MARINA GABRIELA TEIXEIRA

**Expressão de ALDH-1 e CD44 em lesões epiteliais displásicas e no
carcinoma epidermóide intra-oral**

São Paulo

2014

MARINA GABRIELA TEIXEIRA

**Expressão de ALDH-1 e CD44 em lesões epiteliais displásicas e no
carcinoma epidermóide intra-oral**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo,
para obter o título de Mestre pelo Programa
de Pós-Graduação em Odontologia

Área de Concentração: Patologia e
Estomatologia Básica e Aplicada

Orientador: Profa. Dra. Andrea Mantesso
Pobocik

São Paulo

2014

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

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

Teixeira, Marina Gabriela.

Expressão de ALDH-1 e CD44 em lesões epiteliais displásicas e no carcinoma epidermóide intra-oral / Marina Gabriela Teixeira; orientador Andrea Mantesso Pobocik. -- São Paulo, 2014.

87 p. : fig., tab., 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Odontodisplasia. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Neoplasias bucais. I. Pobocik, Andrea Mantesso. II. Título.

Dedico esta dissertação de mestrado a minha mãe, Sebastiana Aparecida Teixeira pelo seu amor e apoio incondicional durante toda a minha vida e formação acadêmica. Seu amor e seu apoio em todos os momentos bons e ruins foram essenciais para que hoje eu me torne mestre. Espero te orgulhar por toda a minha vida o quanto você sempre me orgulha.

Te amo, obrigado por ser a minha eterna mamuska.

" De Janeiro a Janeiro, até o mundo acabar "

Teixeira MG. Expressão de ALDH-1 e CD44 em lesões epiteliais displásicas e no carcinoma epidermóide intra-oral. Tese apresentada a Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovada em: 12 / 11 / 2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora de Fátima por permitirem que eu viva e esteja caminhando pela vida com tantas bênçãos.

Ao meu tio e pai Antônio Claret Teixeira (*in memoriam*), por seu amor e apoio em todos os momentos e por sempre estar ao meu lado. Tio, passar por esses últimos meses sem você fisicamente ao meu lado foram os piores momentos nesses 26 anos de vida, mas eu sou muito grata por ter você em minha vida, te amo eternamente, descanse em paz Pai.

A minha tia Maria do Carmo Teixeira (*in memoriam*), por seu amor suas orações e seu exemplo de vida, tenha a certeza que você sempre será um exemplo para mim, te amarei eternamente.

A minha tia e segunda mãe Heloiza de Souza Teixeira por sempre me apoiar em todas minhas decisões e se preocupar sempre com meu bem estar, tia te amo e obrigado por tudo.

Ao Daniel Buck que fez esse final de mestrado ficar mais leve e mais fácil de ser enfrentado, amor você entrou na minha vida para iluminar meus caminhos, meu coração e minha cabeça, te amo.

A minha orientadora, Profa. Dra. Andrea Mantesso por me orientar e me mostrar como o mundo das pesquisas em células-tronco é incrível, professora muito obrigado por tudo durante esses dois anos de mestrado, pela sua paciência, dedicação e compreensão em todos os momentos.

Aos professores da disciplina de Patologia Geral e Bucal da FOUSP pelo aprendizado, momentos vividos juntos e pelo carinho que sempre recebi de todos.

Aos meus amigos e amigas de São José dos Campos que estão comigo nessa caminhada a muitos anos e sempre me apoiaram.

Aos amigos e amigas da Pós-Graduação da FOU SP, obrigado por vocês sempre me tratarem tão bem e alegrarem meus dias, sem vocês seria impossível passar esses dois anos tão bem, ter vocês para dividir os problemas, as alegrias de resultados positivos e o terror dos prazos fez tudo ficar mais leve e melhor, torço pelo sucesso de todos de coração.

As minhas amigas e companheiras de equipe Cibele Pelissari, Karla Rezende e Lourdes Chiok, meninas vocês são pessoas iluminadas, obrigado por toda a ajuda, conselhos e momentos de risadas, desejo de todo coração uma vida de muito sucesso a todas.

As amigas Ana Maria Hoyos, Daniella Antunes, Fernanda Pigatti, Flávia Cristina Rosin e Gabriela Nagata, meninas com vocês tudo fica mais leve de se enfrentar, obrigado pelo apoio e amizade, contem sempre comigo.

Obrigada aos funcionários do Departamento de Patologia Bucal: Zilda, Néia, Elisa, Adriana e Juvani pela ajuda e pelos momentos de risadas que deixaram os dias de trabalho mais leves.

"É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso, temos que nos preocupar em fazer a nossa parte da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser."

Chico Xavier

RESUMO

Teixeira MG. Expressão de ALDH-1 e CD44 em lesões epiteliais displásicas e no carcinoma epidermóide intra-oral [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

O estudo das células-tronco cancerígenas (CTCs) durante o processo de malignização e no carcinoma epidermóide intra-bucal já instalado é essencial para um melhor entendimento de como essas células participam da formação e manutenção de uma neoplasia. Atualmente, a identificação de células com características de células tronco se dá principalmente através da expressão de marcadores celulares como o ALDH1 e o CD44. A proteína ALDH1 é responsável pela oxidação de aldeídos intracelulares e vem sendo utilizada para o isolamento de CTCs em inúmeros cânceres incluindo casos de cabeça e pescoço. A proteína CD44 é uma glicoproteína envolvida na adesão e migração celular, também participa do processo de metástase e já foi associada às CTCs. Nesse trabalho, a expressão dessas proteínas foi analisada em 45 casos de displasias epiteliais e 13 casos de carcinomas epidermóide intra-bucais. As lesões displásicas foram classificadas em casos leves (19), moderados (18) e intensos (8) e foram também divididas em casos de baixo risco (22) e alto risco de transformação maligna (23). A expressão imunohistoquímica para a ALDH1 foi encontrada predominantemente na camada basal em 16 casos de displasias epiteliais e em 7 carcinomas epidermóides, com a marcação difusa pela epitélio neoplásico. A expressão imunohistoquímica de CD44 foi encontrada em 42 displasias epiteliais e em 12 carcinomas epidermóides, sendo que nas displasias, a expressão ocorreu predominantemente na camada basal do epitélio e no carcinoma epidermóide a expressão foi disseminada. Ambos marcadores exibiram aumento de expressão com a evolução do grau das displasias.

