

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Estudo da expressão imuno-histoquímica da proteína
ligante “Sonic Hedgehog” em carcinomas basocelulares de
pacientes do Serviço de Dermatologia do Hospital de
Clínicas de Porto Alegre

Leandro Linhares Leite

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

Estudo da expressão imuno-histoquímica da proteína
ligante “Sonic Hedgehog” em carcinomas basocelulares de
pacientes do Serviço de Dermatologia do Hospital de
Clínicas de Porto Alegre

Leandro Linhares Leite

Orientador: Prof. Dr. Renato Marchiori Bakos

Coorientador: André da Silva Cartell

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Medicina: Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa
de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas.

Porto Alegre

2019

“A fox knows many things, but the hedgehog knows one important thing”

Arquíloco, século VII a.C

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Lauro e Ruth Helena pelo apoio contínuo, zelo e carinho desde que me mudei, mesmo à distancia.

Ao professor Prof. Dr. Renato Marchiori Bakos, pela atenção, dedicação e entusiasmo em ensinar. Agradeço pela sensibilidade e compreensão no momento delicado que atravessei.

Ao professor André da Silva Cartell pela atenção, paciência e dedicação nas incontáveis horas que passamos ao microscópio na leitura de lâminas.

À Gabriela Remonatto pelo pronto e eficiente auxílio na confecção das lâminas que serviram de base para este trabalho.

Aos funcionários do serviço de Patologia do HCPA, por todo auxílio na separação dos blocos de parafina.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pela oportunidade de realizar o mestrado.

Aos pacientes que indiretamente contribuíram com o trabalho e com os resultados encontrados.

Ao FINE e CNPQ pelo incentivo financeiro.

RESUMO

Base teórica

O carcinoma basocelular (CBC) é o câncer de pele mais comum em humanos. Uma desregulação via do SHH está envolvida na origem da maioria dos CBCs esporádicos. Os genes desta via mais implicados nesta carcinogênese são o PTCH1, SMOH e SUFU. Mutações no SHH em CBCs são extremamente raras e são escassos na literatura estudos que avaliem sua expressão proteica e suas repercussões.

Objetivo

Investigar a expressão do ligante SHH e suas associações com os fenótipos clínicos e histopatológicos.

Métodos

92 CBCs foram incluídos, nos subtipos infiltrativo (33-35,9%), nodular (36-39,1%) e superficial (23-25,0%) e submetidos à análise imuno-histoquímica. Dados clínicos dos prontuários foram recuperados e comparados. Apenas uma lesão por paciente foi incluída.

Resultados

A marcação forte da proteína SHH esteve associada significativamente ao subtipo infiltrativo em relação ao superficial ($p=0,043$). Esteve também diretamente associada a invasão perineural ($p= 0,036$) e ulceração ($p=0,013$), e inversamente proporcional à presença de paliçada periférica bem expressa ($p=0,013$).

Conclusão

CBCs parecem ocorrer de forma independente de mutações no gene SHH. Entretanto, a expressão da proteína ligante SHH está associada com um perfil mais agressivo e menos diferenciado do tumor. Mais estudos são necessários para um melhor entendimento destas associações.

Palavras chave:

Via Sonic Hedhehog; proteína Sonic Hedgehog; carcinoma basocelular; subtipos histológicos

ABSTRACT

Background

Basal cell carcinoma (BCC) is the most common skin cancer. Dysregulation of the SHH pathway is involved in the origin of most sporadic BCCs. PTCH1, SMOH and SUFU are the genes most frequently involved in the carcinogenic process. Mutations in SHH gene in BCCs are extremely rare and there are only a few studies that evaluate its protein expression and its implications.

Objective

To investigate SHH ligand immunohistochemical expression and its associations with clinical and histopathological aspects.

Methods

Histologic slides of 92 BCCs were included: infiltrative (33), nodular (36) and superficial (23) and submitted to immunohistochemical analysis. Clinical data from the medical records were retrieved and compared. Only one lesion per patient was included.

Results

Intense expression of SHH protein was significantly associated with infiltrative tumors in comparison to superficial ($p = 0.043$). It was also associated with perineural invasion ($p = 0.036$) and ulceration ($p = 0.013$), and inversely related to the presence of well-expressed peripheral palisade ($p = 0.013$).

Conclusion

BCCs appear to occur independently of mutations in the SHH gene. However, SHH-binding protein expression is associated with a more aggressive and less differentiated tumor profile. More studies are needed for a thorough understanding of this process.

Key words:

Sonic Hedgehog pathway; Sonic Hedgehog protein; Basal cell carcinoma; histological subtypes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da via do SHH em vertebrados.

Figura 2. Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. Resultados com a combinação de palavras-chave.

Figura 3. Marco conceitual esquemático do projeto de pesquisa.

Figure 1. Image of immunohistochemical expression of SHH protein showing intense staining in an infiltrative BCC without peripheral palisade (original magnification x 200).

Figure 2. Image of immunohistochemical expression of SHH protein showing a superficial BCC with mild staining and a well-expressed peripheral palisade (original magnification x 40).

Figure 3. Image of immunohistochemical expression of SHH protein showing positive tumor cells in an infiltrative BCC with perineural invasion (original magnification x 200).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores de risco para o desenvolvimento de CBC.

Tabela 2. Classificação dos CBC quanto ao risco de recorrência.

Table 1. Characteristics of patients included in the study.

Table 2. Clinical features of the individuals according to the histological subtype.

Table 3. Relation of staining intensity and percentage of SHH-stained among the histological subtypes of CBC.

Table 4. Evaluation of the histopathological parameters of the BCC according to the intensity of the SHH staining.

Table 5. Histopathological parameters of the histological subtypes of the studied BCC.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBC: carcinoma basocelular

CPNM: câncer de pele não melanoma

CEC: carcinoma espinocelular

FDA: *Food and Drug Administration (Departamento de administração de drogas e alimentos dos EUA)*

EUA: Estados Unidos da América

HIP: Hh-interacting protein

Hh: *hedgehog*

IC: intervalo de confiança

NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*

ptc: *patched* na *Drosophila*

Ptch1: *patched* no camundongo

PTCH1: *patched 1* em humanos

PUVA: fototerapia com psoraleno e radiação ultravioleta A

Smo: em camundongos e na *Drosophila*

SMOH: *smoothened* em humanos

Shh: *Sonic Hedgehog* em camundongos

SHH: *Sonic Hedgehog* em humanos

SUFU: supressor de fusão

UV: ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Definição do Carcinoma basocelular.....	11
1.2 Epidemiologia e fatores de risco	12
1.3 Aspecto clínicos e histológicos dos carcinomas basocelulares	16
1.4 Fisiopatologia e a via do <i>Sonic Hedgehog</i>	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações.....	26
4. MARCO CONCEITUAL	28
3. JUSTIFICATIVA	29
4. OBJETIVOS:	32
4.1 Objetivo Principal	32
4.2 Objetivos secundários.....	32
5. REFERÊNCIAS	33
6. ARTIGO	49
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
8. PERSPECTIVAS FUTURAS	72
9. ANEXOS	73
9.1 Protocolo de avaliação de coleta de dados	73
9.2 STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of <i>cross-sectional studies</i>	74

1. INTRODUÇÃO

1.1 Definição do Carcinoma basocelular

O carcinoma basocelular (CBC) foi descrito inicialmente pelo cirurgião irlandês Arthur Jacob em 1827 (1). Em seu relato, descreveu de forma cuidadosa as bordas e a superfície de uma lesão que deu o nome de úlcera roedora (“*ulcus rodens*”). Reconheceu sua natureza incurável, se não extirpada, e sua incapacidade de dar metástases através da análise dos linfonodos responsáveis pela drenagem das lesões (1). De fato, a exérese da lesão constitui, até hoje, a base do seu tratamento e sua capacidade de metastatizar é muito baixa, porém não é nula (2).

A nomenclatura atual de carcinoma basocelular foi proposta pelo patologista alemão Krompecher em 1903 (1). Tipicamente consiste em um tumor de crescimento lento, resultado da proliferação anormal de queratinócitos da pele, localizado principalmente, mas não exclusivamente, em áreas fotoexpostas (3–5).

O CBC é o câncer mais comum da espécie humana, principalmente nos indivíduos de pele clara, de origem europeia, com uma incidência maior que todas as outras malignidades juntas (4,6). O termo câncer de pele não melanoma (CPNM) compreende principalmente o CBC e o carcinoma espinocelular (CEC). A incidência dos CPNM é três vezes maior que a do câncer de pulmão que é o segundo câncer mais frequente (7).

Sua morbidade está associada ao seu potencial de invasão e destruição, já que a disseminação metastática é rara, com uma frequência $\leq 0,5\%$, e observada principalmente em casos avançados e, muitas vezes, negligenciados (2).

O CBC é classificado em subtipos histológicos com diferentes perfis de agressividade (6,8). Muito já foi estudado sobre os diferentes subtipos histológicos do CBC, estabelecendo diferentes prognósticos, métodos de tratamento, e até mesmo origens distintas entre eles (8).

A via do *Sonic Hedgehog* (SHH) foi inicialmente descrita em estudos sobre diferenciação embriológica, sendo esta fundamental para a embriogênese normal (9). Ela apresenta vários componentes, sendo sua etapa inicial a interação da proteína ligante SHH com seu receptor transmembrana PTCH1 (10). Entretanto, quando mais estimulada em adultos esta via costuma estar associada a diferentes tumores, incluindo o CBC (9,11–14). O estudo da associação da via do SHH com o CBC permitiu o desenvolvimento de

uma nova classe de drogas alvo destinadas às formas avançadas deste tumor nas quais a cirurgia, padrão ouro do tratamento, é inviável (5,15–17).

A alta prevalência do CBC, bem como o seu fácil acesso pela localização cutânea, permitiram um amplo entendimento de suas características clínicas, dermatoscópicas, fisiopatológicas e histopatológicas. Entretanto, as estratégias terapêuticas permanecem principalmente concentradas nas abordagens cirúrgicas tradicionais como curetagem, eletrocauterização, exérese cirúrgica e a cirurgia micrográfica de Mohs (4,8,18,19). Tratamentos como a terapia fotodinâmica e estratégias tópicas como o imiquimode e o fluorouracil podem ser usadas em subtipos de baixo risco (19,20). A radioterapia, bem como os inibidores da via do SHH, estariam reservados para formas avançadas e inoperáveis (12,21,22).

1.2 Epidemiologia e fatores de risco

Sabe-se que o carcinoma basocelular tem níveis elevados de incidência. A Austrália tem a maior incidência de CBC do mundo com valores de 1041 casos por 100.000 homens e 745 por 100.000 mulheres (23).

