito difícil de ser definitivamente avaliado. Isso porque, a perda da regulação do ciclo celular é o evento preponderante na iniciação da tumorigênese. Ou seja, na região de *front*, as células malignas são duplamente desafiadas: precisam conseguir invadir o tecido adjacente e, ao mesmo tempo, manter o estado proliferativo (COMAILLS et al., 2016).

Isoladamente, a análise de MCM3 é consistente com uma relevante fração de crescimento tumoral, mas esta relação com GLI1 não foi detectada. Outros estudos, entretanto, demonstraram que GLI1 tem uma correlação com a marcação celular para ciclina D1 (BERMUDEZ et al., 2013; ONISHI; KATANO, 2014) e MYC (RIMKUS et al., 2016; YOON et al., 2013), principais genes alvos da via HH relacionados ao ciclo celular. Dessa forma, sugere-se que, em CEBs, GLI1 possa regular o ciclo celular, em uma fase posterior a MCM3, cuja expressão reflete que as células estão em G1. Em tumores de glândulas salivares, esta correlação também não foi encontrada (VIDAL et al., 2016).

8 CONCLUSÃO

A correlação entre GLI1 e marcadores da TEM (Snail, E-Caderina e β -catenina) sugere que, em CEBs, a via HH pode atuar na regulação da expressão de fenótipo mesenquimal, sendo que este aspecto parece ser mais relevante para a região de *front*. Por outro lado, a relação entre GLI1 e MCM3 não pode ser observada.

A perda de expressão de proteínas de adesão (E-Caderina e β -catenina) ocorreu predominantemente na região de *front*, enquanto que a adesão celular foi reestabelecida em ilhas tumorais, de forma independente de MCM3.

O padrão de expressão e localização (*front* e ilhas tumorais) da N-Caderina e Slug, neste tumor, sugerem que estes marcadores não refletem de forma significativa o processo de TEM em CEBs.

REFERÊNCIAS

ABE, Y.; TANAKA, N. **The Hedgehog Signaling Networks in Lung Cancer: The Mechanisms and Roles in Tumor Progression and Implications for Cancer Therapy.** *BioMed Research International*, [s.l.], v. 2016, 2016. ISSN: 23146141, DOI: 10.1155/2016/7969286.

ABIDI, A. **Hedgehog signaling pathway: a novel target for cancer therapy: vismodegib, a promising therapeutic option in treatment of basal cell carcinomas.** *Indian journal of pharmacology*, [s.l.], v. 46, n° 1, p. 3–12, 2014. ISSN: 1998-3751, DOI: 10.4103/0253-7613.124884.

ÁCS, B. et al. **Ki-67 as a controversial predictive and prognostic marker in breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy.** *Diagnostic Pathology*, [s.l.], v. 12, n° 1, p. 20, 2017. ISSN: 1746-1596, DOI: 10.1186/s13000-017-0608-5.

ALMEIDA, V. L. DE et al. **Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: Uma introdução.** *Química Nova*, [s.l.], v. 28, n° 1, p. 118–129, 2005. ISBN: 0100-4042 UL - http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422005000100021&nrm=iso, ISSN: 01004042, DOI: 10.1590/S0100-40422005000100021.

AMAKYE, D.; JAGANI, Z.; DORSCH, M. **Unraveling the therapeutic potential of the Hedgehog pathway in cancer.** *Nature Medicine*, [s.l.], v. 19, n° 11, p. 1410–1422, 2013. ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/nm.3389.

ANGADI, P. V. et al. **Immunoexpression of Epithelial Mesenchymal Transition Proteins E-Cadherin, β -Catenin, and N-Cadherin in Oral Squamous Cell Carcinoma.** *International Journal of Surgical Pathology*, [s.l.], v. 24, n° 8, p. 696–703, 2016. ISSN: 19402465, DOI: 10.1177/1066896916654763.

ARNHOLD, V.; BOOS, J.; LANVERS-KAMINSKY, C. **Targeting hedgehog signaling pathway in pediatric tumors: in vitro evaluation of SMO and GLI inhibitors.** *Cancer chemotherapy and pharmacology*, [s.l.], v. 77, n° 3, p. 495–505, 2016. ISSN: 1432-0843, DOI: 10.1007/s00280-016-2962-5.

ARNOLD, K. M.; POHLIG, R. T.; SIMS-MOURTADA, J. **Co-activation of Hedgehog and Wnt signaling pathways is associated with poor outcomes in triple negative breast cancer.** *Oncology letters*, [s.l.], v. 14, n° 5, p. 5285–5292, 2017. ISSN: 1792-1074, DOI: 10.3892/ol.2017.6874.

ASHKAVANDI, Z. J. et al. **MCM3 as a Novel Diagnostic Marker in Benign and Malignant Salivary Gland Tumors.** [s.l.], v. 14, p. 3479–3482, 2013.

AYED-GUERFALI, D. Ben et al. **Expression of APC, β -catenin and E-cadherin in Tunisian patients with gastric adenocarcinoma: Clinical significance.** *Tumor Biology*, [s.l.], v. 35, n° 3, p. 1775–1783, 2014. ISSN: 14230380, DOI: 10.1007/s13277-013-1236-7.

BAI, Y. et al. **Hedgehog Signaling in Pancreatic Fibrosis and Cancer.** *Medicine*, [s.l.], v. 95, n° 10, p. e2996, 2016. ISSN: 1536-5964, DOI: 10.1097/MD.0000000000002996.

BANGS, F.; ANDERSON, K. V. **Primary cilia and Mammalian Hedgehog signaling.** *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, [s.l.], v. 9, n° 5, p. 1–22, 2017. ISSN: 19430264, DOI: 10.1101/cshperspect.a028175.

BARRIERE, G. et al. **Epithelial Mesenchymal Transition: a double-edged sword.** *Clinical and Translational Medicine*, [s.l.], v. 4, n° 1, p. 14, 2015. ISSN: 2001-1326, DOI: 10.1186/s40169-015-0055-4.

BERMUDEZ, O. et al. **Gli1 Mediates Lung Cancer Cell Proliferation and Sonic Hedgehog-Dependent Mesenchymal Cell Activation.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 8, n° 5, p. e63226, 2013. ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0063226.

BLASCHUK, O. W. **N-cadherin antagonists as oncology therapeutics.** *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, [s.l.], v. 370, n° 1661, p. 20140039–20140039, 2014. ISSN: 0962-8436, DOI: 10.1098/rstb.2014.0039.

BODNER, L. et al. **Oral squamous cell carcinoma in patients twenty years of age or younger - Review and analysis of 186 reported cases.** *Oral Oncology*, [s.l.], v. 50, n° 2, p. 84–89, 2014. ISBN: 1368-8375, ISSN: 13688375, DOI: 10.1016/j.oraloncology.2013.11.001.

BOGACHEK, M. V.; ANDRADE, J. P. DE; WEIGEL, R. J. **Regulation of epithelial-mesenchymal transition through sumoylation of transcription factors.** *Cancer Research*, [s.l.], v. 75, n° 1, p. 11–15, 2015. ISBN: 3143627344, ISSN: 15387445, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-14-2824.

BOLOGNA-MOLINA, R. et al. **Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as**

markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, [s.l.], v. 18, n° 2, p. e174-9, 2013. ISSN: 1698-6946, DOI: 10.4317/MEDORAL.18573.

BONHIN, R. G. et al. **Histologic correlation of expression of Ki-67 in squamous cell carcinoma of the glottis according to the degree of cell differentiation.** *Braz J Otorhinolaryngol*, [s.l.], v. 80, n° 4, p. 290–295, 2014.

BRUCK, I.; KAPLAN, D. L. **The Replication Initiation Protein Sld3/Treslin Orchestrates the Assembly of the Replication Fork Helicase during S Phase.** *The Journal of biological chemistry*, [s.l.], v. 290, n° 45, p. 27414–24, 2015. ISSN: 1083-351X, DOI: 10.1074/jbc.M115.688424.

CAMPION, A. C. O. V. LE et al. **Caracterização do atraso no diagnóstico do câncer de boca e orofaringe em dois centros de referência.** *Cadernos Saúde Coletiva*, [s.l.], v. 24, n° 2, p. 178–184, 2016. ISSN: 1414-462X, DOI: 10.1590/1414-462X201600020004.

CAO, M.-T. et al. **Curcumin downregulates the expression of Snail via suppressing Smad2 pathway to inhibit TGF- β 1-induced epithelial-mesenchymal transitions in hepatoma cells.** *Oncotarget*, [s.l.], v. 8, n° 65, p. 108498–108508, 2017. ISSN: 1949-2553, DOI: 10.18632/oncotarget.22590.

CARREÓN-BURCIAGA, R. G. et al. **Immunoexpression of Ki-67, MCM2, and MCM3 in Ameloblastoma and Ameloblastic Carcinoma and Their Correlations with Clinical and Histopathological Patterns.** *Disease Markers*, [s.l.], v. 2015, 2015. ISSN: 18758630, DOI: 10.1155/2015/683087.