Palavras-chave: Displasia epitelial. Carcinoma epidermóide intra-oral. Célula-tronco cancerígena. ALDH1. CD44.

ABSTRACT

Teixeira MG. Expression of ALDH-1 and CD44 in dysplastic epithelial lesions and intra-oral squamous cell carcinoma [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

The study of cancer stem cells (CTCs) in the process of malignant transformation and intra-oral squamous cell carcinoma already installed is essential for a better understanding of how these cells participate in the formation and maintenance of a neoplasm. Currently, identification of cells with characteristics of stem cells is primarily through the expression of cell markers such as CD44 and ALDH1. The ALDH1 protein is responsible for the oxidation of intracellular aldehydes and has been used for the isolation of CTCs in numerous cancers including head and neck cases. The CD44 protein is a glycoprotein involved in cell adhesion and migration, also participates in the process of metastasis and has been associated with CTCs. In this work, the expression of these proteins was analyzed in 45 cases of epithelial dysplasia and 13 cases of intraoral squamous cell carcinomas. The dysplastic lesions were classified as mild (19), moderate (18) and intense (8) cases and were also divided into low-risk cases (22) and high risk of malignant transformation (23). The immunohistochemical expression for ALDH1 was found predominantly in the basal layer in 16 cases of epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma in 7, with diffuse labeling by neoplastic epithelium. Immunohistochemical expression of CD44 was found in 42 epithelial dysplasias and 12 squamous cell carcinomas, and in dysplasias, the expression occurred predominantly in the basal layer of the epithelium and in squamous cell carcinoma expression was widespread. Both markers showed increased expression with the evolution of the degree of dysplasia.

Keywords: Oral dysplasia. Oral squamous cell carcinoma. Cancer Stem Cells.
ALDH1. CD44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - Processo de malignização de uma lesão bucal. Adaptado de Greer, 2006.....27
- Figura 2.2 - O processo da carcinogênese oral. Adaptado de Scalón, Van Tubergen et al. 2013.....30
- Figura 2.3 - Esquema do modelo aleatório e do modelo de células-tronco cancerígenas. Adaptado de Dick, E. J. 2008.....34
- Figura 2.4 - Esquema da divisão simétrica e assimétrica das células-tronco.....37
- Figura 5.1 - Cortes corados por Hematoxilina e Eosina exibindo displasia epitelial. Figura A: displasia epitelial leve (caso nº01); figura B: displasia epitelial moderada (caso nº20); figura C: displasia epitelial intensa (caso nº03); figura D: displasia epitelial de baixo risco (caso nº 29); figura E: displasia epitelial de alto risco (caso nº43)53
- Figura 5.2 - Expressão imunohistoquímica de ALDH-1 em lesões potencialmente malignas,. Figura A: Leucoplasia com displasia epitelial leve (caso nº18); figura B: Eritroplasia com displasia epitelial moderada (caso nº20); figura C: Leucoplasia com displasia epitelial intensa (caso nº14). Figura D: Leucoplasia com displasia epitelial de baixo risco (caso nº18); figura E: Leucoplasia com displasia epitelial de alto risco (caso nº44).....59
- Figura 5.3 - Expressão imunohistoquímica de ALDH-1 em carcinomas epidermóides intra-orais. Figura A (caso nº08); figura B (caso nº12) mostrando o padrão de marcação no epitélio, seta preta indicando células positivamente marcadas em torno da pérola córnea; figura C (caso nº09) exemplificando a marcação positiva de células mais periféricas dos ninhos epiteliais.....60
- Figura 5.4 - Expressão imunohistoquímica de CD44 em lesões potencialmente malignas,. Figura A: Leucoplasia com displasia epitelial leve (caso nº32); figura B: Eritroplasia com displasia epitelial moderada (caso nº20); figura C: Leucoplasia com displasia epitelial intensa (caso nº15). Figura D: Leucoplasia com displasia epitelial de baixo risco (caso nº19);

figura E: Leucoplasia com displasia epitelial de alto risco (caso nº14).....61

Figura 5.5 - Expressão imunohistoquímica da CD44 em casos de displasia epitelial, figura A (caso nº32): displasia epitelial de baixo risco/leve e figura B (caso nº37): displasia epitelial de alto risco/moderada. Setas indicam áreas da base das células que não apresentam positividade para o anticorpo CD44.62

Figura 5.6 - Expressão imunohistoquímica da CD44 em carcinomas epidermóides intra-orais. Figura A e B (casos nº02 e nº13 respectivamente) exemplificando a marcação observada em todas as camadas do epitélio; figura C (caso nº03) mostrando marcação do epitélio e das pérolas córneas (seta preta); figura D (caso nº09) exemplificando a marcação epitelial em ninhos de células neoplásicas (seta preta)63

Figura 5.7 - Expressão imunohistoquímica da CD44 em casos de carcinoma epidermóide intra-oral, figura A (caso nº12) e figura B (caso nº13). Setas indicam áreas da base das células que não apresentam positividade para o anticorpo CD44.....64