Alguns países como Singapura possuem dados bastante acurados realizando registros de incidência de CPNM. Neste país a incidência de CBC apresentou um crescimento anual de 3%, através da análise dos dados de 1968 a 1997 (24). De fato, a incidência de CBC vem aumentando significativamente, em uma taxa de 77% nas últimas duas décadas (25). Algumas das postulações para explicar este fenômeno incluem o envelhecimento da população, mudanças no comportamento da sociedade, nos hábitos de exposição solar, no meio ambiente e um aumento do uso de drogas imunossupressoras (25,26).

Por outro lado, a real incidência desta doença é desconhecida em muitos países pois os cânceres de pele não melanoma (CPNM) geralmente não são contabilizados nos seus registros de câncer (27). Isto acontece, por exemplo, no Brasil e nos Estados Unidos da América (EUA) (3,8). Os CBCs respondem pela maioria dos CPNM, sendo normalmente mais que o dobro dos CEC (7,23,27).

Nos Estados Unidos, um estudo de base populacional na cidade de Rochester, no estado americano de Minnesota, calculou taxas anuais de incidência de CBC por 100.000 habitantes, padronizadas para a população branca dos EUA, de 175 casos em homens, 124 em mulheres e 146 combinadas em ambos os sexos (28). Estima-se que cerca de 40-

50% dos norte-americanos brancos que viverem até os 65 anos terão um CBC ou um carcinoma espinocelular (CEC) (29). É estimado que 1 em cada 5 americanos estaria em risco de desenvolver câncer de pele, sendo que 97% deles seriam CPNM (30). Cerca de 2,8 milhões de novos casos de CBC são diagnosticados todo ano nos EUA e estima-se que resultem em mais de 3000 mortes anuais (25).

Dados secundários governamentais e da Sociedade Brasileira de Dermatologia, baseados em notificações de consultas dermatológicas e de serviços de patologia cirúrgica, permitem estimar um número de casos novos de CPNM de 115.000 em 2010, representando 2,2% das consultas dermatológicas (3,31). A incidência variou amplamente entre as regiões, sendo de 85 casos por 100.000 habitantes na região Sul e 25 na região Nordeste. Entretanto, pela metodologia usada, provavelmente estes valores estão subestimados, já que boa parte das consultas não resulta em notificações, alguns casos não recebem tratamento cirúrgico, e dos que recebem, é possível que alguns não sejam enviados para serviços de patologia. Um estudo transversal de um serviço de dermatologia de Uberlândia encontrou a maioria dos casos de CBC no sexo feminino (59,3%) e em pacientes caucasianos (93%) (32).

Os fatores de risco para o CBC são divididos em constitucionais e comportamentais.

Pacientes com pele clara e fototipos baixos tem maior associação com o desenvolvimento de CBC (26,33). Os fototipos são baseados em uma escala numérica de I a VI que classifica a pele humana quanto à capacidade de se bronzear e de se queimar após exposição à radiação ultravioleta. Fototipos mais baixos, como I e II, estão mais propensos à queimadura solar e menos ao bronzeamento, enquanto fototipos mais altos, como V e VI, tem maior tendência ao bronzeamento e menor à queimadura solar (34).

A história de queimaduras solares na infância e a presença de efélides apresentam também forte associação com o desenvolvimento de CBC (33). Segundo Lear e colaboradores, a presença de fototipo I, cabelos ruivos ou loiros, e olhos azuis ou verdes estão associados ao CBC com *odds ratio* de 1,66, 1,61 e 1,71 respectivamente (35). Dentre os caucasianos, aqueles de origem celta, inglesa ou escandinava são os de maior risco de CBC (33).

Em afrodescendentes o CBC é a segunda neoplasia de pele mais comum atrás do CEC, sendo a incidência 19 vezes menor que em caucasianos (36). Nestes pacientes, boa parte destes CBCs é pigmentada (37).

O risco de desenvolver um CBC aumenta consideravelmente após o diagnóstico de um CBC prévio (38–40). Aparentemente este risco é maior no primeiro ano após o diagnóstico do CBC inicial, sendo as chances de um segundo, terceiro e quarto CBCs de 33,17%, 13,92% e 7,47%, respectivamente, neste primeiro ano (38). Outro estudo mostrou que o segundo CBC surgiu em média após 38,3 meses do primeiro, com uma taxa cumulativa de risco de um novo CBC de mais de 45,2% em cinco anos (39). Valor semelhante ao risco de 50% de um segundo CBC em cinco anos encontrado em outro estudo (40). Como comparativo, a taxa cumulativa de risco de CBC em uma população caucasiana geral, sem história de CBC prévio, dos EUA seria de 5% em cinco anos (39).

Pacientes com idade avançada são mais acometidos, de forma que mais da metade dos casos ocorrem entre os 50 e 80 anos de idade (3). Raramente ocorre antes dos 20 anos de forma esporádica. Os homens são mais acometidos (41). A incidência no sexo masculino costuma ser de 30-80% maior, quando padronizado para a mesma idade (18). Estes valores costumam ser explicados por fatores relacionados a exposições ocupacionais. Entretanto a incidência em mulheres vem aumentando, principalmente antes dos 40 anos (42,43). Alguns fatores associados a este aumento são a maior exposição solar, o uso de bronzamento artificial e a maior procura por atendimento médico especializado dentre os indivíduos do sexo feminino (3).

A exposição solar é o principal fator de risco ambiental. É proposto que o CBC ocorra em um período de 10 a 50 anos após o dano induzido pela radiação ultravioleta (41). A exposição solar recreacional na infância e na adolescência está fortemente associada ao desenvolvimento de CBC (33). Um estudo de caso controle na Austrália mostrou que os imigrantes europeus apresentavam riscos menores de CBC (*odds ratio* variando de 0 a 0,48 dependendo do país de origem) que os indivíduos nativos. Essa proteção era particularmente maior se o imigrante chegou após os 10 anos de idade (44).

As exposições agudas, intermitentes e as que levam a queimaduras solares parecem estar mais associadas que a exposição crônica continuada (8,18,33). Esta, por sua vez, está mais associada ao CEC (3,18). A proximidade ao Equador aumenta a incidência de CBC. Estados americanos de menor latitude tem maior incidência de CBC (8). Estes

dados reforçam o papel da exposição à radiação solar ultravioleta (UV) na gênese do CBC.

A radiação UV parece ser importante na origem de CBC em afrodescendentes, mas não para os CEC (36,37). Um estudo de caso controle comparando um grupo de caucasianos e latinoamericanos com outro de afrodescendentes encontrou a proporção de CBC para CEC de aproximadamente 4: 1 para a cabeça e pescoço. Em áreas não fotoexpostas a proporção de CBC para CEC foi de 1: 1 no primeiro grupo e 1: 8,5 no segundo (45).

Outras fontes de radiação ultravioleta como as câmaras de bronzamento artificial também estão associadas ao CBC. Um estudo envolvendo pacientes que desenvolveram CBC antes dos 40 anos mostrou um *odds ratio* de 25,0 nos usuários de bronzamento (46). Uma metanálise demonstrou um risco relativo de CBC após bronzamento artificial antes dos 25 anos de 1,4 (95% Intervalo de confiança {IC} = 1,29-1,52). Ou seja, existe um aumento de 40% no risco de CBC em relação à população controle (47).

Já no caso da terapia com psoraleno e UVA (PUVA), que é amplamente utilizada para tratamento de diversas afeções dermatológicas, a associação com CBC não se mostrou tão evidente. Contudo, a associação com CEC é fortemente descrita, principalmente quando o paciente é submetido a mais de 350 sessões (48).

O uso de medicações fotossensibilizantes também pode estar associado a um aumento do risco de CBC, particularmente nos casos de diagnóstico em pacientes mais jovens. Um estudo caso controle de base populacional mostrou que drogas fotossensibilizantes, especialmente os antibióticos tem um *odds ratio* de 1,5 para o desenvolvimento de CBC antes dos 50 anos de idade. (IC 95%: 1,1-2,1) (49).

Outros fatores de risco comportamentais incluem a exposição à água e alimentos contaminados com arsênico, ter sido submetido à radioterapia, e a imunossupressão. O risco de CPNM em pacientes imunossuprimidos por transplante de órgãos sólidos aumenta significativamente (3,8,50,51). O risco de CBC aumenta em torno de 10 vezes em relação à população geral (51). Em comparação com pacientes não transplantados, os paciente receptores de coração apresentaram aumento em 21 vezes de chance de CBC na Austrália e de 123 vezes nos EUA (50). Entretanto, a associação com CEC é muito mais

forte, o que faz deste o mais comum CPNM nesta população (41,50,51). Em pacientes com HIV, o risco relativo de CBC foi de 2.1 (IC 95% = 1,8-2,3) (52).

Tabela 1. Fatores de risco para o desenvolvimento de CBC.

Fatores de risco associados com exposição à radiação UV
Exposição intermitente e intensa ao sol (especialmente na infância e adolescência)
Origem étnica do norte da Europa, principalmente celta, inglesa e escandinava
Fototipos baixos
Tendência a queimar ao invés de bronzear
Proximidade ao equador
História de queimaduras solares na infância
Uso de camas de bronzamento
Outros fatores de risco
Exposição à radiação ionizante terapêutica
Exposição ao arsênico
Imunossupressão em receptores de transplantes de órgãos sólidos
HIV
Síndromes genéticas: Síndrome do nevo basocelular, xeroderma pigmentoso, Síndrome de Bazex, albinismo

1.3 Aspecto clínicos e histológicos dos carcinomas basocelulares

O CBC se caracteriza por um baixo potencial metastático e baixa mortalidade, porém apresenta alto potencial destrutivo local. Exérese cirúrgica de tumores avançados em áreas como as órbitas e a região nasal, ou ate mesmo com invasão de estruturas profundas como o cérebro e outros componentes do sistema nervoso central resultam em morbidade significativa (25). A metástase no CBC é extremamente rara ocorrendo entre 0.0028 a 0.5% dos casos (2,25).

A agência americana *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) publicou recomendações orientando condutas médicas para CPNM, no qual ela divide os CBC em alto e baixo risco, de acordo com probabilidade de recorrência (53).

Tabela 2. Classificação dos CBC quanto ao risco de recorrência. Adaptado da NCCN (53).