CASAS, B. S. et al. **Downregulation of the Sonic Hedgehog/Gli pathway transcriptional target Neogenin-1 is associated with basal cell carcinoma aggressiveness.** *Oncotarget*, [s.l.], v. 8, n° 48, p. 84006–84018, 2017. ISSN: 1949-2553, DOI: 10.18632/oncotarget.21061.

CAVICCHIOLI BUIM, M. E. et al. **Activation of sonic hedgehog signaling in oral squamous cell carcinomas: A preliminary study.** *Human Pathology*, [s.l.], v. 42, n° 10, p. 1484–1490, 2011. ISSN: 00468177, DOI: 10.1016/j.humphath.2010.12.015.

CERCELARU, L. et al. **E-cadherin, β -catenin and Snail immunoexpression in laryngeal squamous cell carcinoma.** *Romanian Journal of Morphology and Embriology*, [s.l.], v. 58, n° 3, p. 761–766, 2017.

CHAI, F. et al. **The Hedgehog inhibitor cyclopamine antagonizes chemoresistance of breast cancer cells.** *OncoTargets and therapy*, [s.l.], v. 6, p. 1643–7, 2013. ISSN: 1178-6930, DOI: 10.2147/OTT.S51914.

CHAW, S. Y. et al. **Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers - E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin - In oral squamous cell carcinogenesis and transformation.** *Oral Oncology*, [s.l.], v. 48, n° 10, p. 997–1006, 2012. ISBN: 1368-8375, ISSN: 13688375, DOI: 10.1016/j.oraloncology.2012.05.011.

CHEN, H. et al. **Association between FOXM1 and hedgehog signaling pathway in human cervical carcinoma by tissue microarray analysis.** *Oncology letters*, [s.l.], v. 12, n° 4, p. 2664–2673, 2016. ISSN: 1792-1074, DOI: 10.3892/ol.2016.4932.

CHEN, J.-S. et al. **Down-regulation of Gli-1 inhibits hepatocellular carcinoma cell migration and invasion.** *Molecular and Cellular Biochemistry*, [s.l.], v. 393, n° 1–2, p. 283–291, 2014. ISSN: 0300-8177, DOI: 10.1007/s11010-014-2071-x.

CHEN, S. et al. **HIF-1 α Contributes to Proliferation and Invasiveness of Neuroblastoma Cells via SHH Signaling.** *PLOS ONE*, [s.l.], v. 10, n° 3, p. e0121115, 2015. ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0121115.

CHEN, X. et al. **Epithelial mesenchymal transition and hedgehog signaling activation are associated with chemoresistance and invasion of hepatoma subpopulations.** *Journal of Hepatology*, [s.l.], v. 55, n° 4, p. 838–845, 2011. ISBN: 1600-0641 (Electronic)r0168-8278 (Linking), ISSN: 01688278, DOI: 10.1016/j.jhep.2010.12.043.

CHENG, C.-W. et al. **Loss of GDF10/BMP3b as a prognostic marker collaborates with TGFBR3 to enhance chemotherapy resistance and epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma.** *Molecular carcinogenesis*, [s.l.], v. 55, n° 5, p. 499–513, 2016. ISSN: 1098-2744, DOI: 10.1002/mc.22297.

CHENG, D.-D. et al. **Minichromosome maintenance protein 2 and 3 promote osteosarcoma progression via DHX9 and predict poor patient prognosis.** *Oncotarget*, [s.l.], v. 8, n° 16, p. 26380–26393, 2017. ISSN: 1949-2553 (Electronic), DOI: 10.18632/oncotarget.15474.

CHUN, H. W.; HONG, R. **Significance of the hedgehog pathway-associated proteins Gli-1 and Gli-2 and the epithelial-mesenchymal transition-associated proteins twist and E-cadherin in hepatocellular carcinoma.** *Oncology Letters*, [s.l.], v. 12, n° 3, p. 1753–1762, 2016. ISSN: 17921082, DOI: 10.3892/ol.2016.4884.

COMAILLS, V. et al. **Genomic Instability Is Induced by Persistent Proliferation of**

Cells Undergoing Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Reports*, [s.l.], v. 17, n° 10, p. 2632–2647, 2016. ISBN: 22111247, ISSN: 22111247, DOI: 10.1016/j.celrep.2016.11.022.

COSTA, L. C. M. C. et al. **Expression of epithelial-mesenchymal transition markers at the invasive front of oral squamous cell carcinoma.** *Journal of applied oral science : revista FOB*, [s.l.], v. 23, n° 2, p. 169–78, 2015. ISSN: 1678-7765, DOI: 10.1590/1678-775720140187.

DAVIS, J. A. **Elementary Survey Analysis.** Englewood Cliffs, N.J.: Prentice-Hall, 1971. 195 p. ISBN: 9780132605472.

DESSINIOTI, C.; ANTONIOU, C.; STRATIGOS, A. J. **From basal cell morphogenesis to the alopecia induced by hedgehog inhibitors: connecting the dots.** *The British journal of dermatology*, [s.l.], 2017. ISSN: 1365-2133, DOI: 10.1111/bjd.15738.

DIEST, P. J. VAN; BRUGAL, G.; BAAK, J. P. **Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value.** *Journal of clinical pathology*, [s.l.], v. 51, n° 10, p. 716–24, 1998. ISSN: 0021-9746.

DILLEHAY, K. L.; LU, S.; DONG, Z. **Antitumor Effects of a Novel Small Molecule Targeting PCNA Chromatin Association in Prostate Cancer.** *Molecular Cancer Therapeutics*, [s.l.], v. 13, n° 12, p. 2817–2826, 2014. ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0522.

EL-NAGGAR, A. K. et al. **WHO Classification of Head and Neck Tumours.** Forth Edit ed. Lyon: WHO, 2017. 348 p. ISBN: 9789283224389.

ELASKALANI, O. et al. **Epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target for overcoming chemoresistance in pancreatic cancer.** *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, [s.l.], v. 9, n° 1, p. 37–41, 2017. ISBN: 1948-5204, ISSN: 1948-5204, DOI: 10.4251/wjgo.v9.i1.37.

FAN, H. et al. **MiR-150 alleviates EMT and cell invasion of colorectal cancer through targeting Gli1.** [s.l.], p. 4853–4859, 2017.

FAN, H.-X. et al. **Sonic hedgehog signaling may promote invasion and metastasis of oral squamous cell carcinoma by activating MMP-9 and E-cadherin expression.** *Medical Oncology*, [s.l.], v. 31, n° 7, p. 41, 2014. ISSN: 1357-0560, DOI: 10.1007/s12032-014-0041-5.

FAN, Q. et al. **Requirement of TGF β Signaling for SMO-mediated Carcinogenesis.** *Journal of Biological Chemistry*, [s.l.], v. 285, n^o 47, p. 36570–36576, 2010. ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.C110.164442.

FAN, S. et al. **A review of clinical and histological parameters associated with contralateral neck metastases in oral squamous cell carcinoma.** *International journal of oral science*, [s.l.], v. 3, n^o 4, p. 180–91, 2011. ISSN: 1674-2818, DOI: 10.4248/IJOS11068.

FARAHMAND, L. et al. **Naturally occurring compounds acting as potent anti-metastatic agents and their suppressing effects on Hedgehog and WNT/ β -catenin signalling pathways.** *Cell Proliferation*, [s.l.], v. 50, n^o 1, p. e12299, 2017. ISSN: 09607722, DOI: 10.1111/cpr.12299.

FEITELSON, M. A. et al. **Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets.** *Seminars in Cancer Biology*, [s.l.], v. 35, p. S25–S54, 2015. ISBN: 1096-3650 (Electronic)r1044-579X (Linking), ISSN: 10963650, DOI: 10.1016/j.semcancer.2015.02.006.

FOTOPOULOS, G. et al. **Prognostic significance of WNT and hedgehog pathway activation markers in cancer of unknown primary.** *European Journal of Clinical Investigation*, [s.l.], v. 45, n^o 11, p. 1145–1152, 2015. ISSN: 00142972, DOI: 10.1111/eci.12518.

FRANCO-CHUAIRE, M. L.; MAGDA CAROLINA, S.-C.; CHUAIRE-NOACK, L. **Epithelial-mesenchymal transition (EMT): principles and clinical impact in cancer therapy.** *Investigacion clinica*, [s.l.], v. 54, n^o 2, p. 186–205, 2013. ISSN: 0535-5133.

GAI, X. et al. **Caveolin-1 Is Up-Regulated by GLI1 and Contributes to GLI1-Driven EMT in Hepatocellular Carcinoma.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 9, n^o 1, p. e84551, 2014. ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0084551.