LISTA DE QUADROS

Quadro 2.1 - Características arquiteturais e citológicas para o diagnóstico da displasia epitelial oral.....	26
Quadro 2.2 - Critérios preconizados pela OMS para a classificação do grau da displasia epitelial oral.....	26
Quadro 2.3 - Critérios definidos por Kujan et.al.2006 para a classificação do grau da displasia oral segundo o sistema binário	27
Quadro 2.4 - Critérios para a classificação histopatológica proposta por Broders et.al.1920	31
Quadro 2.5 - Critérios para a classificação histopatológica proposta pela OMS 2005.	32
Quadro 4.1 - Anticorpos utilizados para a técnica de imunohistoquímica.....	48

LISTA DE TABELAS

- Tabela 5.1 - Descrição dos dados dos casos de leucoplasia, eritroplasia e leucoeritroplasia com displasias epiteliais, utilizados no estudo. Sendo M- gênero masculino, F- gênero feminino, T- tabagista, E- etilista , N/E- não especificado e N/U- não usuário50
- Tabela 5.2 - Descrição dos dados dos carcinomas epidermóides intra-orais, utilizados no estudo. Sendo M- gênero masculino, F- gênero feminino, T- tabagista, E- etilista , N/E- não especificado e N/U- não usuário52
- Tabela 5.3 - Expressão de ALDH-1 e CD44 em lesões potencialmente malignas.....54
- Tabela 5.4 - Expressão de ALDH-1 e CD44 em carcinomas epidermóides intra-orais.....57

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	Albumina de soro bovino
PBS	Tampão Fosfato Salino
DAB	Diaminobenzidina
LSAB	Complexo estreptavidina –biotina-peroxidase
CEC	Carcinoma epidermoide
CT	Célula-tronco
CTC	Célula-tronco cancerígena
ALDH	Aldeido deidrogenase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
μM	Micrômetros
$^{\circ}\text{C}$	Graus centígrados
pH	Potencial hidrogeniônico
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 Lesões potencialmente malignas.....	21
2.2 Displasia oral – Aspectos histopatológicos e classificações.....	25
2.3 Carcinoma epidermóide	28
2.4 Carcinogênese – o papel da Célula-Tronco Cancerígena (CTC).....	33
2.5 Nichos de células-tronco.....	39
2.6 Marcadores de células-tronco epiteliais – ALDH-1 e CD44.....	40
2.6.1 ALDH-1 e CD44 em lesões potencialmente malignas.....	43
3 PROPOSIÇÃO.....	45
3.1 Proposições específicas.....	45
4 MATERIAL E MÉTODO.....	46
4.1 Seleção de casos.....	46
4.2 Graduação dos casos selecionados.....	46
4.3 Análise morfológica.....	47
4.4 Reação de imunohistoquímica.....	47
4.5 Análise dos resultados.....	48
5 RESULTADOS.....	49
5.1 Caracterização dos casos analisados.....	49
5.2 Classificação do grau de displasias	52
5.3 Análise Imunohistoquímica.....	53

5.3.1 ALDH-1.....	57
5.3.2 CD44.....	59
6 DISCUSSÃO.....	65
7 CONCLUSÕES.....	72
REFERÊNCIAS.....	73
ANEXOS.....	86

1 INTRODUÇÃO

Lesões potencialmente malignas são lesões que apresentam maior probabilidade de progredirem para o câncer (1). Dentro dessa categoria pode-se destacar a leucoplasia que é definida como lesão branca predominante da mucosa oral e que não pode ser caracterizada clínica ou histopatologicamente como nenhuma outra doença (2).

A leucoplasia corresponde a cerca de 80% das lesões potencialmente malignas, porém, não há na literatura científica pertinente um consenso em relação à porcentagem de casos que sofrem malignização e dão origem ao carcinoma epidermoide (3, 4).

Outra lesão também considerada potencialmente maligna é a eritroplasia. Por definição da OMS, trata-se de placa vermelha que também não pode ser diagnosticada clínica ou histopatologicamente como qualquer outra condição (1). A eritroplasia é considerada uma lesão rara, porém, com taxa de malignização alta (5).

As lesões potencialmente malignas podem levar à formação do carcinoma epidermoide intra-oral, e este é um processo complexo que ocorre quando o epitélio é afetado por alterações genéticas sucessivas que culminam na eventualmente destruição da membrana basal e invasão de células alteradas geneticamente (6, 7). Esse processo é refletido histopatologicamente pela displasia epitelial, e sua correta classificação é útil no reconhecimento, tratamento e acompanhamento das lesões potencialmente malignas (8).

O carcinoma epidermoide de boca é um problema de saúde pública importante no Brasil. Em 2014, a estimativa de novos casos de câncer de cavidade oral é de 11.280 casos em homens e 4.010 em mulheres. Um risco estimado de 11,54 novos casos a cada 100 mil homens e 3,92 novos casos a cada 100 mil mulheres (9). Fica claro, portanto, que o entendimento do processo de malignização que pode eventualmente resulta no diagnóstico precoce ou melhora nas terapias, é de suma importância (9).

A metástase é apontada como a principal causa de mortalidade no câncer de boca, sendo que fatores como o microambiente do tumor, a interação de células

vizinhas e as quimiocinas são alguns fatores que influenciam na habilidade do câncer em se espalhar nos tecidos (10).

Nesse sentido, recentemente foi descrita uma sub-população de células que apresentam um papel crítico no desenvolvimento do câncer. Essas células são conhecidas como células-tronco cancerígenas (CTCs) e por definição, representam um subconjunto de células iniciadoras do tumor que também constituem uma reserva de auto-sustentação para o mesmo (11).