Anamnese e exame físico	Baixo risco	Alto risco
Localização/ tamanho	Área H < 6 mm	Área H ≥ 6 mm
	Área M < 10 mm	Área M ≥ 10 mm
	Área L < 20 mm	Área L ≥ 20 mm
Bordas	Bem definidas	Mal definidas
Primário vs recorrente	Primário	Recorrente
Imunossupressão	Ausente	Presente
Local de Radioterapia prévia	Ausente	Presente
Patologia		
Subtipo	Superficial, nodular	Padrão de crescimento agressivo
Envolvimento perineural	Ausente	Presente

A área H consiste na chamada “área de máscara” da face (face central, pálpebras, sobrancelhas, periorbital, nariz, lábios, queixo, mandíbula, pele pré-auricular e pós-auricular / sulcos, templo, orelha), incluindo também genitália, mãos e pés. Tumores localizados na área H necessitam de menores dimensões para se tornarem de alto risco.

Área M seria a das bochechas, testa, couro cabeludo e pescoço. Área L, por fim, o tronco e extremidades.

Os subtipos histológicos associados com padrão de crescimento agressivo incluem esclerodermiforme, esclerosante, infiltrativo e micronodular e estão associados a altas taxas de recorrência e destruição tecidual extensa (6,53,54). Entretanto, os diferentes subtipos guardam relação não apenas com o prognóstico, já que possuem apresentação clínica e mesmo dermatoscópica distinta (55).

As características clínicas do CBC são dependentes de sua variante clinico-histológica, podendo variar de pápulas, nódulos ou placas geralmente eritematosas. A superfície costuma ser lisa e de brilho perolado. É um tumor que pode ulcerar com facilidade ou apresentar erosões. As variantes clinico-histológicas mais frequentes são a superficial, a nodular e a infiltrativa, sendo os demais classificados como variantes incomuns (8,27).

É classificado em diferentes subtipos histológicos sendo que todos eles compartilham a presença de agregados de queratinócitos basalóides cercados por tecido estromal e demonstram tipicamente uma conexão com a epiderme. A seguir, os principais subtipos clínico-histológicos serão abordados:

a) Nodular

É a forma mais comum respondendo por 50 a 79% dos casos (6,54,56). Clinicamente se apresenta como uma pápula eritematosa com superfície perolada brilhosa, translúcida por vezes bocelada, com pequenas telangiectasias arboriformes. O crescimento tumoral pode resultar em erosão ou até ulceração central que se tornam recobertas por crostas e adquirindo bordas firmes e elevadas que preservam as características clínicas da pápula inicial e podem servir de pista diagnóstica (6,8). 90% dos CBC nodulares se localizam na cabeça. Predominam nas regiões malares, sulcos nasolabiais, fronte e pálpebras (56).

Histologicamente se caracteriza por ninhos discretos, grandes ou pequenos, de células basaloides (semelhantes às da camada basal da epiderme) localizados na derme papilar e na reticular acompanhados por uma característica retração tumoral com formação de uma fenda no contato com o estroma. As células estão dispostas em forma de paliçada periférica nos ninhos tumorais. Mítoses são incomuns. A ulceração pode estar presente e a necrose pode levar à formação de espaços císticos dentro de tumores maiores. Recebe o nome de nódulo cístico quando estes espaços são preenchidos por mucina. É comum apresentarem um componente superficial ou micronodular. Transição para formas de crescimento agressivo pode ocorrer (6).

b) Superficial

É o segundo subtipo mais comum (8,54,56). A lesão normalmente se apresenta como uma placa ou mácula bem delimitada, eritematosa, descamativa (8). Responde por cerca de 15% dos casos (56). Áreas de atrofia espontânea podem acontecer levando à formação de áreas hipocrômicas. Uma borda elevada pode se formar, normalmente pela confluência de pequenas pápulas translúcidas de brilho perolado. Diferente de outros subtipos de CBC o superficial predomina no tronco e extremidades (6,27,54,56). Costuma acometer pacientes mais jovens que os demais (8).

Histologicamente se caracteriza por uma proliferação de células basaloides atípicas

que formam um eixo paralelo à superfície epidérmica e demonstram uma retração em forma de fenda das células da paliçada em relação ao estroma subjacente (6). As fendas resultantes podem ser ocupadas por material mucoide que cora pelo *alcian blue*. Mitoses são raras. Um infiltrado linfocítico em faixa pode estar presente.

c) Infiltrativo

Considerado um subtipo de alto risco, é mais agressivo que o CBC nodular e superficial, pois costuma apresentar disseminação subclínica. Corresponde a cerca de 5 a 15 % dos casos de CBC (8,53,54,56). Muitos autores o classificam no mesmo subtipo que o esclerodermiforme pelas suas semelhanças clínicas e histopatológicas (8,56). Normalmente se apresentam como placas infiltradas ou atróficas, de limites imprecisos, superfície lisa, brilhante, de cor rósea-marfim (8). Telangiectasias podem estar presentes. Muitas vezes há atrofia e o aspecto é semelhante a uma cicatriz. As lesões costumam ser discretas, mas podem desenvolver erosões recobertas por crostas. Se apresentam tipicamente em áreas fotoexpostas, com 95% deles no segmento cefálico (56).

O CBC infiltrativo se apresenta na histopatologia com ninhos de formato irregular, cujos contornos periféricos se apresentam de forma espiculada, com alongamentos com aspecto de cordões de células basaloides que se estendem através do estroma (6,54). Este é fibrótico com densos feixes de colágeno. Os cordões de células tumorais contêm de cinco a oito células de espessura. É comum a atividade mitótica e a necrose destas células. A paliçada periférica é pouco desenvolvida e as retrações em fendas são incomuns (54). O crescimento tumoral acontece de forma pouco circunscrita, podendo invadir derma, hipoderma e mesmo estruturas musculares adjacentes. O risco de invasão perineural é bem maior neste subtipo (6).

1.4 Fisiopatologia e a via do *Sonic Hedgehog*

Os genes que modulam o ciclo celular se dividem classicamente em proto-oncogenes: aqueles que estimulam o crescimento, a divisão celular e a sobrevivência das células; e os genes supressores tumorais: aqueles que ajudam a prevenir o crescimento celular desenfreado e promovem a reparação do DNA e a ativação do ponto de verificação do ciclo celular. Portanto, as principais alterações genéticas envolvidas, de forma genérica, na carcinogênese são mutações de ganho de função em proto-oncogenes, e mutações de perda de função em genes supressores tumorais (57).

Por muito tempo a única alteração molecular genética reconhecida na carcinogênese do CBC foi a mutação no gene supressor tumoral P53 (58,59).

Os CBCs são cânceres sem uma lesão precursora, que surgem *de novo*, cuja origem celular permanece controversa (41,60). As células tumorais que o compõe tem um aspecto morfológico que lembra a camada basal da epiderme, sendo esta a origem de seu nome. Por muito tempo se advogou que o CBC fosse originário das células tronco do bulbo do folículo piloso. Entretanto, existem evidências de que elas sejam derivadas das células pluripotentes da epiderme interfolicular e da camada superior do infundíbulo piloso (a parte da epiderme que conecta o folículo à epiderme interfolicular). Um estudo realizou análise clonal de células de camundongos mutantes de forma constitucional para o gene *Smoothened* e identificou o surgimento das células tumorais a partir das células progenitoras residentes da epiderme interfolicular e do infundíbulo superior, mas não observou tal ocorrência nas células pluripotentes do bulbo (61).

O gene *Smoothened* (Smo em camundongos e na *Drosophila*; SMOH em humanos) é um dos componentes da via do *Hedgehog* (Hh) cuja ativação se mostrou fundamental na fisiopatologia do CBC (58).

Os estudos da via de sinalização do *Hedgehog* (Hh) se iniciaram com a descrição do gene *Hedgehog* em 1980, na *Drosophila melanogaster*, a mosca da fruta, em estudos de vias de diferenciação embriológica por Nusslein-Volhard e Wieschaus (62). Os estudos desta via nesta espécie identificaram o gene *patched* (*ptc* na *Drosophila*; *Ptch1* em camundongos; e *PTCH1* em humanos), que apresentou forte homologia com uma sequência identificada em humanos, o *patched 1* (*PTCH1*) (58,63–66).

Embora um único gene Hh tenha sido identificado na *Drosophila*, foram encontrados três homólogos deste gene em vertebrados: o *Sonic Hedgehog*, o *Desert Hedgehog* e o *Indian Hedgehog* (11,67,68). Curiosamente, os mecanismos de processamento e secreção do Hh parecem ter sido preservados ao longo da evolução e se aplicam a todas as isoformas encontradas em mamíferos (69,70). Todos os três são ligantes da via com importância no desenvolvimento embrionário e na organogênese (71,72). Entretanto, O *Sonic hedgehog* (SHH em humanos; *Shh* em camundongos) é o mais potente dos três ligantes e o mais comumente expresso e caracterizado em tecidos embriológicos e adultos (70,73–75). Ele é ativo na vida embrionária, sendo extremamente importante na embriogênese normal (75,76). Nos adultos, em condições fisiológicas,

costuma estar inativo, exceto na função de regeneração de tecidos e regulação da proliferação celular (11,76).

A superativação desta via pode levar à formação de tumores sólidos em diferentes tecidos. Dos três ligantes Hh, o SHH é o dominante na oncogênese (77). Existem evidências do envolvimento da via do SHH na carcinogênese de diversos tumores como os CBCs na pele, meduloblastomas, gliomas no sistema nervoso central, rabiomiossarcomas, cânceres de pulmão de pequenas células, de pâncreas, de próstata, do trato digestivo e formas de leucemia (12,14,78–85). Em uma revisão publicada na revista *Science*, os autores estimaram que a ativação contínua da via do Hh estaria implicada no crescimento de cânceres de origem endodérmica que juntos seriam responsáveis por 25% das mortes por câncer em seres humanos (86).

Os componentes centrais desta via de sinalização consistem em um ligante (um dos três homólogos do *Hedgehog* [Hh]), um receptor de membrana com regulação negativa (*Patched* [PTCH1]), um receptor com regulação positiva (*Smoothened* [SMOH]) e os fatores de transcrição (GLI1, GLI2 e GLI3) do oncogene associado ao glioma (GLI) (9,10,12,58).

A via do Hh se inicia com a produção e secreção do ligante Hh por uma célula secretora (Figura 1). Esta secreção se inicia quando o domínio C-terminal do polipeptídeo Hh catalisa uma transferência de colesterol intramolecular que resulta na formação de um domínio de sinalização no terminal N do Hh (HhN) (87). A modificação do colesterol permite a associação do Hh com a membrana celular e facilita o processamento da molécula que resulta em HhN ativo (76,88). Este é então secretado para exercer sua função em tecidos distais cuja interação é proporcional ao seu gradiente de concentração nestes locais (10,76,89). Diversas moléculas podem se ligar ou interferir com as concentrações de Hh no meio, entretanto sua principal interação se dá na membrana da célula alvo com o receptor Patched (PTCH1). Este receptor foi encontrado em todas as espécies analisadas (86,90).