GOYAL, A. et al. **Differential Expression of Hedgehog and Snail in Cutaneous Fibrosing Disorders.** *American Journal of Clinical Pathology*, [s.l.], v. 146, n^o 6, p. 709–717, 2016. ISSN: 0002-9173, DOI: 10.1093/ajcp/aqw192.

GREENE, F. L. et al. **AJCC cancer staging manual.** Sixth Edit ed. Chicago: [s.n.], 2002. ISBN: 0-387-95271-3.

GUILLOT, C.; LECUIT, T. **Mechanics of Epithelial Tissue Homeostasis and Morphogenesis.** *Science*, [s.l.], v. 340, n^o 6137, p. 1185–1189, 2013.

GUJRAL, T. S. et al. **A noncanonical frizzled2 pathway regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis.** *Cell*, [s.l.], v. 159, n° 4, p. 844–856, 2014. ISBN: 1097-4172 (Electronic)r0092-8674 (Linking), ISSN: 10974172, DOI: 10.1016/j.cell.2014.10.032.

GURZU, S. et al. **Systematic review of the old and new concepts in the epithelial-mesenchymal transition of colorectal cancer.** *World Journal of Gastroenterology*, [s.l.], v. 22, n° 30, p. 6764–6775, 2016. ISSN: 22192840, DOI: 10.3748/wjg.v22.i30.6764.

HAN, Y. et al. **Regulation of Gli ciliary localization and Hedgehog signaling by the PY-NLS/karyopherin- β 2 nuclear import system.** *PLOS Biology*, [s.l.], v. 15, n° 8, p. e2002063, 2017. ISSN: 1545-7885, DOI: 10.1371/journal.pbio.2002063.

HASHIMOTO, T. et al. **Progression of Oral Squamous Cell Carcinoma Accompanied with Reduced E-Cadherin Expression but Not Cadherin Switch.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 7, n° 10, p. 1–8, 2012. ISBN: 10.1371/journal.pone.0047899, ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0047899.

HEIDEN, K. B. et al. **The Sonic Hedgehog Signaling Pathway Maintains the Cancer Stem Cell Self-Renewal of Anaplastic Thyroid Cancer by Inducing Snail Expression.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, [s.l.], v. 99, n° 11, p. E2178–E2187, 2014. ISSN: 0021-972X, DOI: 10.1210/jc.2014-1844.

HERNÁNDEZ-GUERRERO, J.-C. et al. **Prevalence trends of oral squamous cell carcinoma. Mexico City's General Hospital experience.** *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*, [s.l.], v. 18, n° 2, p. e306-11, 2013. ISSN: 1698-6946, DOI: 10.4317/MEDORAL.18043.

HU, L. et al. **An overview of hedgehog signaling in fibrosis.** *Molecular pharmacology*, [s.l.], v. 87, n° 2, p. 174–82, 2015. ISSN: 1521-0111, DOI: 10.1124/mol.114.095141.

HUBER, M. A.; TANTIWONGKOSI, B. **Oral and Oropharyngeal Cancer.** *Medical Clinics of North America*, [s.l.], v. 98, n° 6, p. 1299–1321, 2014. ISSN: 00257125, DOI: 10.1016/j.mcna.2014.08.005.

INCA. **Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil.** Rio de Janeiro: INCA, 2017. 1-128 p. ISBN: 978-85-7318-362-7.

ISHIBASHI, N. et al. **Correlation between the Ki-67 proliferation index and response to radiation therapy in small cell lung cancer.** *Radiation Oncology*, [s.l.], v. 12, n° 1, p. 16, 2017. ISSN: 1748-717X, DOI: 10.1186/s13014-016-0744-1.

ISHIKAWA, M. et al. **Expression of the GLI family genes is associated with tumor progression in advanced lung adenocarcinoma.** *World Journal of Surgical Oncology*, [s.l.], v. 12, n° 1, p. 253, 2014. ISSN: 1477-7819, DOI: 10.1186/1477-7819-12-253.

ISLAM, S. S. et al. **Sonic hedgehog (Shh) signaling promotes tumorigenicity and stemness via activation of epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in bladder cancer.** *Molecular Carcinogenesis*, [s.l.], v. 55, n° 5, p. 537–551, 2016. ISSN: 10982744, DOI: 10.1002/mc.22300.

JADHAV, K. B.; GUPTA, N. **Clinicopathological prognostic implicators of oral squamous cell carcinoma: Need to understand and revise.** *North American Journal of Medical Sciences*, [s.l.], v. 5, n° 12, p. 671–679, 2013. ISSN: 22501541, DOI: 10.4103/1947-2714.123239.

JANKOWSKA-KONSUR, A. et al. **Expression of MCM-3 and MCM-7 in Primary Cutaneous T-cell Lymphomas.** *Anticancer research*, [s.l.], v. 35, n° 11, p. 6017–26, 2015. ISSN: 1791-7530.

JAROV, A. et al. **A dual role for Sonic hedgehog in regulating adhesion and differentiation of neuroepithelial cells.** *Developmental Biology*, [s.l.], v. 261, n° 2, p. 520–536, 2003. ISSN: 0012-1606, DOI: 10.1016/S0012-1606(03)00351-8.

JAVELAUD, D.; PIERRAT, M.-J.; MAUVIEL, A. **Crosstalk between TGF- β and hedgehog signaling in cancer.** *FEBS Letters*, [s.l.], v. 586, n° 14, p. 2016–2025, 2012. ISSN: 00145793, DOI: 10.1016/j.febslet.2012.05.011.

JENG, K.-S. et al. **Activation of the sonic hedgehog signaling pathway occurs in the CD133 positive cells of mouse liver cancer Hepa 1-6 cells.** *OncoTargets and therapy*, [s.l.], v. 6, p. 1047–55, 2013. ISSN: 1178-6930, DOI: 10.2147/OTT.S44828.

JIA, Y.; WANG, Y.; XIE, J. **The Hedgehog pathway: role in cell differentiation, polarity and proliferation.** *Archives of Toxicology*, [s.l.], v. 89, n° 2, p. 179–191, 2015. ISSN: 0340-5761, DOI: 10.1007/s00204-014-1433-1.

JOOST, S. et al. **GLI1 Inhibition Promotes Epithelial-to-Mesenchymal Transition in Pancreatic Cancer Cells.** *Cancer Research*, [s.l.], v. 72, n° 1, p. 88–99, 2012. ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-4621.

JOSEPH, M. J. et al. **Slug is a downstream mediator of transforming growth factor- β 1-induced matrix metalloproteinase-9 expression and invasion of oral cancer cells.** *Journal of Cellular Biochemistry*, [s.l.], v. 108, n^o 3, p. 726–736, 2009. ISSN: 07302312, DOI: 10.1002/jcb.22309.

JURÍKOVÁ, M. et al. **Ki67, PCNA, and MCM proteins: Markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer.** *Acta Histochemica*, [s.l.], v. 118, n^o 5, p. 544–552, 2016. ISSN: 0065-1281, DOI: 10.1016/J.ACTHIS.2016.05.002.

JUSTILIEN, V.; FIELDS, A. P. **Molecular pathways: novel approaches for improved therapeutic targeting of Hedgehog signaling in cancer stem cells.** *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, [s.l.], v. 21, n^o 3, p. 505–13, 2015. ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-0507.

KALLURI, R.; WEINBERG, R. a. **Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition.** *Journal of Clinical Investigation*, [s.l.], v. 119, n^o 6, p. 1420–1428, 2009. ISBN: 1558-8238 (Electronic)r0021-9738 (Linking), ISSN: 0021-9738, DOI: 10.1172/JCI39104.1420.

KAMPOSORAS, K. et al. **The prognostic significance of WNT pathway in surgically-treated colorectal cancer: β -catenin expression predicts for disease-free survival.** *Anticancer research*, [s.l.], v. 33, n^o 10, p. 4573–84, 2013. ISSN: 1791-7530.

KASAI, K. **GLI1, a master regulator of the hallmark of pancreatic cancer.** *Pathology International*, [s.l.], v. 66, n^o 12, p. 653–660, 2016. ISSN: 14401827, DOI: 10.1111/pin.12476.

KAUR, J. et al. **Clinical Significance of Altered Expression of β -Catenin and E-Cadherin in Oral Dysplasia and Cancer: Potential Link with ALCAM Expression.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 8, n^o 6, p. e67361, 2013. ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0067361.

KIDANI, T. et al. **Overexpression of cytoplasmic β -catenin inhibits the metastasis of the murine osteosarcoma cell line LM8.** *Cancer Cell International*, [s.l.], v. 14, n^o 1, p. 1–9, 2014. ISSN: 14752867, DOI: 10.1186/1475-2867-14-31.

KIM, S. A. et al. **Loss of CDH1 (E-cadherin) expression is associated with infiltrative tumour growth and lymph node metastasis.** *British Journal of Cancer*, [s.l.], v. 114, n^o 2, p. 199–206, 2016. ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/bjc.2015.347.