Primeiramente foi criada uma teoria na qual acreditava-se que toda célula do câncer tinha a mesma propensão de iniciar, propagar tumores e gerar metástases. Assim, portanto, não haveria seletividade entre as células dos tecidos, sendo a heterogeneidade nos tumores explicada devido a mudanças espontâneas no fenótipo celular. No entanto, estudos recentes sugerem a hipótese das células-tronco cancerígenas, que defende a teoria de que o tecido tumoral apresenta hierarquia celular distinta e que apenas uma sub-população de células do tumor é capaz de iniciar o câncer (12-14).

Existem duas formas de CTCs que participam da progressão tumoral. As CTCs estacionárias, que são incorporadas ao epitélio, não disseminam, mas são capazes de formar os tumores primários e as CTCs migratórias, que são localizadas na interface do tumor e mediam a metástase (15, 16).

As CTCs são mais resistentes a terapias, incluindo a quimioterapia e a radioterapia. Com essas características, as CTCs são consideradas responsáveis por falhas em tratamentos e pelas recorrências tumorais. Ademais, os tratamentos além de serem falhos, ainda podem levar a mutações genéticas e a expansão dessas células, resultando em resistência adquirida. Por isso, caracterizar o papel das CTCs e identificar as vias moleculares que mantêm essas células são pontos importantes para melhoria do tratamento do câncer (17).

Pela capacidade de iniciar o câncer, as CTCs tem um papel fundamental nas lesões potencialmente malignas de cabeça e pescoço, mas, estudos identificando CTCs nestas lesões, são ainda incipientes. Para essa identificação atualmente são usados biomarcadores que atuam na sinalização das CTCs (11) como a ALDH-1 e a CD44.

A aldeído deidrogenase (ALDH) é uma enzima intra-celular localizada no citoplasma, mitocôndria ou núcleo, e que está envolvida na diferenciação, desintoxicação e resistência a drogas. A ALDH-1 é requerida na conversão do

retinol para ácido retinóico e apresenta alta expressão nas células-tronco hematopoiéticas e nas células progenitoras hematopoiéticas humanas (12).

A proteína CD44 é uma glicoproteína transmembranica que desempenha papel na adesão, migração, invasão e sobrevivência celular. Estudos mostram que a expressão da CD44 pode identificar uma sub-população que apresenta características de células-tronco no câncer de cabeça e pescoço (12, 18).

Tendo em vista o acima descrito, este trabalho visa identificar células que expressam marcadores previamente associados a células-tronco cancerígenas durante o processo de malignização em lesões potencialmente malignas e no carcinoma epidermóide intra-oral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Lesões potencialmente malignas

Lesões potencialmente malignas são definidas como lesões que tem maior probabilidade de progredir para o câncer, pois seu tecido epitelial pode apresentar alterações morfológicas displásicas, o que eventualmente resulta na maior probabilidade de transformação maligna (1). Dentro do grupo das lesões potencialmente malignas, pode-se destacar a leucoplasia e a eritroplasia.

O termo leucoplasia é definido como uma lesão branca predominante na mucosa oral e que não pode ser caracterizada como nenhum outro tipo de lesão (4, 19-22). Como na maior parte das lesões brancas, a cor clínica da leucoplasia resulta da camada de queratina superficial espessada que pode estar associada a camada espinhosa espessada, o que mascara a vascularidade normal (23).

Estudos mostram que de 4% a 6% das lesões leucoplásicas dão origem ao carcinoma epidermóide (24). Entretanto, outros autores citam valores diferentes de malignização das lesões leucoplásicas, como entre 1% (25), 17% a 35% (13, 22), 0.13% a 17.50% (4). De qualquer forma, 80% das lesões orais potencialmente malignas correspondem a leucoplasia e essas ocorrem mais freqüentemente na mucosa bucal, borda lateral e ventre da língua, assoalho da boca, mucosa gengival e palato mole (4, 20, 22, 24).

O diagnóstico de leucoplasia depende da exclusão de outras lesões que se apresentam como placas brancas na boca. Tais lesões devem ser descartadas antes que um diagnóstico clínico de leucoplasia seja feito (23, 25). Embora a leucoplasia seja considerada uma lesão potencialmente maligna, o uso do termo clínico não sugere que os aspectos histopatológicos de displasia epitelial estejam presentes em todas as lesões. Sendo assim, a natureza potencialmente maligna da leucoplasia é definida pelos resultados de investigações clínicas que acompanham numerosas lesões leucoplásicas por longos períodos de tempo e verificam o desenvolvimento de carcinomas em algumas delas (23).

A graduação histológica de displasia epitelial é o indicador mais importante para determinar o risco da transformação das leucoplasias. Todavia, somente a

classificação histológica é insuficiente, sendo necessária a determinação de marcadores específicos para identificar as lesões com alto risco de malignização (13).

Logo, leucoplasia é um termo clínico e a presença ou ausência de células displásicas não altera o diagnóstico. Nesse sentido, a Organização Mundial da Saúde (OMS) sugeriu que o termo leucoplasia deve ser redefinido para se tornar um termo clínico/histológico combinado. Com essa terminologia o termo leucoplasia não seria usado sem a qualificação histopatológica de “com displasia” ou “sem displasia” (20).

A leucoplasia ocorre predominantemente no sexo masculino em indivíduos com mais de 40 anos, exceto em algumas regiões onde o sexo feminino apresenta consumo de produtos a base de tabaco maior que o sexo masculino (4, 24).