Na ausência do ligante SHH, o PTCH1 inibe cataliticamente a atividade da proteína transmembrana Smoothened (SMOH), um tipo de receptor com sete segmentos transmembranares (91). O supressor de fusão (SUFU), um regulador negativo da via, funciona entre o SMOH e os fatores de transcrição GLI (92). Neste contexto o SUFU liga-se diretamente aos fatores de transcrição GLI e os ancora no citoplasma impedindo

a ativação dos genes alvos do GLI (93). O sequestro dos GLI pelo SUFU impede sua translocação nuclear e promove a fosforilação e o processamento dos GLI em um repressor truncado, sendo por fim submetidos a clivagem proteossômica o que termina por inibir a via do SHH (94).

Nos vertebrados, são três os fatores de transcrição GLI (GLI1, GLI2 e GLI3), sendo o GLI1 o único ativador transcricional completo funcionando em um ciclo de retroalimentação positiva da via. GLI2 funciona como um ativador transcricional, enquanto o GLI3 atua como principal repressor da transcrição (95,96).

A ligação do SHH ao PTCH1 resulta em perda da atividade do PTCH1 e consequente ativação do SMOH (76,91). Este leva à transdução do sinal do Hh ao citoplasma permitindo, por fim, a ativação da família GLI de fatores de transcrição (86,89,97). Em resposta à ligação do ligante SHH, o GLI2 se acumula no cílio primário e impulsiona a ativação transcricional, superando a regulação negativa do GLI3 (98).

Os principais componentes da via do Hh, incluindo o PTCH1, SMOH, SUFU e as proteínas GLI se localizam dinamicamente em uma estrutura denominada de cílio primário (99,100). Este corresponde a uma pequena organela formada a partir de microtúbulos que se projeta da superfície de células de vertebrados (100). Após a ligação com o ligante SHH, PTCH1 deixa a base do cílio enquanto o SMOH se acumula em seu interior. Os cílios também participam da inibição da via mediando o processamento proteolítico do GLI em seu derivado truncado desligando os genes alvo (100). Além disso, a localização precisa das proteínas dentro do cílio primário é importante para a transdução do sinal (9).

Na oncogênese de mamíferos, as proteínas SMOH ativadas se localizam no retículo endoplasmático e sofrem uma internalização após ativação da via (101,102).

A relação de sinalização do Hh começou a ser relacionada com o câncer após o relato de mutações com perda de função do PTCH em pacientes com a síndrome do nevo basocelular (SNBC) ou Síndrome de Gorlin (63,103). A SNBC, descrita em 1960 (104), é um distúrbio autossômico dominante caracterizado principalmente por múltiplos CBCs, depressões diskeratóticas cutâneas palmo-plantares e queratocistos odontogênicos (105). Estes pacientes apresentam uma mutação em um alelo do gene do PTCH1 que resulta, na maioria dos casos, em uma proteína PTCH1 truncada, significando um alelo sem função

(106). Os portadores desta síndrome apresentam uma predisposição a uma série de tumores além do CBC como meduloblastomas, rabdomiossarcomas e meningiomas (105).

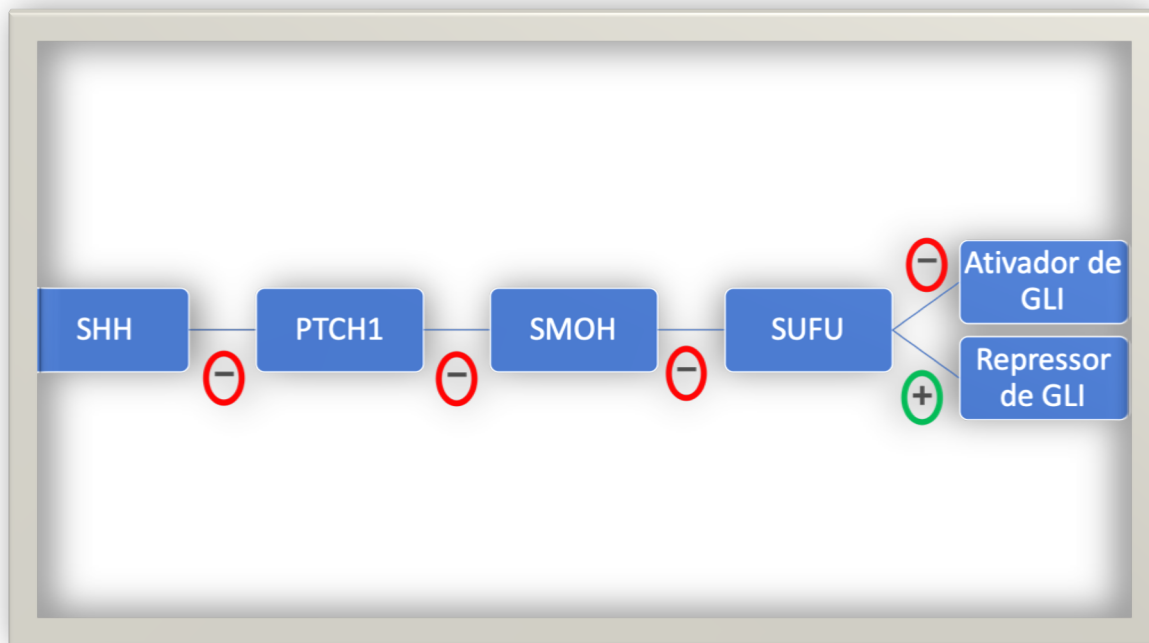


Figura1. Esquema da via do SHH em vertebrados. A via se inicia com a secreção do ligante SHH. Este interage com o seu receptor transmembrana PTCH1. Na ausência do ligante, o PTCH1 inibe a atividade do Smoothened (SMOH), um receptor do tipo acoplado à proteína G, provavelmente, por evitar que este se localize junto à superfície celular. O SMOH inibe o supressor de fusão (SUFU), um regulador negativo da via. A ligação do SHH ao PTCH1 libera a inibição do SMOH e inicia a cascata de sinalização ativando vários genes importantes, incluindo membros do fator de crescimento transformador, família de proteínas Gli e Wnt, bem como o próprio PTCH1. Existe também outra proteína que interage com o HH, o HIP (Hh-interacting protein) que pode atenuar a sinalização de SHH devido a sua alta afinidade de ligação com o ligante.

A ideia de que a via de sinalização do SHh estava envolvida na oncogênese foi reforçada pela descoberta em CBCs esporádicos de mutações no PTCH1 (59,64) e SUFU (58) além de mutações de ganho de função no SMOH (107). Inativação em ambos os alelos do PTCH1 leva a uma regulação positiva da via do SHH, dessa forma ele seria um gene supressor tumoral clássico (58). Mutações recorrentes no SMOH podem também levar a uma ativação aberrante da via Hh e promover a formação de tumores (107).

Além da gênese tumoral, estudos com leucemia mielóide crônica e câncer de mama relacionaram a via do SHh na manutenção das células tronco tumorais, permitindo sua propagação e renovação, além da disseminação metastática (108,109).

A radiação UV induz a mutações específicas, de substituição de bases nitrogenadas, no genoma humano que recebem o nome de “assinatura UV” (110). Vários estudos identificaram este padrão específico de alterações nas mutações somáticas do PTCH1

(111–113). Um estudo de revisão estimou que cerca de metade das mutações somáticas de PTHC1 apresentam as “assinaturas UV” (114). Assim, a radiação UV pode causar uma mutação de inativação do gene PTCH que levaria a uma desregulação da via com estimulação da proliferação celular, correlacionando a carcinogênese do CBC à radiação UV que é o seu principal fator de risco.

O conhecimento desta via levou ao desenvolvimento de uma nova classe de drogas como alternativa ao tratamento do CBC avançado. Constituem uma forma de terapia alvo sendo chamados de inibidores *Smoothened*, uma referência a proteína alvo da via.

A ciclopamina foi a primeira droga desenvolvida. Trata-se de um alcaloide esteroide, com relatos de causar malformações como ciclopia e holoprosencefalia. Foi isolada da *Veratrum californicum*, um lírio subalpino, com forte potencial de se ligar ao SMOH e inibir a sinalização da via do SHH (115,116). Apesar do comprovado efeito em inibir o crescimento tumoral, não chegou a ser usada em humanos pelo perfil de efeitos colaterais que apresentou em modelos animais (117,118).

O primeiro inibidor SMOH aprovado pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento de CBCs avançados foi o vismodegibe que começou a ser comercializado em 2012. O vismodegibe se liga diretamente ao SMOH, com alta afinidade e especificidade, inibindo a ativação dos fatores de transcrição GLI (17,119). Atualmente está indicado para tratar, em pacientes adultos, CBCs metastáticos, ou CBCs localmente avançados, recorrentes, que não são candidatos à cirurgia ou radioterapia (120), tendo se mostrado efetivo em suprimir o crescimento do CBC com ação tumoricida e tumoristático (121,122). Em ensaios clínicos o vismodegibe levou a regressão tumoral, e mostrou eficácia e segurança sustentada em seguimento de 12 meses em pacientes com CBC avançado (123).

Entretanto, em um relato de tratamento em meduloblastoma o progresso do tratamento cessou após três meses sendo esta falha atribuída a uma nova mutação no SMOH (124). Estudos identificaram novas mutações no SMOH que seriam responsáveis pela resistência tumoral adquirida do meduloblastoma (125,126).

O CBC é um câncer mais indolente que o meduloblastoma, e as respostas encontradas têm sido mais duradouras. Contudo, uma mutação no SMO secundária foi identificada em um CBC de crescimento progressivo de um paciente em tratamento com

vismodegibe, sugerindo que mecanismos similares ao do meduloblastoma de resistência adquirida possam ser aplicados ao CBC (17).

Em 2015, o sonidegibe foi também aprovado para o tratamento de CBC avançado (9,127). Inúmeros outros inibidores do SMOH estão em estudo com humanos contra CBCs como erimodegibe, XL-139, itraconazol, posaconazol e saridegibe (128–130).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estratégias para localizar e selecionar as informações

Esta revisão da literatura está focada nos aspectos relacionados aos principais componentes da via do SHH no contexto da carcinogênese do CBC. Também focamos nos ensaios de imuno-histoquímica dos componentes da via e sua relação com os subtipos histológicos do CBC. A estratégia de busca envolveu as seguintes bases de dados: PubMed e Embase. Foram realizadas buscas através dos termos: “basal cell carcinoma”, “histologic subtypes”, “sonic hedgehog pathway”, “sonic hedgehog”, “PTCH” e “smoothened”. Suas combinações estão apresentadas na Tabela 1.