KIM, Y.-S. et al. **Role of the epithelial-mesenchymal transition and its effects on embryonic stem cells.** *Experimental & molecular medicine*, [s.l.], v. 46, n° April, p. 1–5, 2014. ISBN: 2092-6413 (Electronic)r1226-3613 (Linking), ISSN: 2092-6413, DOI: 10.1038/emm.2014.44.

KOVACIC, J. C. et al. **Epithelial-to-Mesenchymal and Endothelial-to-Mesenchymal Transition: From Cardiovascular Development to Disease.** *Circulation*, [s.l.], v. 125, n° 14, p. 1795–1808, 2012. ISSN: 0009-7322, DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.040352.

KÖVECSI, A. et al. **Paradoxical expression pattern of the epithelial mesenchymal transition-related biomarkers CD44, SLUG, N-cadherin and VSIG1/Glycoprotein A34 in gastrointestinal stromal tumors.** *World journal of gastrointestinal oncology*, [s.l.], v. 9, n° 11, p. 436–443, 2017. ISSN: 1948-5204, DOI: 10.4251/wjgo.v9.i11.436.

KRAWCZYK, N. et al. **Expression of stem cell and epithelial-mesenchymal transition markers in circulating tumor cells of breast cancer patients.** *BioMed research international*, [s.l.], v. 2014, p. 415721, 2014. ISSN: 2314-6141, DOI: 10.1155/2014/415721.

KURIOKA, K. et al. **Differential expression of the epithelial mesenchymal transition factors Snail, Slug, Twist, TGF- β , and E-cadherin in ameloblastoma.** *Medical Molecular Morphology*, [s.l.], v. 50, n° 2, p. 68–75, 2017. ISSN: 18601499, DOI: 10.1007/s00795-016-0149-0.

LABERNADIE, A. et al. **A mechanically active heterotypic E-cadherin/N-cadherin adhesion enables fibroblasts to drive cancer cell invasion.** *Nature Cell Biology*, [s.l.], v. 19, n° 3, p. 224–237, 2017. ISBN: 1476-4679 (Electronic) 1465-7392 (Linking), ISSN: 14764679, DOI: 10.1038/ncb3478.

LAI, K.-C. et al. **Blocking TNF- α inhibits angiogenesis and growth of IFIT2-depleted metastatic oral squamous cell carcinoma cells.** *Cancer letters*, [s.l.], v. 370, n° 2, p. 207–15, 2016. ISSN: 1872-7980, DOI: 10.1016/j.canlet.2015.10.016.

LAMEIRA, A. G. et al. **MCM3 could be a better marker than Ki-67 for evaluation of dysplastic oral lesions: an immunohistochemical study.** *Journal of Oral Pathology & Medicine*, [s.l.], v. 43, n° 6, p. 427–434, 2014. ISSN: 09042512, DOI: 10.1111/jop.12153.

LAMOUILLE, S.; XU, J.; DERYNCK, R. **Molecular mechanisms of epithelial-**

mesenchymal transition. *National Review Molecular Cell Biology*, [s.l.], v. 15, n° 3, p. 178–196, 2014. ISBN: 1471-0072, ISSN: 1471-0080, DOI: 10.1038/nrm3758.Molecular.

LEE, A. Y.-L. et al. **Curcumin Inhibits Invasiveness and Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma Through Reducing Matrix Metalloproteinase 2, 9 and Modulating p53-E-Cadherin Pathway.** *Integrative cancer therapies*, [s.l.], p. 1534735415588930-, 2015. ISSN: 1552-695X, DOI: 10.1177/1534735415588930.

LEE, J. M. et al. **The epithelial–mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease.** *The Journal of Cell Biology*, [s.l.], v. 172, n° 7, p. 973–981, 2006. ISSN: 0021-9525, DOI: 10.1083/jcb.200601018.

LEE, S. J.; KIM, K. H.; PARK, K. K. **Mechanisms of fibrogenesis in liver cirrhosis: The molecular aspects of epithelial-mesenchymal transition.** *World Journal of Hepatology*, [s.l.], v. 6, n° 4, p. 207–216, 2014. ISBN: 1948-5182 (Electronic), ISSN: 19485182, DOI: 10.4254/wjh.v6.i4.207.

LEEM, Y.-E. et al. **CDO, an Hh-Coreceptor, Mediates Lung Cancer Cell Proliferation and Tumorigenicity through Hedgehog Signaling.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 9, n° 11, p. e111701, 2014. ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0111701.

LEI, J. et al. **Hedgehog signaling regulates hypoxia induced epithelial to mesenchymal transition and invasion in pancreatic cancer cells via a ligand-independent manner.** *Mol Cancer*, [s.l.], v. 12, n° 1, p. 66, 2013. ISBN: 1476-4598, ISSN: 1476-4598, DOI: 10.1186/1476-4598-12-66.

_____. **Gli-1 is crucial for hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion of breast cancer.** *Tumor Biology*, [s.l.], v. 36, n° 4, p. 3119–3126, 2015. ISSN: 1010-4283, DOI: 10.1007/s13277-014-2948-z.

LEMAN, A. R.; NOGUCHI, E. **The replication fork: understanding the eukaryotic replication machinery and the challenges to genome duplication.** *Genes*, [s.l.], v. 4, n° 1, p. 1–32, 2013. ISSN: 2073-4425, DOI: 10.3390/genes4010001.

LI, H. et al. **Transcription factor glioma-associated oncogene homolog 1 is required for transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition of non-small cell lung cancer cells.** *Molecular Medicine Reports*, [s.l.], v. 11, n° 5, p. 3259–3268, 2015. ISSN: 17913004, DOI: 10.3892/mmr.2015.3150.

LI, N. et al. **Prognostic evaluation of Nanog, Oct4, Sox2, PCNA, Ki67 and E-cadherin expression in gastric cancer.** *Medical Oncology*, [s.l.], v. 32, n° 1, p. 433, 2015. ISSN: 1357-0560, DOI: 10.1007/s12032-014-0433-6.

LIMA, T. B. De et al. **Analysis of the Epithelium-Mesenchymal Transition Process on Oral Squamous Cell Carcinomas.** *Brazilian Dental Journal*, [s.l.], v. 28, n° 5, p. 543–547, 2017. ISSN: 0103-6440, DOI: 10.1590/0103-6440201701484.

LINS, R. R. et al. **Expression of E-cadherin and WNT pathway proteins Betacatenin, APC, TCF-4 and Survivin in Gastric Adenocarcinoma: clinical and pathological implication.** *ABCD-Arquivos brasileiros de cirurgia digestiva-brazilian archives of digestive surgery*, [s.l.], v. 29, n° 4, p. 227–231, 2016. ISBN: 1600040004, ISSN: 0102-6720, DOI: 10.1590/0102-6720201600040004.

LIU, C.-H. et al. **Patterns of recurrence and second primary tumors in oral squamous cell carcinoma treated with surgery alone.** *The Kaohsiung journal of medical sciences*, [s.l.], v. 29, n° 10, p. 554–9, 2013. ISSN: 1607-551X, DOI: 10.1016/j.kjms.2013.03.001.

LIU, Q. et al. **Gli1 promotes transforming growth factor-beta1- and epidermal growth factor-induced epithelial to mesenchymal transition in pancreatic cancer cells.** *Surgery (United States)*, [s.l.], v. 158, n° 1, p. 211–224, 2015. ISSN: 15327361, DOI: 10.1016/j.surg.2015.03.016.

LIU, X. et al. **Suppressor of fused (Sufu) represses Gli1 transcription and nuclear accumulation, inhibits glioma cell proliferation, invasion and vasculogenic mimicry, improving glioma chemo-sensitivity and prognosis.** *Oncotarget*, [s.l.], v. 5, n° 22, p. 11681–11694, 2014. ISSN: 1949-2553, DOI: 10.18632/oncotarget.2585.

LIU, Y. et al. **Acquisition of 5-fluorouracil resistance induces epithelial-mesenchymal transitions through the Hedgehog signaling pathway in HCT-8 colon cancer cells.** *Oncology letters*, [s.l.], v. 9, n° 6, p. 2675–2679, 2015. ISSN: 1792-1074, DOI: 10.3892/ol.2015.3136.

LOPES, V. K. M. et al. **Ki-67 protein predicts survival in oral squamous carcinoma cells: an immunohistochemical study.** *Brazilian Oral Research*, [s.l.], v. 31, n° 0, 2017. ISSN: 1806-8324, DOI: 10.1590/1807-3107BOR-2017.vol31.0066.

LU, L. et al. **Prognostic and clinicopathological value of Gli-1 expression in gastric cancer: A meta-analysis.** *Oncotarget*, [s.l.], v. 7, n° 42, p. 69087–69096, 2016. ISSN: 1949-2553, DOI: 10.18632/oncotarget.12011.