A causa da leucoplasia ainda é desconhecida por completo, mas existem hipóteses de que alguns agentes sejam os responsáveis pela doença. Nesse sentido, o tabaco desempenha o papel principal, já que 80% dos pacientes com leucoplasia são fumantes (4, 24, 26). O tabagismo aumenta a incidência de leucoplasias em 6 vezes, sendo que pacientes com hábito de fumar em excesso apresentam também lesões maiores e em número aumentado (4).

O álcool apesar de apresentar efeito sinérgico com o tabaco em relação à produção do câncer bucal não tem sido associado a leucoplasias já que pessoas que consomem álcool em excesso apresentam uma placa acinzentada que não é displásica e não é considerada leucoplasia (23, 27-29).

As lesões leucoplásicas podem ter uma aparência clínica variada e tendem a mudar com o tempo. Assim, elas podem ser definidas como, leucoplasia delgada ou branda, que raramente mostra displasia na biópsia e podem desaparecer ou permanecer imutável. Caso o paciente seja tabagista e não diminua o hábito de fumar, essa lesão pode se estender para os lados e tornar-se mais espessa, adquirindo uma aparência mais esbranquiçada e tornando-se mais áspera à palpação. Nesse estágio a lesão é denominada de leucoplasia homogênea (22, 23). Algumas lesões progridem e se tornam mais graves, desenvolvendo irregularidades superficiais. Essas lesões são as leucoplasias nodulares ou granulares. Algumas lesões podem ainda apresentar projeções, sendo assim denominadas leucoplasias verruciformes ou verrucosas (4, 23).

É importante salientar que as leucoplasias verrucosas proliferativas (LVP) são um tipo de lesão leucoplásica de alto risco e ocorrem com mais frequência em indivíduos do sexo feminino (22). Entretanto Meiller et al (24) relata que em seu estudo a frequência entre os sexos é a mesma. Seu crescimento é persistente e elas podem passar para um estágio no qual não é possível distinguir as mesmas dos carcinomas verrucosos, que posteriormente, se transformam em carcinomas epidermóides (23).

A leucoplasia pode tornar-se displásica e até invasiva sem apresentar nenhuma modificação em sua aparência clínica, mas algumas lesões podem apresentar concomitantemente áreas vermelhas, também denominadas de eritroplásicas. Essas áreas normalmente apresentam locais atróficos onde as células epiteliais se encontram imaturas ao ponto de não produzirem queratina (2, 23). As lesões que misturam áreas brancas e vermelhas são chamadas de eritroleucoplasias ou leucoplasias salpicadas e constituem um padrão de leucoplasia que frequentemente revela a presença de displasia avançada nos exames de biópsia. A localização, duração e aparência clínica são fatores importantes no potencial de malignização dessas lesões, que são mais preocupantes do que lesões puramente leucoplásicas, principalmente em áreas laterais e ventrais de língua e assoalho de boca (4, 22).

Histopatologicamente a leucoplasia é caracterizada por uma camada de queratina mais espessa no epitélio superficial com ou sem camada espinhosa mais espessa. Algumas leucoplasias apresentam hiperqueratose superficial, mas mostram atrofia ou adelgamento do epitélio subjacente. Geralmente é possível perceber também a presença de infiltrado inflamatório crônico no tecido conjuntivo (1, 23). A maioria das lesões leucoplásicas não apresenta displasia nas biópsias, sendo encontrada evidência de displasia epitelial em apenas 5 a 25% dos casos. Quando presente, a displasia epitelial se inicia nas regiões basais e parabasais do epitélio (1, 23).

Do ponto de vista histológico, a LVP apresenta projeções superficiais papilares de espessura variável de queratina, e cristas epiteliais largas e embotadas. Esses aspectos dependem do estágio da lesão. Inicialmente ela parece com uma hiperqueratose benigna e não pode ser distinguida de outras lesões leucoplásicas simples. Com o tempo a condição progride para uma proliferação exofítica. Em estágios avançados, a proliferação papilar exibe um crescimento descendente de

epitélio escamoso bem diferenciado, com cristas largas, sendo que este epitélio apresenta invasão para a lâmina própria subjacente e consequentemente nos últimos estágios, o epitélio invasor fica menos diferenciado, transformando-se um carcinoma epidermóide convencional (4, 24).

Em relação a tratamentos e o prognóstico, as leucoplasias que não apresentam displasia dificilmente são removidas, sendo recomendada a avaliação clínica a cada seis meses. No caso de lesões com áreas displásicas moderadas ou intensas, é indicada a completa remoção da lesão quando possível. Esses procedimentos devem ser guiados pelo tamanho da lesão e pela resposta a medidas como o abandono de vícios, como o fumo (23). Se a remoção completa for necessária, ela pode ser feita por excisão cirúrgica, eletrocauterização, criocirurgia ou ablação a laser. O acompanhamento por longo período após a remoção da lesão é sempre de extrema importância, já que a recorrência é frequente (23, 24, 26).

A eritroplasia é definida pela OMS como uma placa vermelha, e assim como na leucoplasia, seu diagnóstico é realizado quando a lesão não pode ser diagnosticada clínica ou histopatologicamente como qualquer outra condição (4, 21, 30, 31).

A eritroplasia é predominantemente uma doença de homens entre os 65-74 anos de idade, sendo o assoalho da boca, língua, mucosa bucal e o palato mole, os locais mais comuns de envolvimento. A mucosa alterada apresenta-se como uma placa eritematosa bem demarcada, com textura macia e aveludada. Essa condição é normalmente assintomática, e como já citado acima, pode estar associada a uma área leucoplásica (1, 4, 23, 30).