Figura 2: Estratégia de busca de referências bibliográficas sobre as bases que fundamentam os objetivos deste estudo. Resultados com a combinação de palavras-chave.		
	basal cell carcinoma AND histologic subtypes AND sonic hedgehog pathway	
	Pubmed	Embase
Artigos encontrados	1	3
Seleção por título	1	1
Selecionados	1	1
	basal cell carcinoma AND histologic subtypes	
	Pubmed	Embase
Artigos encontrados	137	214
Seleção por título	12	29
Selecionados	5	7
	basal cell carcinoma AND histologic subtypes AND Immunochemistry	
	Pubmed	Embase
Artigos encontrados	20	3
Seleção por título	3	2
Selecionados	1	1
	basal cell carcinoma AND sonic hedgehog	
	Pubmed	Embase
Artigos encontrados	216	985
Seleção por título	35	86

Selecionados	22	31
	basal cell carcinoma AND smoothened	
	Pubmed	Embase
Artigos encontrados	267	550
Seleção por título	36	75
Selecionados	20	29
	basal cell carcinoma AND PTCH	
	Pubmed	Embase
Artigos encontrados	386	341
Seleção por título	46	52
Selecionados	19	23

4. MARCO CONCEITUAL

As principais alterações necessárias para a carcinogênese do CBC são as mutações de perda de função no PTCH1. Portanto, os acontecimentos fundamentais ocorrem a jusante do PTCH1, de forma que o ligante SHH, não participaria deste processo. Sabendo que o ligante SHH inativa o PTCH1, exercendo função semelhante à estas mutações, investigamos se a expressão da proteína SHH exerce alguma função na carcinogênese do CBC, bem como se a sua expressão está associada aos fenótipos mais agressivos e aos marcadores histopatológicos de agressividade.

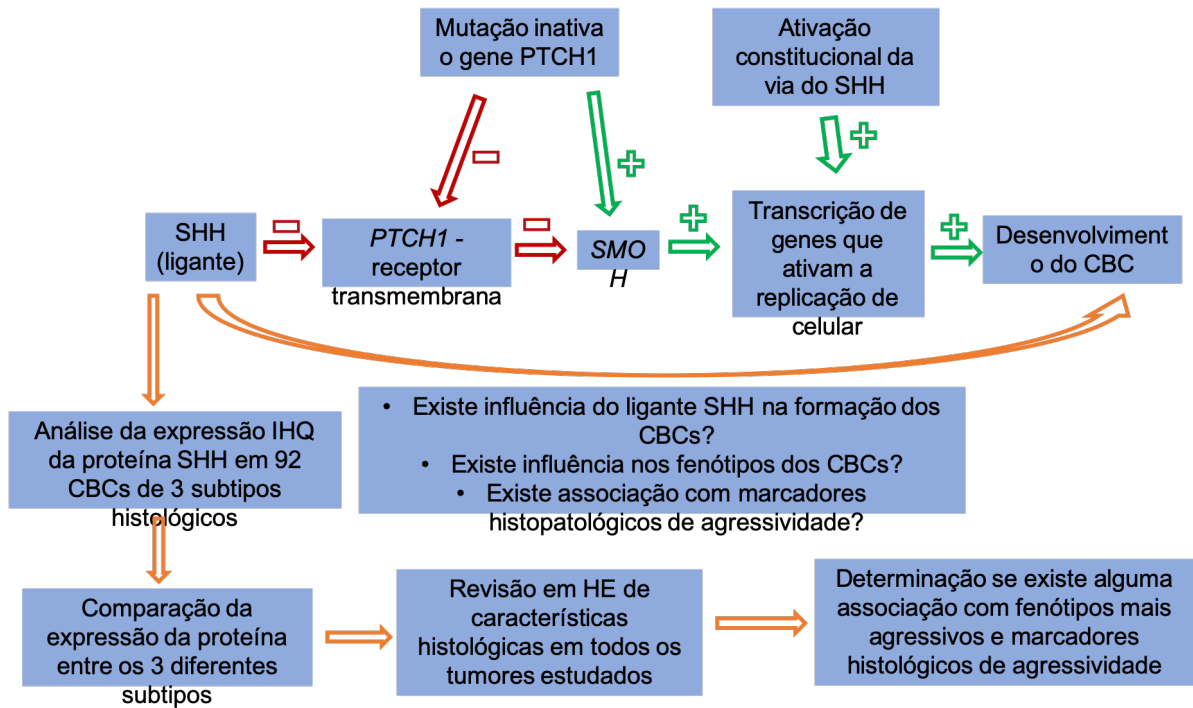


Figura 3. Marco conceitual esquemático do projeto de pesquisa.

3. JUSTIFICATIVA

Estudos de microarranjo de DNA identificaram um perfil recorrente de genes, nas amostras de CBC estudadas, que estariam implicados na oncogênese deste tumor, principalmente relacionados com as funções de motilidade celular, morfogênese celular, regulação do ciclo celular, adesão e migração celular, metabolismo celular e genes envolvidos com a matriz extracelular (131–133). Este perfil genético com regulação positiva de genes relacionados à proliferação celular e à matriz extracelular parece explicar o comportamento de crescimento expansivo e raramente metastático do CBC.

Embora alguns estudos tenham mostrado um perfil semelhante de genes entre os diferentes subtipos histológicos de CBC (132,133), existem evidências de que estes subtipos possam apresentar categorias de genes específicas, que estariam relacionadas ao comportamento e morfologia diferentes destes subtipos tumorais (131).

Dentre os genes envolvidos na gênese de CBC, aqueles que aumentam a sinalização da via do SHH se mostram particularmente cruciais (58,134). Estima-se que até 90% dos CBCs esporádicos possam ter alguma alteração molecular em um componente da via do SHH (58,59,66,112,114).

Esta associação parece guardar relação com o nível de atividade de sinalização. Um estudo com camundongos mutantes mostrou que níveis modestos de desregulação da via SHH levaram ao desenvolvimento de hamartomas foliculares basaloides cutâneos, enquanto que níveis elevados de sinalização foram determinantes para o desenvolvimento de CBCs. Assim, níveis diferentes de atividade de sinalização da via SHH estão implicados em fenótipos tumorais distintos (135).

Dessa forma, pode-se inferir que os diferentes subtipos histológicos possam cursar com diferentes níveis de atividade dos componentes da via do SHH. Contudo, essa diferença não foi um achado universal nos estudos. Um estudo de 1997 analisou o RNAm do PTCH1 em 36 CBCs de 22 pacientes, sendo 20 tumores de pacientes com síndrome do nevo basocelular e 16 CBCs esporádicos. Foi encontrado marcação positiva em todos os CBCs examinados, e marcação classificada como forte foi vista em 2 de 7 CBCs infiltrativos, 8 de 23 CBCs nodulares e 0 de 6 CBCs superficiais (136).

Em uma análise do perfil genético através de microarranjos de DNA de 23 CBCs com os subtipos superficial, nodular e esclerodermiforme, foi encontrado que alguns

genes da via do SHH estavam expressos nos três subtipos, porém, sem deixar claro se houve diferença estatística nos graus de expressão destes genes entre os subtipos histológicos (131).

Outro estudo que avaliou a expressão de RNA mensageiro em 25 CBCs detectou diferença nos níveis de PTCH1 e SMOH entre os subtipos histológicos, com níveis elevados nos CBCs nodulares e indetectáveis nos superficiais (14). Entretanto, em outra análise de microarranjo de DNA, com uma amostra de 20 CBCs nodulares e superficiais, foi encontrado níveis elevados de PTCH1 em ambos os subtipos, sem diferença estatística entre eles (133). Neste estudo, o perfil genético dos CBCs foi comparado com amostras de pele normal. Os níveis de PTCH1 e de GLI2 estiveram elevados significativamente, porém, os níveis de SHH não apresentaram alterações significativas (133).

O gene SHH se mostrou importante para o desenvolvimento embriológico humano quando foram identificadas mutações germinativas como responsáveis pelo desenvolvimento da holoprosencefalia, uma síndrome que cursa com malformações crânio faciais e retardo mental ao nascimento (137). De uma forma geral, as mutações associadas ao CBC não guardam relações com a holoprosencefalia. Entretanto, foi relatado em 2012 um caso de translocação envolvendo o gene SHH associada a uma superexpressão da proteína SHH em um homem de 41 anos com características fenotípicas de uma holoprosencefalia leve e diversos CBCs avançados, com história de terem se iniciado aos 9 anos (138).

Um estudo de 1997 com camundongos mutantes com ativação constitutiva do ligante Shh levou ao desenvolvimento de CBCs num período de apenas quatro semanas sem outros estímulos carcinogênicos nestes animais (77). Em outro estudo, a superexpressão do Shh também induziu em poucos dias à formação de múltiplos CBCs em camundongos transgênicos (139). Estes autores, respaldados por estes achados, realizaram uma triagem em tumores esporádicos humanos e encontraram SHH mutantes em 1 de 43 CBCs, 1 de 14 meduloblastomas e 1 de 6 carcinomas de mama (139), com estes 3 tumores apresentando a mesma alteração em comum: a mutação missense H133Y. Assim, ganhou força a ideia de que o SHH pudesse ser um importante oncogene envolvido na formação de diversos tumores humanos.

Entretanto, análises subsequentes não identificaram esta mutação nem nestes, nem em outros tipos tumorais (140,141). Além disso, estudos seguintes evidenciaram que o

principal papel oncológico da via do SHH se faz através de mutações de perda de função do PTCH1 e do SUFU, e as de ganho de função do SMOH. Alterações somáticas nestes genes levariam a uma ativação constitutiva da via SHH e a transdução dos genes-alvo.

De fato, mutações nestes genes estão envolvidas com gênese da maioria dos CBCs esporádicos, sendo as do PTCH1 encontradas em 30-60% (14,59,64,65,112) dos casos seguidas pelas no SMOH ou SUFU (10-20%)(14,107,112,142). Já as mutações no SHH se mostraram extremamente raras.

Os PTCH1 e o SMOH foram amplamente estudados no CBC, seja na expressão gênica, no RNAm bem como a expressão dos seus produtos proteicos e as suas relações com a formação tumoral e os diferentes fenótipos tumorais.