MACHADO, M. V.; DIEHL, A. M. **Hedgehog signalling in liver pathophysiology.** *Journal of Hepatology*, [s.l.], 2017. ISSN: 0168-8278, DOI: 10.1016/J.JHEP.2017.10.017.

MAGALHAES, M. A. O.; GLOGAUER, J. E.; GLOGAUER, M. **Neutrophils and oral squamous cell carcinoma: lessons learned and future directions.** *Journal of Leukocyte Biology*, [s.l.], v. 96, n° November, p. 695–702, 2014. ISSN: 0741-5400, DOI: 10.1189/jlb.4RU0614-294R.

MAIER, H. J.; WIRTH, T.; BEUG, H. **Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma.** *Cancers*, [s.l.], v. 2, n° 4, p. 2058–2083, 2010. ISSN: 2072-6694, DOI: 10.3390/cancers2042058.

MATSUOKA, Y. et al. **The tumour stromal features are associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma.** *Apmis*, [s.l.], v. 123, n° 3, p. 205–214, 2015. ISSN: 16000463, DOI: 10.1111/apm.12344.

MEHTA, S. et al. **Defects in the adherens junction complex (E-cadherin/ β -catenin) in inflammatory bowel disease.** *Cell and Tissue Research*, [s.l.], v. 360, n° 3, p. 749–760, 2015. ISSN: 0302-766X, DOI: 10.1007/s00441-014-1994-6.

MENDES, G. A. et al. **Expression of E-cadherin, Slug and NCAM and its relationship to tumor invasiveness in patients with acromegaly.** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, [s.l.], v. 51, n° 2, 2017. ISSN: 1414-431X, DOI: 10.1590/1414-431x20176808.

MERZOUG-LARABI, M. et al. **Protein kinase C inhibitor Gö6976 but not Gö6983 induces the reversion of E- to N-cadherin switch and metastatic phenotype in melanoma: Identification of the role of protein kinase D1.** *BMC Cancer*, [s.l.], v. 17, n° 1, p. 1–22, 2017. ISSN: 14712407, DOI: 10.1186/s12885-016-3007-5.

MIN, S. et al. **The glioma-associated oncogene homolog 1 promotes epithelial-mesenchymal transition in human esophageal squamous cell cancer by inhibiting E-cadherin via Snail.** *Cancer Gene Therapy*, [s.l.], v. 20, n° 7, p. 379–385, 2013. ISSN: 0929-1903, DOI: 10.1038/cgt.2013.36.

MOLES, M. A. G. et al. **Implications of Differential Expression of β -Catenin in Oral Carcinoma.** *Anticancer research*, [s.l.], v. 36, n° 4, p. 1599–604, 2016. ISSN: 1791-7530.

MONTANARI, M. et al. **Epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer : an overview.** *Oncotarget*, [s.l.], v. 8, n° 21, p. 35376–35389, 2017. ISBN: 3537635389, ISSN: 1949-2553, DOI: 10.18632/oncotarget.16933.

MORGAN, R. G. et al. **Factors Affecting the Nuclear Localization of β -Catenin in Normal and Malignant Tissue.** *Journal of Cellular Biochemistry*, [s.l.], v. 115, n° 8, p. 1351–1361, 2014. ISSN: 07302312, DOI: 10.1002/jcb.24803.

MUKHOPADHYAY, S.; ROHATGI, R. **G-protein-coupled receptors, hedgehog signaling and primary cilia.** *Seminars in Cell and Developmental Biology*, [s.l.], v. 33, p. 63–72, 2014. DOI: 10.1016/j.semcd.2014.05.002.

NAKAZAWA, M.; KYPRIANOU, N. **Epithelial-mesenchymal-transition regulators in prostate cancer: Androgens and beyond.** *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, [s.l.], v. 166, p. 84–90, 2017. ISBN: 1879-1220 (Electronic)r0960-0760 (Linking), ISSN: 18791220, DOI: 10.1016/j.jsbmb.2016.05.007.

NATARAJAN, J. et al. **Overexpression of S100A4 as a biomarker of metastasis and recurrence in oral squamous cell carcinoma.** *Journal of applied oral science : revista FOB*, [s.l.], v. 22, n° 5, p. 426–433, 2014. ISSN: 1678-7765; 1678-7757, DOI: S1678-77572014000500426 [pii].

NAYAN, N. et al. **Epithelial-mesenchymal transition: Understanding the basic concept.** *Journal of Orofacial Sciences*, [s.l.], v. 4, n° 2, p. 82, 2012. ISSN: 0975-8844, DOI: 10.4103/0975-8844.106190.

NOUBISSI, F. K. et al. **Wnt signaling stimulates transcriptional outcome of the Hedgehog pathway by stabilizing GLI1 mRNA.** *Cancer research*, [s.l.], v. 69, n° 22, p. 8572–8, 2009. ISSN: 1538-7445, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1500.

NOWINSKA, K. et al. **Correlation between levels of expression of minichromosome maintenance proteins, Ki-67 proliferation antigen and metallothionein I/II in laryngeal squamous cell cancer.** *International Journal of Oncology*, [s.l.], v. 48, n° 2, p. 635–645, 2016. ISSN: 17912423, DOI: 10.3892/ijo.2015.3273.

OLIVEIRA, J. et al. **Associated factors with oral cancer: a study of case control in a population of the Brazil's Northeast.** *REV BRAS EPIDEMIOL OUT-DEZ*, [s.l.], v. 18, n° 4, p. 894–905, 2015. DOI: 10.1590/1980-5497201500040017.

OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A. **Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma.** *International*

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, [s.l.], v. 40, n° 3, p. 298–307, 2011. ISBN: 0901-5027, ISSN: 09015027, DOI: 10.1016/j.ijom.2010.12.003.

ONISHI, H.; KATANO, M. **Hedgehog signaling pathway as a new therapeutic target in pancreatic cancer.** *World Journal of Gastroenterology*, [s.l.], v. 20, n° 9, p. 2335–2342, 2014. ISSN: 22192840, DOI: 10.3748/wjg.v20.i9.2335.

ORTIZ, A. et al. **Angiomotin is a novel component of cadherin-11/ β -catenin/p120 complex and is critical for cadherin-11-mediated cell migration.** *FASEB Journal*, [s.l.], v. 29, n° 3, p. 1080–1091, 2015. ISBN: 0892-6638, ISSN: 15306860, DOI: 10.1096/fj.14-261594.

OZAKI-HONDA, Y. et al. **Prognostic Prediction of Oral Squamous Cell Carcinoma by E-Cadherin and N-Cadherin Expression in Overall Cells in Tumor Nests or Tumor Cells at the Invasive Front.** *Cancer Microenvironment*, [s.l.], v. 10, n° 1–3, p. 87–94, 2017. ISSN: 1875-2292, DOI: 10.1007/s12307-017-0201-1.

PAN, Y. et al. **Slug-upregulated miR-221 promotes breast cancer progression through suppressing E-cadherin expression.** *Scientific Reports*, [s.l.], v. 6, n° 1, p. 25798, 2016. ISSN: 2045-2322, DOI: 10.1038/srep25798.

PANEBIANCO, C.; SARACINO, C.; PAZIENZA, V. **Epithelial-mesenchymal transition: molecular pathways of hepatitis viruses-induced hepatocellular carcinoma progression.** *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, [s.l.], v. 35, n° 8, p. 7307–7315, 2014. ISSN: 14230380, DOI: 10.1007/s13277-014-2075-x.

PARCHURE, A.; VYAS, N.; MAYOR, S. **Wnt and Hedgehog: Secretion of Lipid-Modified Morphogens.** *Trends in Cell Biology*, [s.l.], v. 28, n° 2, p. 157–170, 2018. ISSN: 0962-8924, DOI: 10.1016/J.TCB.2017.10.003.

PARRIS, T. Z. et al. **Clinical relevance of breast cancer-related genes as potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma.** *BMC cancer*, [s.l.], v. 14, p. 324, 2014. ISBN: 1471-2407 (Electronic)r1471-2407 (Linking), ISSN: 1471-2407, DOI: 10.1186/1471-2407-14-324.

PENG, Y. et al. **MiRNA-194 activates the Wnt/ β -catenin signaling pathway in gastric cancer by targeting the negative Wnt regulator, SUFU.** *Cancer Letters*, [s.l.], v. 385, p. 117–127, 2017. ISSN: 0304-3835, DOI: 10.1016/J.CANLET.2016.10.035.

PEREIRA, C. H. et al. **Expression of adhesion proteins (E-cadherin and b -catenin)**

and cell proliferation (Ki-67) at the invasive tumor front in conventional oral squamous cell and basaloid squamous cell carcinomas. *Archives of Oral Biology*, [s.l.], v. 61, p. 8–15, 2016. ISSN: 0003-9969, DOI: 10.1016/j.archoralbio.2015.10.003.