A eritroplasia oral é uma lesão rara, mas sua taxa de transformação maligna é considerada a mais elevada entre todas as lesões potencialmente cancerígenas da mucosa bucal (5, 32), já que em aproximadamente 90% dos casos já existe displasia epitelial, carcinoma *in situ* ou carcinoma invasivo (3, 31, 33, 34).

De acordo com recentes estudos, cerca de 9% de lesões eritroplásicas apresentam somente displasia epitelial, enquanto 40% já apresentam áreas de carcinomas *in situ* e 51% já apresentam invasão do tecido conjuntivo na forma de carcinoma epidermóide. Antes da transformação maligna, nas lesões eritroplásicas, o epitélio mostra ausência de produção de queratina, frequentemente é atrófico,

mas pode apresentar também, áreas hiperplásicas e frequentemente há inflamação crônica no tecido conjuntivo subjacente (4, 23, 30).

Poucas informações sobre os eventos moleculares envolvidos na formação da eritroplasia estão disponíveis até o momento. Qin et al. (36) sugeriram que a mutação do p53 está relacionada ao desenvolvimento da eritroplasia com diferentes graus de displasia. Nesse estudo os autores encontraram essa mutação em 24 pacientes que apresentavam eritroplasia com diferentes graus de displasia epitelial (35, 36).

O tratamento da eritroplasia é guiado pelo diagnóstico obtido pela biópsia e as lesões que apresentam displasia moderada ou severa devem ser removidas pelos mesmos métodos usados para o carcinoma *in situ*. O acompanhamento a longo prazo é indicado para todos os pacientes tratados (23, 31).

2.2 Displasia oral – Aspectos histopatológicos e classificações

Tanto para as leucoplasias quanto para as displasias, as alterações histopatológicas das células epiteliais displásicas são semelhantes àsquelas do carcinoma epidermóide e incluem: núcleos e células aumentados, nucléolos grandes e proeminentes, aumento da razão núcleo/citoplasma, núcleos hipercromáticos, núcleos e células pleomórficos, disqueratose, aumento da atividade mitótica e figuras mitóticas anormais (1, 23).

Alguns pesquisadores preconizam o uso dos critérios definidos pela OMS para o diagnóstico de displasia epitelial, sendo esses critérios baseados em alterações arquiteturais e citológicas no epitélio (Quadro 2.1). A OMS divide a lesão displásica em 3 graus: leve, moderado e intenso (Quadro 2.2), sendo que há uma maior probabilidade de transformação maligna da displasia epitelial oral com o aumento do grau (27, 37, 38).

Outro tipo de graduação histológica de displasias orais é conhecido como graduação binária e foi elaborado por Kujan et al. (8). No sistema binário, em displasias de baixo risco, são observadas menos que quatro alterações arquiteturais ou menos que cinco alterações citológicas e em displasias de alto risco, são observadas ao mínimo quatro alterações arquiteturais e cinco alterações citológicas (Quadro 2.3) (8, 39). As alterações arquiteturais e citológicas utilizadas

no sistema binário são as mesmas descritas pela OMS em 2005 e especificadas no Quadro 2.1.

Alterações Arquiteturais	Alterações citológicas
<ul style="list-style-type: none"> • Estratificação epitelial irregular • Perda da polaridade da camada basal • Hiperplasia da camada basal • Projeção em forma de gota • Aumento do numero de mitoses típicas • Mitoses típicas superficiais • Queratinização prematura • Pérolas de queratina nas projeções epiteliais 	<ul style="list-style-type: none"> • Variação anormal do tamanho do núcleo • Variação anormal na forma do núcleo • Variação anormal no tamanho da célula • Variação anormal na forma da célula • Aumento da relação núcleo-citoplasma • Aumento do tamanho nuclear • Figuras de mitoses atípicas • Aumento do número e tamanho dos nucléolos • Hiperchromatismo nuclear

Quadro 2.1 - Características arquiteturais e citológicas para o diagnóstico da displasia epitelial oral

Grau da Displasia Epitelial Oral	Critérios
Leve	Distúrbios arquiteturais limitados ao terço inferior do epitélio acompanhado por mínima atipia citológica.
Moderada	Distúrbios arquiteturais se estendendo até o terço médio do epitélio acompanhado por atipia citológica.
Intensa	Distúrbios arquiteturais se estendendo por mais de dois terços do epitélio acompanhado por atipia citológica.

Quadro 2.2 - Critérios preconizados pela OMS para a classificação do grau da displasia epitelial oral

Grau da displasia	Critérios
Baixo risco	1 a 3 mudanças arquiteturais 1 a 4 mudanças citológicas
Alto risco	Mínimo de 4 mudanças arquiteturais Mínimo de 5 mudanças citológicas

Quadro 2.3 - Critérios definidos por Kujan et al. (8) para a classificação do grau da displasia oral segundo o sistema binário

O processo de evolução das lesões potencialmente malignas, relacionando as características clínicas e histopatológicas desde o início da leucoplasia até a formação da eritroplasia está esquematizado na figura 2.1 .

Figura 2.1 - Processo de malignização de uma lesão bucal. Adaptado de Greer (2006)

2.3 Carcinoma epidermóide

O câncer de cabeça e pescoço se refere a qualquer malignização na pele, cavidade nasal, seios paranasais, cavidade oral, glândulas salivares, faringe e laringe. Cerca de 90% das malignidades de cabeça e pescoço são carcinomas epidermóides de superfície mucosa (40), com origem a partir do epitélio estratificado do trato aereodigestivo superior incluindo o lábio, cavidade oral, cavidade nasal, seios paranasais, faringe e laringe (41).