Sabendo da raridade das mutações no SHH na carcinogênese do CBC, os principais acontecimentos para a formação tumoral parecem acontecer a jusante na via. Porém, não fica claro se a proteína ligante SHH exerce alguma influência nesse processo. Estudos que avaliam a expressão da SHH neste tumor e sua relação com o comportamento tumoral são escassos na literatura. Portanto, resolvemos investigar como se dá a expressão da proteína ligante SHH e sua correlação com as características histológicas dos CBCs, bem como com os parâmetros relacionados com agressividade e pior prognóstico tumoral.

Hipótese em estudo:

A proteína ligante SHH pode influenciar o fenótipo clínico-histopatológico dos carcinomas basocelulares.

4. OBJETIVOS:

4.1 Objetivo Principal

Investigar a expressão IHQ da proteína ligante SHH e suas associações com características clínico-histológicas de CBCs em pacientes atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

4.2 Objetivos secundários

Descrever os achados clínico-histológicos de uma amostra de pacientes com CBC avaliados pelo Serviço de Dermatologia no HCPA.

Identificar possíveis características clínicas do paciente e histológicas do tumor que podem diferenciar a expressão do ligante SHH como localização do tumor em áreas fotoexpostas, imunossupressão do paciente, idade, invasão perineural do tumor, ulceração, expressão de paliçada periférica, cor da pele e pigmentação tumoral.

5. REFERÊNCIAS

1. Crouch HE, Gloucestershire D, Hospital R, Glj G. History of basal cell carcinoma and its treatment. *J R Soc Med.* 1983;76(October 1982):302–6.
2. Moser S, Borm J, Mihic-probst D, Jacobsen C, Kruse AL. Metastatic basal cell carcinoma: report of a case and review of the literature. *ORAL Maxillofac Surg [Internet].* 2014;117(2):e79–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2012.04.030>
3. Chinem VP, Miot HA. Epidemiology of basal cell carcinoma. *An Bras Dermatol.* 2011;86(2):292–305.
4. Wong C, Strange R, Lear J. Basal cell carcinoma. *BMJ.* 2003;327(October):794–8.
5. Wollina U, Tchernev G. Advanced basal cell carcinoma. *Wiener Medizinische Wochenschrift.* 2013;163(15–16):347–53.
6. Crowson AN. Basal cell carcinoma: biology, morphology and clinical implications. *Mod Pathol [Internet].* 2006;19:S127–47. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/modpathol.3800512>
7. De Zwaan SE, Haass NK. Genetics of basal cell carcinoma. *Australas J Dermatol [Internet].* 2009;51(2):81–92. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-0960.2009.00579.x>
8. Marzuka AG, Book SE. Basal Cell Carcinoma: Pathogenesis , Epidemiology , Clinical Features , Diagnosis , Histopathology , and Management. *YALE J Biol Med.* 2015;88:167–79.
9. Pak E, Segal RA. Hedgehog Signal Transduction: Key Players, Oncogenic Drivers, and Cancer Therapy. *Dev Cell [Internet].* 2016;38(4):333–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2016.07.026>
10. Rohatgi R, Scott MP. Patching the gaps in Hedgehog signalling. *Nat Cell Biol.* 2007;9(9):1005–9.
11. Lupi O. Correlations between the Sonic Hedgehog Pathway and basal cell carcinoma. *Int J Dermatol.* 2007;46(11):1113–7.

12. Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo HW. Targeting the sonic hedgehog signaling pathway: Review of smoothed and GLI inhibitors. *Cancers (Basel)*. 2016;8(2):1–23.
13. Atwood SX, Li M, Lee A, Tang JY, Oro AE. *Carcinoma Growth*. 2013;494(7438):484–8.
14. Tojo M, Mori T, Kiyosawa H, Honma Y, Tanno Y, Kanazawa KY, et al. Expression of sonic hedgehog signal transducers, patched and smoothed, in human basal cell carcinoma. *Pathol Int*. 1999;49(8):687–94.
15. Kudchadkar R, Lewis K, Gonzalez R. Advances in the treatment of basal cell carcinoma: Hedgehog inhibitors. *Semin Oncol [Internet]*. 2012;39(2):139–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1053/j.seminoncol.2012.01.011>
16. Cirrone F, Harris CS. Vismodegib and the Hedgehog Pathway: A New Treatment for Basal Cell Carcinoma. *CLITHE [Internet]*. 2012;34(10):2039–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.clinthera.2012.08.011>
17. Rudin CM. Vismodegib. *Nat Rev Drug Discov [Internet]*. 2012;11(6):437–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrd3753>
18. Lear JT, Harvey I, de Berker D, Strange RC, Fryer AA. Basal cell carcinoma. *J R Soc Med*. 1998;91:585–8.
19. Bath-hextall F, Ozolins M, Armstrong SJ, Colver GB, Perkins W, Miller PSJ, et al. Surgical excision versus imiquimod 5 % cream for nodular and superficial basal-cell carcinoma (SINS): a multicentre , non-inferiority , randomised controlled trial. 2014;15(January).
20. Kelleners-smets NWJ. Photodynamic therapy versus topical imiquimod versus topical fluorouracil for treatment of superficial basal-cell carcinoma : a single blind , non-inferiority , randomised controlled trial. 2013;647–54.
21. Locke J, Karimpour S, Young G, Lockett MA, Perez CA. Radiotherapy for epithelial skin cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001;51(3):748–55.
22. Rimkus TK, Carpenter RL, Qasem S, Chan M, Lo H. Targeting the Sonic Hedgehog Signaling Pathway: Review of Smoothed and GLI Inhibitors.

- Cancers (Basel). 2016;8(22):1–23.
23. Staples MP, Elwood M, Burton RC, Williams JL, Marks R, Giles GG. Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust.* 2006;184(1):6–10.
 24. Koh D, Wang H, Lee J, Chia KS, Lee HP, Goh CL. Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the skin : analysis of the Singapore Cancer Registry data 1968 – 97. *Br J Dermatol.* 2003;148:1161–6.
 25. Mohan S V., Chang ALS. Advanced Basal Cell Carcinoma: Epidemiology and Therapeutic Innovations. *Curr Dermatol Rep [Internet].* 2014;3(1):40–5. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s13671-014-0069-y>
 26. Nan H, Kraft P, Hunter DJ, Han J. Genetic variants in pigmentation genes, pigmentary phenotypes , and risk of skin cancer in Caucasians. *Int J Cancer.* 2009;125(February):909–17.
 27. Rubin AI, Chen EH, Ratner D. Basal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med.* 2005;353:2262–9.
 28. Chuang T-Y, Popescu A, Su D, G. Chute C. Basal cell carcinoma. A population-based incidence study in Rochester, Minnesota. *J Am Acad Dermatol [Internet].* 1990;22(3):413–7. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0190-9622\(90\)70056-N](http://dx.doi.org/10.1016/0190-9622(90)70056-N)
 29. NIH. Cancer Trends Progress Report. https://progressreport.cancer.gov/prevention/sun_protection. 2015.
 30. Rigel DS, Friedman RJ, Kopf AW. Lifetime risk for development of skin cancer in the. *J Am Acad Dermatol.* 1996;35(6):1012–3.
 31. Dermatologia SB De. Nosologic profile of dermatologic visits in Brazil *. *81(6):549–58.*
 32. Mantese SAO, Gomides MDA, Rocha A, Berbert ALC V. Basal cell Carcinoma - Analysis of 300 cases observed in Uberlândia - MG, Brazil. *An Bras Dermatol.* 2006;81(2):136–42.

33. Gallagher RP, Hill GB, Bajdik CD, Coldman AJ, Mclean DI, Threlfall WJ. Sunlight Exposure, Pigmentary Factors, and Risk of Nonmelanocytic Skin Cancer. I. Basal Cell Carcinoma. *JAMA*. 1995;131:157–63.
34. Fitzpatrick TB. The Validity and Practicality of Sun-Reactive Skin Types I Through VI. *JAMA Dermatology*. 1988;124(6):869–71.
35. Lear JT, Tan BB, Smith AG, Bowers W, Jones PW, Heagerty AH, et al. Risk factors for basal cell carcinoma in the UK: case-control study in 806 patients. *J R Soc Med*. 1997;90:371–4.
36. Gloster HM, Neal K. Skin cancer in skin of color. *J Am Acad Dermatol*. 2006;55(5):741–60.
37. Jackson BA. Nonmelanoma Skin Cancer in Persons of Color. *Semin Cutan Med Surg* [Internet]. 2009;28(2):93–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.sder.2009.04.010>
38. Schreiber MM, Moon TE, Fox SH, Davidson J, Tucson MS. The risk of developing subsequent nonmelanoma skin cancers. *J Am Acad Dermatology*. 1990;23:1114–8.
39. Marghoob A, Kopf AW, Bart RS, Sanfilippo L, Silverman MK, Lee P, et al. Risk of another basal cell carcinoma developing after treatment of a basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1993;28(1):22–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0190-9622\(93\)70003-C](http://dx.doi.org/10.1016/0190-9622(93)70003-C)
40. Karagas MR, Stukel A, Greenberg ER, Baron JA, Mott LA, Stern RS, et al. Risk of Subsequent Basal Cell Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma of the Skin Among Patients With Prior Skin Cancer. *JAMA*. 1992;267:3305–10.
41. Roewert-Huber J, Lange-Asschenfeldt B, Stockfleth E, Kerl H. Epidemiology and aetiology of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2007;157:47–51.
42. Christenson LJ, Borrowman TA, Vachon CM, Otley CC, Weaver AL, Roenigk RK. Incidence of Basal Cell and Squamous Cell Carcinomas in a Population Younger Than 40 Years. *JAMA*. 2015;294(6):681–90.
43. Evans SS, Jih MH, Goldberg LH. Increased Burden of Melanoma and

- Nonmelanoma Skin Cancer in Young Women. *Dermatol Surg*. 2014;40(12):1385–9.
44. Kricger A, Strong BKARM, English DR, Heenan PJ. Pigmentary and cutaneous risk factors for non-melanocytic skin cancer--a case-control study. *Int J Cancer*. 1991;48:650–62.
 45. Singh B, Bhaya M, Shaha A, Har-el G, Lucente FE. Presentation, course, and outcome of head and neck skin cancer in African Americans: a case-control study. *Laryngoscope*. 1998;108(August):1159–63.
 46. Bakos RM, Kriz M, Mühlstlsquädt M, Kunte C, Ruzicka T, Berking C. Risk factors for early-onset basal cell carcinoma in a German institution. *Eur J Dermatol*. 2011;21(5):705–9.
 47. Wehner MR, Shive ML, Chren M, Han J, Qureshi AA, Linos E. Indoor tanning and non-melanoma skin cancer : systematic review and meta-analysis. *BMJ*. 2012;345(October):31.
 48. Stern RS. The risk of squamous cell and basal cell cancer associated with psoralen and ultraviolet A therapy: A 30-year prospective study. *J Am Acad Dermatology [Internet]*. 2012;66(4):553–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2011.04.004>
 49. Robinson SN, Zens MS, Perry AE, Spencer SK, Duell EJ, Karagas MR. Photosensitizing Agents and the Risk of Non-Melanoma Skin Cancer: A Population-Based Case – Control Study. *J Invest Dermatol [Internet]*. 2013;133(8):1950–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.33>
 50. Jemec GBE, Holm E. Nonmelanoma Skin Cancer in Organ Transplant patients. *Transplantation*. 2003;75(3):253–7.
 51. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin Cancers after Organ Transplantation. *N Engl J Med*. 2003;348:1681–91.
 52. Silverberg MJ, Leyden W, Warton EM, Charles P, Jr Q, Engels EA, et al. HIV Infection Status , Immunodeficiency , and the Incidence of Non-Melanoma Skin Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2013;105(5):350–360.