PERROT, C. Y.; JAVELAUD, D.; MAUVIEL, A. **Overlapping activities of TGF- β and Hedgehog signaling in cancer: Therapeutic targets for cancer treatment.** *Pharmacology and Therapeutics*, [s.l.], v. 137, n^o 2, p. 183–199, 2013. ISSN: 01637258, DOI: 10.1016/j.pharmthera.2012.10.002.

PYO, S. W. et al. **Expression of E-cadherin, P-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: Correlation with the clinicopathologic features and patient outcome.** *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, [s.l.], v. 35, n^o 1, p. 1–9, 2007. ISBN: 1010-5182, ISSN: 10105182, DOI: 10.1016/j.jcms.2006.11.004.

QIAO, B.; W, J. N.; GAO, J. **Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma triggered by transforming growth factor- β 1 is Snail family-dependent and correlates with matrix metalloproteinase-2 and -9 expressions.** *International Journal of Oncology*, [s.l.], v. 37, p. 663–668, 2010. ISBN: 1191001202, ISSN: 00034819, DOI: 10.3892/ijo.

QUAN, H. et al. **An adaptive immune response driven by mature, antigen-experienced T and B cells within the microenvironment of oral squamous cell carcinoma.** *International Journal of Cancer*, [s.l.], v. 138, n^o 12, p. 2952–2962, 2016. ISBN: 1097-0215 (Electronic)r0020-7136 (Linking), ISSN: 10970215, DOI: 10.1002/ijc.30019.

QUAN, J. et al. **Potential molecular targets for inhibiting bone invasion by oral squamous cell carcinoma: a review of mechanisms.** *Cancer metastasis reviews*, [s.l.], v. 31, n^o 1–2, p. 209–19, 2012. ISBN: 1055501193, ISSN: 1573-7233, DOI: 10.1007/s10555-011-9335-7.

RALEIGH, D. R. et al. **Hedgehog signaling drives medulloblastoma growth via CDK6.** *The Journal of clinical investigation*, [s.l.], v. 128, n^o 1, p. 1–5, 2017. ISSN: 1558-8238, DOI: 10.1172/JCI92710.

RAMOS, G. de O. et al. **Fibronectin modulates cell adhesion and signaling to promote single cell migration of highly invasive oral squamous cell carcinoma.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 11, n^o 3, p. 1–18, 2016. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0151338.

REITER, J. F.; LEROUX, M. R. **Genes and molecular pathways underpinning ciliopathies.** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, [s.l.], v. 18, n^o 9, p. 533–547,

2017. ISSN: 1471-0072, DOI: 10.1038/nrm.2017.60.

REZVANI, G. et al. **Evaluation of Minichromosome Maintenance-3 (MCM3) in Oral Squamous Cell Carcinoma.** *Journal of Dentistry Shiraz University of Medical Sciences*, [s.l.], v. 16, n° June, p. 87–92, 2015.

RIBATTI, D. **Epithelial-mesenchymal transition in morphogenesis, cancer progression and angiogenesis.** *Experimental Cell Research*, [s.l.], v. 353, n° 1, p. 1–5, 2017. ISSN: 10902422, DOI: 10.1016/j.yexcr.2017.02.041.

RIKARDBSEN, O. G. et al. **Clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma in Northern Norway : a retrospective study.** *BMC Oral Health*, [s.l.], v. 14, p. 1–9, 2014.

RIMKUS, T. et al. **Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothened and GLI Inhibitors.** *Cancers*, [s.l.], v. 8, n° 2, p. 22, 2016. ISSN: 2072-6694, DOI: 10.3390/cancers8020022.

RIVERA, C.; VENEGAS, B. **Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review).** *Oncology Letters*, [s.l.], v. 8, n° 1, p. 7–11, 2014.

RODRIGUES, I. S. et al. **Epithelial-mesenchymal transition-like events in vulvar cancer and its relation with HPV.** *British Journal of Cancer*, [s.l.], v. 109, n° 1, p. 184–194, 2013. ISBN: 1532-1827 (Electronic)r0007-0920 (Linking), ISSN: 00070920, DOI: 10.1038/bjc.2013.273.

SANTOS-SILVA, A. R. et al. **Tongue squamous cell carcinoma in young nonsmoking and nondrinking patients: 3 clinical cases of orthodontic interest.** *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, [s.l.], v. 145, n° 1, p. 103–107, 2014. ISSN: 08895406, DOI: 10.1016/j.ajodo.2012.09.026.

SANTOS, H.-B.-P. et al. **Clinical findings and risk factors to oral squamous cell carcinoma in young patients: A 12-year retrospective analysis.** *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, [s.l.], v. 21, n° 2, p. e151-6, 2016. ISSN: 1698-6946, DOI: 10.4317/MEDORAL.20770.

SASAYA, K. et al. **Concomitant Loss of p120-Catenin and β -Catenin Membrane Expression and Oral Carcinoma Progression with E-Cadherin Reduction.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 8, n° 8, p. e69777, 2013. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0069777.

SAVAGNER, P. **The epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenomenon.** *Annals of Oncology*, [s.l.], v. 21, n° SUPPL. 7, p. 89–92, 2010. ISBN: 1569-8041 (Electronic)r0923-7534 (Linking), ISSN: 09237534, DOI: 10.1093/annonc/mdq292.

_____. **Epithelial-mesenchymal transitions: From cell plasticity to concept elasticity.** *Current Topics in Developmental Biology*. 1 ed. [s.l.]: Elsevier Inc., 2015. v. 112, 273-300 p. ISBN: 1557-8933 (Electronic)r0070-2153 (Linking), ISSN: 00702153, DOI: 10.1016/bs.ctdb.2014.11.021.

SCANLON, C. S. et al. **Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma.** *Journal of dental research*, [s.l.], v. 92, n° 2, p. 114–21, 2013. ISBN: 1544-0591 (Electronic)r0022-0345 (Linking), ISSN: 1544-0591, DOI: 10.1177/0022034512467352.

SCHNEIDER, F. T. et al. **Sonic Hedgehog Acts as a Negative Regulator of β -Catenin Signaling in the Adult Tongue Epithelium.** *The American Journal of Pathology*, [s.l.], v. 177, n° 1, p. 404–414, 2010. ISSN: 00029440, DOI: 10.2353/ajpath.2010.091079.

SHAHBAZI, M. N.; PEREZ-MORENO, M. **Connections between cadherin-catenin proteins, spindle misorientation, and cancer.** *Tissue barriers*, [s.l.], v. 3, n° 3, p. e1045684, 2015. ISSN: 2168-8362, DOI: 10.1080/21688370.2015.1045684.

SHARMA, M. et al. **Molecular changes in invasive front of oral cancer.** *Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP*, [s.l.], v. 17, n° 2, p. 240–7, 2013. ISSN: 0973-029X, DOI: 10.4103/0973-029X.119740.

SHEVDE, L. A.; SAMANT, R. S. **Nonclassical HEDGEHOG-GLI signaling and its clinical implications.** *International Journal of Cancer*, [s.l.], v. 135, n° 1, p. 1–6, 2014. ISBN: 00207136, ISSN: 10970215, DOI: 10.1002/ijc.28424.

SHIH, J.-Y.; YANG, P.-C. **The EMT regulator slug and lung carcinogenesis.** *Carcinogenesis*, [s.l.], v. 32, n° 9, p. 1299–1304, 2011. ISSN: 0143-3334, DOI: 10.1093/carcin/bgr110.

SHIRKOOHI, R. **Epithelial mesenchymal transition from a natural gestational orchestration to a bizarre cancer disturbance.** *Cancer Science*, [s.l.], v. 104, n° 1, p. 28–35, 2013. ISBN: 1349-7006 (Electronic)r1347-9032 (Linking), ISSN: 13479032, DOI: 10.1111/cas.12074.

SHIRLEY, S. H. et al. **Slug expression during melanoma progression.** *The American*

journal of pathology, [s.l.], v. 180, n° 6, p. 2479–89, 2012. ISSN: 1525-2191, DOI: 10.1016/j.ajpath.2012.02.014.

SILVA, S. D. DA et al. **Epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers have prognostic impact in multiple primary oral squamous cell carcinoma.** *Clinical & Experimental Metastasis*, [s.l.], v. 32, n° 1, p. 55–63, 2014. ISBN: 1058501496, ISSN: 0262-0898, DOI: 10.1007/s10585-014-9690-1.

SKODA, A. M. et al. **The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review.** *Bosnian Journal of Basic Medical Sciences*, [s.l.], v. 0, n° 0, p. 1–48, 2017. ISSN: 1840-4812, DOI: 10.17305/bjbms.2018.2756.

SONG, L. et al. **Crosstalk between Wnt/ β -catenin and Hedgehog/Gli signaling pathways in colon cancer and implications for therapy.** *Cancer biology & therapy*, [s.l.], v. 16, n° 1, p. 1–7, 2015. ISSN: 1555-8576, DOI: 10.4161/15384047.2014.972215.