O carcinoma epidermoide tem uma apresentação clínica variada, incluindo lesões exofíticas (formação de massa), endofíticas, leucoplásicas, eritroplásicas e eritroleucoplásicas (23). Essa lesão pode ser classificada em três subtipos, (1) carcinoma do vermelhão dos lábios, (2) carcinoma intra-oral e (3) carcinoma orofaríngeo. O carcinoma do vermelhão dos lábios é mais encontrado em pessoas de pele mais clara que se expõe a radiação ultravioleta e está associado à queilite actínica. Sua localização mais frequente é no lábio inferior e a lesão apresenta-se como ulceração endurecida, rígida, e com crosta. O crescimento do tumor é lento e com as metástases ocorrendo tardiamente. Os carcinomas orofaríngeos apresentam um tamanho maior quando comparados com os carcinomas bucais e a proporção de casos com metástases cervicais e distantes no diagnóstico é também maior. Os sintomas iniciais são dor ou dificuldade ao engolir, sendo que a dor pode ser fraca ou aguda e frequentemente é irradiada para o ouvido (23). Esses dois subtipos de lesões (carcinomas orofaríngeos e de vermelhão de lábios) não são objeto de estudo no presente projeto de pesquisa que visa estudar exclusivamente os casos de carcinoma epidermóide intra-orais.

No carcinoma intra-oral a localização mais comum é a língua (40%), normalmente nas superfícies ventral e lateral posterior. O assoalho da boca, palato mole, gengiva, mucosa jugal, e palato duro também são afetados. Dois terços dos carcinomas linguais apresentam-se como massas ou úlceras endurecidas e indolores na borda lateral posterior, sendo que 20% ocorrem na superfície ventral ou lateral anterior e 4% no dorso (6, 7, 23).

De todos os carcinomas intra-orais, são as lesões de assoalho bucal as que apresentam maiores chances de surgir a partir de uma leucoplasia ou eritroplasia preexistentes (23).

O câncer intra-oral soma menos de 3% dos cânceres nos Estados Unidos, mas é o 6º câncer mais comum nos homens e o 12º mais comum nas mulheres. Em países como a Índia, ele é considerado o câncer mais comum na população (6, 23).

No Brasil, em 2014 a estimativa de novos casos de câncer de cavidade oral é de 11.280 casos em homens e 4.010 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres. O câncer da cavidade oral em homens é o quarto mais frequente na região Nordeste (7,16/100 mil) e na região Sudeste (15,48/100 mil). Na região Centro-Oeste, é o quinto (8,18/100 mil), enquanto nas regiões Sul (15,21/100 mil) e Norte (3,21/100 mil) é o sexto mais frequente (9).

Para as mulheres o câncer da cavidade oral é o nono mais frequente na região Nordeste (3,72/100 mil) e na região Sudeste (4,88/100 mil). Na região Norte (1,60/100 mil) ocupa a 11ª posição, enquanto nas regiões Centro-Oeste (3,30/100 mil) e Sul (3,09/100 mil) ocupa respectivamente o 12º e 15º mais incidente (9).

A formação do carcinoma intra-oral é um processo multifatorial altamente complexo que ocorre quando o epitélio é afetado por diversas alterações genéticas (6, 7), além da destruição da membrana basal e de invasão de células fenotipicamente alteradas ao estroma subjacente (28). Histologicamente este processo se reflete em alterações celulares e na ruptura da membrana basal, essas alterações estão exemplificadas na figura 2.2 .

Figura 2.2 - O processo da carcinogênese oral. Adaptado de Scanlon, Van Tubergen et al. (2013)

É importante salientar que os carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço contêm heterogeneidade celular que pode ser pelo menos parcialmente explicada por mutações em curso, que ocorrem devido a instabilidade genética e a fatores ambientais (42).

O carcinoma epidermóide tem origem no epitélio displásico de superfície e caracteriza-se histopatologicamente por ilhas e cordões invasivos de células epiteliais malignas. A invasão tem como característica a extensão irregular do epitélio da lesão através do rompimento da membrana basal para dentro do tecido conjuntivo subjacente, sendo que células invasoras podem se estender profundamente para o tecido adiposo, músculo ou o osso. As células da lesão também podem romper a parede de vasos sanguíneos e/ou linfáticos, eventualmente causando metástases locais ou a distancia (23, 43). O parênquima da lesão pode mostrar resposta celular inflamatória ou imune ao epitélio invasor. Áreas focais de necrose podem aparecer, e ainda, as células neoplásicas podem induzir a formação de novos vasos sanguíneos para promover sua própria nutrição.

Pérolas de queratina podem ou não estar presentes dependendo da diferenciação celular (23).

As classificações histopatológicas para os carcinomas epidermóides da cavidade oral surgiram para explicar o comportamento dessas lesões. A primeira classificação foi proposta em 1920 por Broders et al. (quadro 2.4), e é uma graduação histopatológica baseada no grau da diferenciação celular e totalmente dissociada da história clínica do paciente. Esta classificação manteve-se por décadas como a classificação mais empregada, embora alguns trabalhos não tenham encontrado associação dessa classificação com o prognóstico do câncer (44).

A classificação proposta pela OMS em 2005 (quadro 2.5) fundamentou-se na classificação proposta por Broders et al. No entanto, há uma tendência de que na gradação histopatológica da OMS, ocorra uma classificação da maioria dos tumores como grau intermediário, já que essa classificação apresenta apenas três graus. Sendo assim, o sistema proposto por Broders com quatro graus ainda é praticado (44).