53. Miller SJ, Alam M, Andersen J, Berg D, Bichakjian CK, Bowen G, et al. Basal Cell and Squamous Cell Skin Cancers. *J Natl Compr Canc Netw*. 2010;8(8):836–64.
54. Sexton M, Jones DB, Maloney ME. Histologic pattern analysis of basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 1989;23(6):1118–26. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0190-9622\(90\)70344-H](http://dx.doi.org/10.1016/0190-9622(90)70344-H)
55. Lallas A, Apalla Z, Argenziano G, Longo C, Moscarella E, Specchio F, et al. The dermatoscopic universe of basal cell carcinoma. 2014;4(3):11–24.
56. Scrivener Y, Grosshans E, Cribier B. Variations of basal cell carcinomas according to gender, age, location and histopathological subtype. *Br J Dermatol*. 2002;(147):41–7.
57. Lee EYHP, Muller WJ. *Oncogenes and Tumor Suppressor Genes*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010;2(10):a003236.
58. Epstein EH. Basal cell carcinomas: attack of the hedgehog. *Nat Rev Cancer*. 2008;8:743–754.
59. Ling G, Ahmadian A, Persson A, Unden AB, Gijs A, Williams C, et al. PATCHED and p53 gene alterations in sporadic and hereditary basal cell cancer. *Oncogene*. 2001;20:7770–8.
60. Nilsson P, Ponte F, Edlund K, Lundeberg J. Expression profiling of microdissected cell populations selected from basal cells in normal epidermis and basal cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2008;158(3):527–38.
61. Youssef KK, Keymeulen A Van, Lapouge G, Beck B, Michaux C, Achouri Y, et al. Identification of the cell lineage at the origin of basal cell carcinoma. *Nat Cell Biol* [Internet]. 2010;12(3):299–305. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncb2031>
62. Nüsslein-volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in drosophila. *Nature*. 1980;287(5785):795–801.
63. Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, et al. Mutations of the Human Homolog of *Drosophila* patched in the Nevoid

- Basal Cell Carcinoma Syndrome. *Cell*. 1996;85:841–51.
64. Gailani MR, Ståhle-Bäckdahl M, Leffell DJ, Glynn M, Zaphiropoulos PG, Pressman C, et al. The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet*. 1996;14:78–81.
 65. Unden AB, Holmberg E, Lundh-Rozell B, Ståhle-Bäckdahl M, Zaphiropoulos PG, Toftgård R, et al. Mutations in the human homologue of *Drosophila* patched (PTCH) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome: Different in vivo mechanisms of PTCH inactivation. *Cancer Res*. 1996;56(20):4562–5.
 66. Bale AE, Yu K. The hedgehog pathway and basal cell carcinomas. *Hum Mol Genet* [Internet]. 2001;10(7):757–62. Available from: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/10/7/757.full>
 67. Krauss S, Concordet JP, Ingham PW. A functionally conserved homolog of the *Drosophila* segment polarity gene *hh* is expressed in tissues with polarizing activity in zebrafish embryos. *Cell*. 1993;75(7):1431–44.
 68. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, et al. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 1993;75(7):1417–30.
 69. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog Signaling. *J Cell Sci*. 2007;120:3–6.
 70. Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 2001;15:3059–87.
 71. Yao HHC, Whoriskey W, Capel B. Desert Hedgehog/Patched 1 signaling specifies fetal Leydig cell fate in testis organogenesis. *Genes Dev*. 2002;16(11):1433–40.
 72. St-Jacques B, Hammerschmidt M, McMahon AP. Indian hedgehog signaling regulates proliferation and differentiation of chondrocytes and is essential for bone formation. *Genes Dev*. 1999;13(16):2072–86.
 73. Ruiz A, Sánchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(May):361–372.

74. Ruiz A, Palma V, Dahmane N. Hedgehog-Gli signalling and the growth of the brain. *Nat Rev Neurosci.* 2002;3(January):24–33.
75. Pathi S, Pagan-Westphal S, Baker DP, Garber EA, Rayhorn P, Bumcrot D, et al. Comparative biological responses to human Sonic, Indian, and Desert hedgehog. *Mech Dev.* 2001;106(1–2):107–17.
76. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 2008;(22):2454–72.
77. Fan H, Oro A, Scott M, Khavari P. Induction of basal cell carcinoma features in transgenic human skin expressing Sonic Hedgehog. *Nat Med.* 1997;3(7):788–92.
78. Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, et al. Medulloblastoma growth inhibition by Hedgehog pathway blockade. *Science (80-).* 2002;297:1559–61.
79. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature.* 2003;422(6929):313–7.
80. Yuan Z, Goetz JA, Singh S, Ogden SK, Petty WJ, Black CC, et al. Frequent requirement of hedgehog signaling in non-small cell lung carcinoma. *Oncogene.* 2007;26(7):1046–55.
81. Dierks C, Beigi R, Guo GR, Zirlik K, Stegert MR, Manley P, et al. Expansion of Bcr-Abl-Positive Leukemic Stem Cells Is Dependent on Hedgehog Pathway Activation. *Cancer Cell.* 2008;14(3):238–49.
82. Sanchez P, Hernández AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, et al. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A [Internet].* 2004;101(34):12561–6. Available from: <http://www.pnas.org/content/101/34/12561.short>
83. Thayer SP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, et al. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature.* 2003;425:851–6.

84. Mullor JL, Sánchez P, Ruiz i Altaba A. Pathways and consequences: Hedgehog signaling in human disease. *Trends Cell Biol.* 2002;12(12):562–9.
85. Daya-grosjean L, Couve S. Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas. 2005;225:181–92.
86. Lum L, Beachy PA. The Hedgehog Response Network: Sensors, Switches and Routers. *Science (80-)*. 2004;304:1755–9.
87. Jeffery A. Porter, Keith E. Young PAB. Cholesterol Modification of Hedgehog Signaling Proteins in Animal Development. *Science (80-)*. 1996;274(October):255–9.
88. Chamoun Z, Mann RK, Nellen D, Von Kessler DP, Bellotto M, Beachy PA, et al. Skinny Hedgehog, an acyltransferase required for palmitoylation and activity of the Hedgehog signal. *Science (80-)*. 2001;293(5537):2080–4.
89. Stamatakis D, Ulloa F, Tsoni S V., Mynett A, Briscoe J. A gradient of Gli activity mediates graded Sonic Hedgehog signaling in the neural tube. *Genes Dev.* 2005;19(5):626–41.
90. Chen Y, Struhl G. Dual roles for patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell.* 1996;87(3):553–63.
91. Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothed. *Nature.* 2002;418:892-897.
92. Stone DM, Murone M, Luoh S, Ye W, Armanini MP, Gurney A, et al. Characterization of the human suppressor of fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli. *J Cell Sci.* 1999;112:4437–48.
93. Cheng SY, Bishop JM. Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(8):5442–7.
94. Humke EW, Dorn K V., Milenkovic L, Scott MP, Rohatgi R. The output of Hedgehog signaling is controlled by the dynamic association between Suppressor of Fused and the Gli proteins. *Genes Dev.* 2010;24(7):670–82.

95. Altaba AR i. Catching a Gli-mpse of hedgehog. *Cell*. 1997;90(2):193–6.
96. Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H, Akimaru H, et al. Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling. *Development* [Internet]. 1999;126:3915–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10433919>
97. Matisse MP, Joyner AL. Gli genes in development and cancer. *Oncogene*. 1999;18(55):7852–9.
98. Kim J, Kato M, Beachy PA. Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of Smoothed in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2009;106(51):21666–71. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0912180106>
99. Nozawa YI, Lin C, Chuang PT. Hedgehog signaling from the primary cilium to the nucleus: An emerging picture of ciliary localization, trafficking and transduction. *Curr Opin Genet Dev*. 2013;23:429–37.
100. Goetz SC, Anderson K V. The primary cilium: A signalling centre during vertebrate development. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2010;11(5):331–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2774>
101. Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA. Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed. *Genes Dev*. 2002;16(410):2743–8.
102. Incardona JP, Gruenberg J, Roelink H. Sonic hedgehog induces the segregation of patched and smoothed in endosomes. *Curr Biol*. 2002;12(12):983–95.
103. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich L V, John W, Bonifas JM, et al. Human Homolog of patched, a Candidate Gene for the Basal Cell Nevus Syndrome. *Science* (80-). 1996;272:1668–71.
104. Gorlin R, Goltz R. Multiple nevoid basal-cell epithelioma, jaw cysts and bifid rib. A syndrome. *N Engl J Med*. 1960;May 5(262):908–12.
105. John AM, Schwartz RA. Basal cell naevus syndrome: An update on genetics and