SONG, M. et al. **Hedgehog signaling inhibitor cyclopamine induces apoptosis by decreasing Gli2 and Bcl2 expression in human salivary pleomorphic adenoma cells.** *Biomedical reports*, [s.l.], v. 1, n° 2, p. 325–329, 2013. ISSN: 2049-9434, DOI: 10.3892/br.2013.61.

SOUZA, W. F. De et al. **Sinalização celular em câncer.** *Ciência e Cultura*, [s.l.], v. 66, n° 1, p. 30–33, 2014. ISSN: 0009-6725, DOI: 10.21800/S0009-67252014000100013.

STASIKOWSKA-KANICKA, O.; WAĞROWSKA-DANILEWICZ, M.; DANILEWICZ, M. **Association of infiltrating cells with microvessel density in oral squamous cell carcinoma.** *Polish Journal of Pathology*, [s.l.], v. 1, n° 1, p. 40–48, 2017. ISSN: 1233-9687, DOI: 10.5114/pjp.2017.67614.

SUN, J. et al. **Targeting of miR-150 on Gli1 gene to inhibit proliferation and cell cycle of esophageal carcinoma EC9706.** *Cancer Biomarkers*, [s.l.], v. 21, n° 1, p. 203–210, 2017. ISSN: 18758592, DOI: 10.3233/CBM-170658.

SUN, M. et al. **Hedgehog pathway is involved in nitidine chloride induced inhibition of epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells-like properties in breast cancer cells.** *Cell & Bioscience*, [s.l.], v. 6, n° 1, p. 44, 2016. ISSN: 2045-3701, DOI: 10.1186/s13578-016-0104-8.

SUN, Q.; BAI, J.; LV, R. **Hedgehog/Gli1 signal pathway facilitates proliferation, invasion, and migration of cutaneous SCC through regulating VEGF.** *Tumor*

Biology, [s.l.], v. 37, n° 12, p. 16215–16225, 2016. ISBN: 1010-4283, ISSN: 14230380, DOI: 10.1007/s13277-016-5435-x.

SUN, X.-D.; LIU, X.-E.; HUANG, D.-S. **Curcumin reverses the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells by inhibiting the Hedgehog signaling pathway.** *Oncology reports*, [s.l.], v. 29, n° 6, p. 2401–7, 2013. ISSN: 1791-2431, DOI: 10.3892/or.2013.2385.

SVOBODA, K. H.; GORDON, M. **A tribute to Elizabeth D. Hay, 1927-2007.** *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*, [s.l.], v. 237, n° 10, p. 2605–6, 2008. ISSN: 1058-8388, DOI: 10.1002/dvdy.21628.

SYRED, H. M. et al. **Cell cycle regulation of microtubule interactomes: multi-layered regulation is critical for the interphase/mitosis transition.** *Molecular & cellular proteomics: MCP*, [s.l.], v. 12, n° 11, p. 3135–47, 2013. ISSN: 1535-9484, DOI: 10.1074/mcp.M113.028563.

TANAKA, S. et al. **Snail1 expression in human colon cancer DLD-1 cells confers invasive properties without N-cadherin expression.** *Biochemistry and Biophysics Reports*, [s.l.], v. 8, p. 120–126, 2016. ISSN: 24055808, DOI: 10.1016/j.bbrep.2016.08.017.

TANG, C. et al. **Hedgehog signaling through GLI1 and GLI2 is required for epithelial-mesenchymal transition in human trophoblasts.** *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, [s.l.], v. 1850, n° 7, p. 1438–1448, 2015. ISBN: 9788578110796, ISSN: 18728006, DOI: 10.1016/j.bbagen.2015.04.005.

TEPERINO, R. et al. **Canonical and non-canonical Hedgehog signaling and the control of metabolism.** *Seminars in Cell and Development Biology*, [s.l.], v. 33, p. 81–92, 2014. ISBN: 2122633255, ISSN: 15378276, DOI: 10.1016/j.biotechadv.2011.08.021.Secreted.

THE HUMAN PROTEIN ATLAS. **Expression of CDH2 in head and neck cancer -** 2018a. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000170558-CDH2/pathology/tissue/head+and+neck+cancer>>. Acesso em: 31/jan./18.

_____. **Expression of CTNNB1 in head and neck cancer.** 2018b. Disponível em: <<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000168036-CTNNB1/pathology/tissue/head+and+neck+cancer#Quantity>>. Acesso em: 31/jan./18.

THEUNISSEN, J.-W.; SAUVAGE, F. J. DE. **Paracrine Hedgehog signaling in cancer.** *Cancer research*, [s.l.], v. 69, n° 15, p. 6007–10, 2009. ISSN: 1538-7445, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-09-0756.

VALVERDE, L. de F.; PEREIRA, T. de A. et al. **Macrophages and endothelial cells orchestrate tumor-associated angiogenesis in oral cancer via hedgehog pathway activation.** *Tumor Biology*, [s.l.], v. 37, n° 7, p. 9233–9241, 2016. ISSN: 1010-4283, DOI: 10.1007/s13277-015-4763-6.

VALVERDE, L. de F.; FREITAS, R. D. DE et al. **MCM3: A Novel Proliferation Marker in Oral Squamous Cell Carcinoma.** *Applied Immunohistochemistry and Molecular Morphology*, [s.l.], v. 0, n° 0, p. 1–6, 2016. ISSN: 15334058, DOI: 10.1097/PAI.0000000000000397.

VAQUERO, J. et al. **Epithelial-mesenchymal transition in cholangiocarcinoma: From clinical evidence to regulatory networks.** *Journal of Hepatology*, [s.l.], v. 66, n° 2, p. 424–441, 2017. ISSN: 16000641, DOI: 10.1016/j.jhep.2016.09.010.

VARGAS-FERREIRA, F. et al. **Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: A brief approach.** *Brazilian Dental Journal*, [s.l.], v. 23, n° 5, p. 586–590, 2012. ISBN: 0103-6440 UL - http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-64402012000500020&nrm=iso, ISSN: 01036440, DOI: 10.1590/S0103-64402012000500020.

VIDAL, M. T. A. et al. **The sonic hedgehog signaling pathway contributes to the development of salivary gland neoplasms regardless of perineural infiltration.** *Tumor Biology*, [s.l.], v. 37, n° 7, p. 9587–9601, 2016. ISSN: 14230380, DOI: 10.1007/s13277-016-4841-4.

WANG, B. et al. **The recurrence and survival of oral squamous cell carcinoma: a report of 275 cases.** *Chinese journal of cancer*, [s.l.], v. 32, n° 11, p. 614–8, 2013. ISSN: 1000-467X, DOI: 10.5732/cjc.012.10219.

WANG, C. et al. **Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma.** *Journal of Oral Pathology and Medicine*, [s.l.], v. 40, n° 7, p. 545–551, 2011. ISBN: 1600-0714 (Electronic)r0904-2512 (Linking), ISSN: 09042512, DOI: 10.1111/j.1600-0714.2011.01041.x.

WANG, X. et al. **The prognostic value of PCNA expression in patients with osteosarcoma.** *Medicine*, [s.l.], v. 96, n° 41, p. e8254, 2017. ISSN: 0025-7974, DOI: 10.1097/MD.00000000000008254.

WANG, Z. et al. **Significance and prognostic value of Gli-1 and Snail/E-cadherin expression in progressive gastric cancer.** *Tumor Biology*, [s.l.], v. 35, n° 2, p. 1357–1363, 2014. ISSN: 1010-4283, DOI: 10.1007/s13277-013-1185-1.

WESSLER, S. et al. **From inflammation to gastric cancer – the importance of Hedgehog/GLI signaling in Helicobacter pylori-induced chronic inflammatory and neoplastic diseases.** *Cell Communication and Signaling*, [s.l.], v. 15, n° 1, p. 15, 2017. ISSN: 1478-811X, DOI: 10.1186/s12964-017-0171-4.

WILS, L. J.; BIJLSMA, M. F. **Epigenetic regulation of the Hedgehog and Wnt pathways in cancer.** *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, [s.l.], v. 121, p. 23–44, 2018. ISSN: 1040-8428, DOI: 10.1016/J.CRITREVONC.2017.11.013.

WU, C. et al. **Hedgehog signaling pathway in colorectal cancer: function, mechanism, and therapy.** *OncoTargets and therapy*, [s.l.], v. 10, p. 3249–3259, 2017. ISSN: 1178-6930, DOI: 10.2147/OTT.S139639.

WU, C.-L. et al. **MiR-429 reverses epithelial-mesenchymal transition by restoring E-cadherin expression in bladder cancer.** *Oncotarget*, [s.l.], v. 7, n° 18, p. 26593–603, 2016. ISSN: 1949-2553, DOI: 10.18632/oncotarget.8557.