- treatment. *Br J Dermatol*. 2016;174(1):68–76.
106. Wicking C, Shanley S, Smyth I, Gillies S, Negus K, Graham S, et al. Most germline mutations in the nevoid basal cell carcinoma syndrome lead to a premature termination of the PATCHED protein, and no genotype- phenotype correlations are evident. *AmJHumGenet*. 1997;60(1):21–6.
 107. Xie J, Murone M, Luoh S, Ryan A, Gu Q, Zhang C, et al. Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma. *Nature*. 1998;391(January):90–2.
 108. Liu S, Dontu G, Mantle ID, Patel S, Ahn NS, Jackson KW, et al. Hedgehog signaling and Bmi-1 regulate self-renewal of normal and malignant human mammary stem cells. *Cancer Res*. 2006;66(12):6063–71.
 109. Zhao C, Chen A, CH J, Fereshteh M, Abrahamsson A, Blum J, et al. Hedgehog signalling is essential for maintenance of cancer stem cells in myeloid leukaemia. *Nature* [Internet]. 2004;458(7239):776–779. Available from: http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=1Hqz7EXBS_gC&oi=fnd&pg=PA85&dq=Marine+turtle+status+and+conservation+in+the+Indian+Ocean&ots=Q2o_W5lj51&sig=mXglG80fXB8MkfGBhdyQLR6MonE
 110. Ikehata H, Ono T. The Mechanisms of UV Mutagenesis. *J Radiat Res* [Internet]. 2011;52(2):115–25. Available from: <https://academic.oup.com/jrr/article-lookup/doi/10.1269/jrr.10175>
 111. Jayaraman SS, Rayhan DJ, Hazany S, Kolodney MS. Mutational landscape of basal cell carcinomas by whole-exome sequencing. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2014;134(1):213–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.2013.276>
 112. Reifenberger J, Wolter M, Knobbe CB, K??hler B, Sch??nicke A, Scharw??chter C, et al. Somatic mutations in the PTCH, SMOH, SUFUH and TP53 genes in sporadic basal cell carcinomas. *Br J Dermatol*. 2005;152(1):43–51.
 113. Kim MY, Park HJ, Baek SC, Byun DG, Houh D. Mutations of the p53 and PTCH gene in basal cell carcinomas: UV mutation signature and strand bias. *J Dermatol Sci*. 2002;29(1):1–9.
 114. Pellegrini C, Maturo MG, Di Nardo L, Ciciarelli V, Gutiérrez García-Rodrigo C,

- Fargnoli MC. Understanding the molecular genetics of basal cell carcinoma. *Int J Mol Sci*. 2017;18(11).
115. Cooper MK, Porter JA, Young KE, Beachy PA. Teratogen-mediated inhibition of target tissue response to Shh signaling. *Science* (80-). 1998;280(5369):1603–7.
116. Incardona J, Gaffield W, Kapur R, Roelink H. The teratogenic Veratrum alkaloid cyclopamine inhibits Sonic hedgehog signal transduction. *Development* [Internet]. 1998;125:3553–62. Available from: <http://dev.biologists.org/content/develop/125/18/3553.full.pdf>
117. Hirotsu M, Setoguchi T, Sasaki H, Matsunoshita Y, Gao H, Nagao H, et al. Smoothed as a new therapeutic target for human osteosarcoma. *Mol Cancer*. 2010;9:1–14.
118. Mimeault M, Johansson SL, Henichart J-P, Depreux P, Batra SK. Cytotoxic Effects Induced by Docetaxel, Gefitinib, and Cyclopamine on Side Population and Nonside Population Cell Fractions from Human Invasive Prostate Cancer Cells. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2010;9(3):617–30. Available from: <http://mct.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1535-7163.MCT-09-1013>
119. Robarge KD, Brunton SA, Castanedo GM, Cui Y, Dina MS, Goldsmith R, et al. GDC-0449-A potent inhibitor of the hedgehog pathway. *Bioorganic Med Chem Lett* [Internet]. 2009;19(19):5576–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.08.049>
120. Sekulic A, Migden MR, Oro AE, Dirix L, Lewis KD, Hainsworth JD, et al. Efficacy and Safety of Vismodegib in Advanced Basal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* [Internet]. 2012;366(23):2171–9. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1113713>
121. Otsuka A, Levesque MP, Dummer R, Kabashima K. Hedgehog signaling in basal cell carcinoma. *J Dermatol Sci* [Internet]. 2015;78(2):95–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.02.007>
122. Sobanko JF, Okman J, Miller C. Vismodegib: A Hedgehog Pathway Inhibitor for Locally Advanced and Metastatic Basal Cell Carcinomas. *J Drugs Dermatol*. 2013;10:154–5.

123. Sekulic A, Migden MR, Lewis K, Hainsworth JD, Solomon JA, Yoo S, et al. Pivotal ERIVANCE basal cell carcinoma (BCC) study: 12-month update of efficacy and safety of vismodegib in advanced BCC. *J Am Acad Dermatol* [Internet]. 2015;72(6):1021-1026.e8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2015.03.021>
124. Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, et al. Treatment of Medulloblastoma with Hedgehog Pathway Inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med* [Internet]. 2009;361(12):1173–8. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0902903>
125. Yauch RL, Dijkgraaf GJP, Alicke B, Januario T, Christina P, Holcomb T, et al. Smoothed Mutation Confers Resistance to a Hedgehog Pathway Inhibitor in Medulloblastoma. *Science* (80-). 2009;326(5952):572–4.
126. Metcalfe C, De Sauvage FJ. Hedgehog fights back: Mechanisms of acquired resistance against smoothed antagonists. *Cancer Res*. 2011;71(15):5057–61.
127. Pan S, Wu X, Jiang J, Gao W, Wan Y, Cheng D, et al. Discovery of NVP-LDE225, a potent and selective smoothed antagonist. *ACS Med Chem Lett*. 2010;1(3):130–4.
128. Atwood SX, Whitson RJ, Oro AE. Advanced treatment for basal cell carcinomas. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(7):1–11.
129. Dreier J, Dummer R, Felderer L, Nægeli M, Gobbi S, Kunstfeld R. Emerging drugs and combination strategies for basal cell carcinoma. *Expert Opin Emerg Drugs* [Internet]. 2014;19(3):353–65. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1517/14728214.2014.914171>
130. Chen B, Trang V, Lee A, Williams NS, Wilson AN, Epstein EH, et al. Posaconazole, a second-generation triazole antifungal drug, inhibits the Hedgehog signaling pathway and progression of basal cell carcinoma. *Mol Cancer Ther* [Internet]. 2016;15(May):1535-7163.MCT-15-0729-T-. Available from: <http://mct.aacrjournals.org/content/early/2016/01/28/1535-7163.MCT-15-0729-T.abstract>
131. Yu M, Zloty D, Cowan B, Shapiro J, Haegert A, Bell RH, et al. Superficial,

- nodular, and morpheiform basal-cell carcinomas exhibit distinct gene expression profiles. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2008;128(7):1797–805. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.jid.5701243>
132. Howell BG, Solish N, Lu C, Watanabe H, Mamelak AJ, Freed I, et al. Microarray profiles of human basal cell carcinoma : Insights into tumor growth and behavior. *J Dermatol Sci*. 2005;39:39–51.
 133. O’Driscoll L, Mcmorrow J, Doolan P, Mckiernan E, Mehta JP, Ryan E, et al. Investigation of the molecular profile of basal cell carcinoma using whole genome microarrays. *Mol Cancer*. 2006;5:1–16.
 134. Gailani MR, Bale AE. Developmental Genes and Cancer: Role of Patched in Basal Cell Carcinoma of the Skin. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(15):1103–9.
 135. Grachtchouk V, Grachtchouk M, Lowe L, Johnson T, Wei L, Wang A, et al. The magnitude of hedgehog signaling activity defines skin tumor phenotype. *EMBO J*. 2003;22(11):2741–51.
 136. Undén AB, Zaphiropoulos PG, Bruce K, Toftgård R, Ståhle-Bäckdahl M. Human patched (PTCH) mRNA is overexpressed consistently in tumor cells of both familial and sporadic basal cell carcinoma. *Cancer Res*. 1997;57(12):2336–40.
 137. Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, et al. Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet*. 1996;14:357–360.
 138. Gomez-Ospina N, Chang ALS, Qu K, Oro AE. Translocation Affecting Sonic Hedgehog Genes in Basal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med*. 2012;June 7(366):23.
 139. Oro AE, Higgins KM, Hu Z, Bonifas JM, Jr EHE, Scott MP. Basal Cell Carcinomas in Mice Overexpressing Sonic Hedgehog. *Science* (80-). 1997;May 2(276(5313)):817–21.
 140. Wicking C, Evans T, Henk B, Hayward N, Simms LA, Chenevix-trench G, et al. No evidence for the H133Y mutation in SONIC HEDGEHOG in a collection of common tumour types. *Oncogene*. 1998;16:1091–3.
 141. Reifenberger J, Wolter M, Weber RG, Megahed M, Ruzicka T, Lichter P, et al.

- Missense Mutations in SMOH in Sporadic Basal Cell Carcinomas of the Skin and Primitive Neuroectodermal Tumors of the Central Nervous System¹. *Cancer Res.* 1998;May 1(58(9)):1798–803.
142. Urman NM, Mirza A, Atwood SX, Whitson RJ, Sarin KY, Tang JY, et al. Tumor-derived suppressor of fused mutations reveal hedgehog pathway interactions. *PLoS One.* 2016;11(12):1–10.
 143. Rubin LL, Sauvage FJ De. Targeting the Hedgehog pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:1026–33.
 144. Dean M. Towards a unified model of tumor suppression: lessons learned from the human patched gene. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1332(2):43–52.
 145. Chuang P, McMahon AP. Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein. *Nature.* 1999;397(6720):617–21.
 146. Cadavid AMH, Kaminagakura E, Rodrigues MFSD, Pinto CAL, Teshima THN. Immunohistochemical evaluation of Sonic Hedgehog signaling pathway and syndromic odontogenic keratocysts. *Clin Oral Investig.* 2019;23(1):153–9.
 147. Niazi ZBM, Lamberty BGH. Perineural infiltration in basal cell carcinomas. *Br J Plast Surg.* 1993;46(2):156–7.
 148. Gore SM, Kasper M, Williams T, Regl G, Aberger F, Cerio R, et al. Neuronal differentiation in basal cell carcinoma: possible relationship to Hedgehog pathway activation? *J Pathol.* 2009;April(219):61–8.
 149. Lesiak A, Sobolewska-Sztychny D, Danilewicz M, Rogowski-Tylman M, Sysa-Jedrzejowska A, Sobjanek M, et al. Sonic hedgehog pathway dysregulation in skin basal-cell carcinoma of a polish population. *Folia Histochem Cytobiol.* 2013;51(3):219–24.
 150. Brinkhuizen T, Hurk K van den, Winnepeninckx VJL, Hoon JP De, Marion M Van, Engeland M Van, et al. Epigenetic Changes in Basal Cell Carcinoma Affect SHH and WNT Signaling Components. *PLoS One.* 2012;7(12):e51710.
 151. Tojo M, Kiyosawa H, Iwatsuki K, Kaneko F. Expression of a sonic hedgehog signal transducer, hedgehog-interacting protein, by human basal cell carcinoma.

Br J Dermatol. 2002;146:69–73.

152. Eberl M, Klingler S, Mangelberger D, Loipetzberger A, Damhofer H, Zoidl K, et al. Hedgehog-EGFR cooperation response genes determine the oncogenic phenotype of basal cell carcinoma and tumour-initiating pancreatic cancer cells. EMBO Mol Med. 2012;4(3):218–33.