WU, F. et al. **Hedgehog Signaling: From Basic Biology to Cancer Therapy.** *Cell Chemical Biology*, [s.l.], v. 24, n° 3, p. 252–280, 2017. ISSN: 24519448, DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.02.010.

XAVIER, G. M. et al. **Genetic interactions between the hedgehog co-receptors Gas1 and Boc regulate cell proliferation during murine palatogenesis.** *Oncotarget*, [s.l.], v. 7, n° 48, p. 79233–79246, 2016. ISSN: 1949-2553, DOI: 10.18632/oncotarget.13011.

XIA, X. et al. **Expression of AEG-1 and microvessel density correlates with metastasis and prognosis of oral squamous cell carcinoma.** *Human Pathology*, [s.l.], v. 45, n° 4, p. 858–865, 2014. ISSN: 15328392, DOI: 10.1016/j.humpath.2013.08.030.

XIE, S. et al. **Upregulation of PTEN suppresses invasion in Tca8113 tongue cancer cells through repression of epithelial-mesenchymal transition (EMT).** *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, [s.l.], v. 37, n° 5, p. 6681–9, 2016. ISSN: 1423-0380, DOI: 10.1007/s13277-015-4486-8.

XU, X. et al. **Sonic hedgehog-Gli1 signaling pathway regulates the Epithelial Mesenchymal Transition (EMT) by mediating a new target gene, S100A4, in**

pancreatic cancer cells. *PLoS ONE*, [s.l.], v. 9, n° 7, 2014. ISSN: 19326203, DOI: 10.1371/journal.pone.0096441.

YADAV, A. et al. **Association of Wnt signaling pathway genetic variants in gallbladder cancer susceptibility and survival.** *Tumor Biology*, [s.l.], v. 37, n° 6, p. 8083–8095, 2016. ISSN: 1010-4283, DOI: 10.1007/s13277-015-4728-9.

YAMAMICHI, F. et al. **Sonic hedgehog and androgen signaling in tumor and stromal compartments drives epithelial–mesenchymal transition in prostate cancer.** *Scandinavian Journal of Urology*, [s.l.], v. 48, n° 6, p. 523–532, 2014. ISSN: 2168-1805, DOI: 10.3109/21681805.2014.898336.

YANG, H. et al. **TGF- β -activated SMAD3/4 complex transcriptionally upregulates N-cadherin expression in non-small cell lung cancer.** *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, [s.l.], v. 87, n° 3, p. 249–57, 2015. ISSN: 1872-8332, DOI: 10.1016/j.lungcan.2014.12.015.

YANG, T.-L. et al. **Significance of tumor satellite variables in reflecting the epithelial-mesenchymal transition of tongue cancer.** *Oral oncology*, [s.l.], v. 47, n° 8, p. 720–4, 2011. ISSN: 1879-0593, DOI: 10.1016/j.oraloncology.2011.04.006.

YANG, W.-E. et al. **Cathepsin B Expression and the Correlation with Clinical Aspects of Oral Squamous Cell Carcinoma.** *Plos One*, [s.l.], v. 11, n° 3, p. e0152165, 2016. ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0152165.

YAO, E.; CHUANG, P.-T. **Hedgehog signaling: From basic research to clinical applications.** *Journal of the Formosan Medical Association = Taiwan yi zhi*, [s.l.], v. 114, n° 7, p. 569–76, 2015. ISSN: 0929-6646, DOI: 10.1016/j.jfma.2015.01.005.

YEUNG, K. T.; YANG, J. **Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis.** *Molecular Oncology*, [s.l.], v. 11, n° 1, p. 28–39, 2017. ISBN: 1878-0261 (Electronic)r1574-7891 (Linking), ISSN: 15747891, DOI: 10.1002/1878-0261.12017.

YOO, Y. A. et al. **Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer.** *Cancer Research*, [s.l.], v. 71, n° 22, p. 7061–7070, 2011. ISBN: 1538-7445 (Electronic)r0008-5472 (Linking), ISSN: 00085472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1338.

YOON, J. W. et al. **Noncanonical Regulation of the Hedgehog Mediator GLI1 by c-MYC in Burkitt Lymphoma.** *Molecular Cancer Research*, [s.l.], v. 11, n° 6, p. 604–

615, 2013. ISSN: 1541-7786, DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-12-0441.

YUE, D. et al. **Hedgehog/Gli promotes epithelial-mesenchymal transition in lung squamous cell carcinomas.** *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, [s.l.], v. 33, n° 1, p. 34, 2014. ISBN: 1756-9966, ISSN: 1756-9966, DOI: 10.1186/1756-9966-33-34.

ZAID, K. W. **Immunohistochemical assessment of E-cadherin and β -catenin in the histological differentiations of oral squamous cell carcinoma.** *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention J Cancer Prev*, [s.l.], v. 15, n° 1520, p. 8847–8853, 2014. DOI: 10.7314/APJCP.2014.15.20.8847.

ZHANG, G. et al. **How BMP-2 induces EMT and breast cancer stemness through Rb and CD44?** *Cell Death & Disease*, [s.l.], v. 9, n° 2, p. 20, 2018. ISSN: 2041-4889, DOI: 10.1038/s41419-017-0037-0.

ZHANG, J.; TIAN, X.-J.; XING, J. **Signal Transduction Pathways of EMT Induced by TGF- β , SHH, and WNT and Their Crosstalks.** *Journal of Clinical Medicine*, [s.l.], v. 5, n° 4, p. 41, 2016. ISSN: 2077-0383, DOI: 10.3390/jcm5040041.

ZHANG, S. et al. **Loss of VHL expression contributes to epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma.** *Oral Oncology*, [s.l.], v. 50, n° 9, p. 809–817, 2014. ISSN: 18790593, DOI: 10.1016/j.oraloncology.2014.06.007.

ZHANG, X. et al. **Development of anticancer agents targeting the Hedgehog signaling.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, [s.l.], v. 1, n° 123456789, p. 1–10, 2017. ISBN: 0001801724, ISSN: 14209071, DOI: 10.1007/s00018-017-2497-x.

ZHANG, Y. et al. **FBW7 loss promotes epithelial-to-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer through the stabilization of Snail protein.** *Cancer Letters*, [s.l.], v. 419, p. 75–83, 2018. ISSN: 0304-3835, DOI: 10.1016/j.canlet.2018.01.047.

ZHAO, D. et al. **Over-expression of integrin-linked kinase correlates with aberrant expression of Snail, E-cadherin and N-cadherin in oral squamous cell carcinoma: Implications in tumor progression and metastasis.** *Clinical and Experimental Metastasis*, [s.l.], v. 29, n° 8, p. 957–969, 2012. ISBN: 1573-7276 (Electronic)r0262-0898 (Linking), ISSN: 02620898, DOI: 10.1007/s10585-012-9485-1.

ZHAO, X. et al. **Slug promotes hepatocellular cancer cell progression by increasing sox2 and nanog expression.** *Oncology Reports*, [s.l.], v. 33, n° 1, p. 149–156, 2015. ISSN: 1021-335X.

ZHENG, X. et al. **The Transcription Factor GLI1 Mediates TGF β 1 Driven EMT in Hepatocellular Carcinoma via a SNAI1-Dependent Mechanism.** *PLoS ONE*, [s.l.], v. 7, n^o 11, p. e49581, 2012. ISSN: 1932-6203, DOI: 10.1371/journal.pone.0049581.

ZHONG, H. et al. **Expression of minichromosome maintenance genes in renal cell carcinoma.** *Cancer management and research*, [s.l.], v. 9, p. 637–647, 2017. ISSN: 1179-1322, DOI: 10.2147/CMAR.S146528.

ZHOU, X et al. **Long Non Coding RNA MALAT1 Promotes Tumor Growth and Metastasis by inducing Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma.** *Sci Rep*, [s.l.], v. 5, n^o October, p. 15972, 2015. ISBN: 2045-2322 (Electronic)r2045-2322 (Linking), ISSN: 20452322, DOI: 10.1038/srep15972.

ZHOU, Xiao-mei; ZHANG, H.; HAN, X. **Role of epithelial to mesenchymal transition proteins in gynecological cancers: pathological and therapeutic perspectives.** *Tumor Biology*, [s.l.], v. 35, n^o 10, p. 9523–9530, 2014. ISSN: 14230380, DOI: 10.1007/s13277-014-2537-1.

ZIDAR, N. et al. **The role of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma of the oral cavity.** *Virchows Archiv*, [s.l.], p. 1–9, 2017. ISSN: 0945-6317, DOI: 10.1007/s00428-017-2192-1.

ZINKE, J. et al. **β -Catenin-Gli1 interaction regulates proliferation and tumor growth in medulloblastoma.** *Molecular cancer*, [s.l.], v. 14, n^o 1, p. 17, 2015. ISSN: 1476-4598, DOI: 10.1186/s12943-015-0294-4.