Classificação histopatológica de Broders et al	
Parâmetro	Características
Grau 1	0 a 25% de células indiferenciadas
Grau 2	25% a 50% de células indiferenciadas
Grau 3	50% a 75% de células indiferenciadas
Grau 4	75 a 100% de células indiferenciadas

Quadro 2.4 - Critérios para a classificação histopatológica proposta por Broders et al. (1920)

Classificação histopatológica da OMS	
Parâmetros	Características
Pouco diferenciados	Predomínio de células imaturas Numerosas mitoses atípicas e típicas Mínima queratinização
Moderadamente diferenciados	Certo grau de pleomorfismo nuclear Atividade mitótica Pouca queratinização
Bem diferenciados	Arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso

Quadro 2.5 - Critérios para a classificação histopatológica proposta pela OMS 2005

Atualmente o sistema mais utilizado para as classificações de carcinomas epidermóides é o estadiamento clínico e patológico de tumores (TNM), ele foi desenvolvido por Pierre Denoix na França entre os anos de 1943 e 1952, sendo que em 1953 a União Internacional Contra o Câncer (UICC) adotou esse sistema para determinar a extensão do crescimento e disseminação das neoplasias malignas (45).

A classificação usando esse sistema tem o objetivo de ajudar no planejamento do tratamento, como também, ajudar na indicação de prognósticos e na avaliação dos resultados devido aos tratamentos (45, 46). O sistema TNM é baseado em três componentes: 1) T- tamanho do tumor primário; 2) N-nódulo regional comprometido e 3) M- ausência ou presença de metástases a distância e a associação desses três fatores permite a classificação dos tumores em 5 estágios: 0,I,II,III e IV (47)

A presença de metástase é apontada como a principal causa de mortalidade no câncer, sendo que fatores como o microambiente do tumor, a interação com células vizinhas, quimiocinas, vascularização, estratégia de invasão imune e o mecanismo de transição epitélio mesenquimal influenciam na habilidade do câncer em se metastatizar (10).

O prognóstico para pacientes que apresentam carcinoma epidermóide de língua é em geral pobre devido a múltiplos fatores. Frequentemente, a doença é assintomática até atingir um estágio avançado. Nesse caso, existe dificuldade para analisar o local exato das lesões, bem como, na maioria dos casos os pacientes são idosos podendo apresentar saúde em geral comprometida. Por fim, o paciente pode desenvolver um segundo câncer primário. Todos esses fatores podem gerar comprometimento no prognóstico. Nesse sentido, a detecção precoce e a prevenção do câncer bucal e das lesões pré-malignas são muito importantes (6, 7, 48).

2.4 Carcinogênese – o papel da Célula-Tronco Cancerígena (CTC)

Estudos nos últimos anos têm tornado evidente que uma sub-população de células apresenta papel crítico no desenvolvimento do câncer. Essas células são chamadas de células tronco cancerígenas (CTCs) (10).

Antigamente, assumia-se que as células neoplásicas eram semelhantes no sentido de que toda célula de câncer tinha a mesma propensão de iniciar e propagar tumores e gerar metástases (modelo aleatório). Isso sugeria que não havia seletividade entre as células dos tecidos com câncer e a heterogeneidade nos tumores era explicada por mudanças espontâneas no fenótipo celular (12, 49, 50).

No entanto, estudos recentes sugerem outra alternativa, chamada de hipótese das células-tronco cancerígenas. Nesta hipótese é defendida a teoria de que o tecido tumoral tem uma hierarquia celular distinta e que apenas uma pequena sub-população de células dentro do tumor é capaz de iniciar o câncer, sendo essa população formada por células tronco tumorais (ou cancerígenas) (12, 41, 50-52). Esses dois modelos são exemplificados na figura 2.3 .

Figura 2.3 - Esquema do modelo aleatório e do modelo de células-tronco cancerígenas. Adaptado de Dick (2008)

Por definição células-tronco tumorais ou cancerígenas (CTCs) são um subconjunto de células iniciadoras que constituem uma reserva de auto-sustentação e tem por função manter o tumor (11, 53, 54).

As populações de CTCs são definidas por 4 características básicas: 1) Somente uma pequena porção de células cancerígenas iniciam a tumorigênese quando transplantadas em camundongos imunodeficientes; 2) Marcadores de superfícies de células distinguem as CTCs das células tronco normais 3) CTCs induzem o tumor ao formar tanto células tumorigênicas como não tumorigênicas, mantendo assim a heterogeneidade morfológica do tumor original e 4) Transplantes em série de varias gerações provam a capacidade de auto-renovação das populações de CTCs (41).

Brabletz e colaboradores em 2005 sugeriram que duas formas de CTCs apresentam papel na progressão tumoral em neoplasias epiteliais. São elas: as CTCs estacionárias, que são incorporados ao epitélio, não podem disseminar, mas

são capazes de formar o tumor primário e as CTCs móveis ou migratórias, que são localizadas na interface do tumor e medeiam a metástase (15, 16). É interessante notar que ambos os tipos de CTCs contribuem para a diferenciação e heterogeneidade do tumor (41).

Ao longo da última década, avanços no estudo da biologia das células neoplásicas mostram que muitos cânceres, incluindo o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, são originados e sustentados por células-tronco, visto que essas apresentam a habilidade de auto-renovação. Essas células também mostram resistência às terapias citotóxicas utilizadas na quimioterapia e resistência à radioterapia (55).

Diversos estudos foram realizados para se entender o papel das células-tronco cancerígenas nos carcinomas de cabeça e pescoço. Esses estudos são unânimes em apontar um papel fundamental na evolução desse tipo de câncer (14, 42, 50, 56, 57). As CTCs também desempenham um papel importante na formação do carcinoma adenóide cístico das glândulas salivares (58, 59).

As CTCs foram primeiramente definidas em neoplasias malignas hematopoiéticas por Lapidot et al. (54). Os autores fizeram transplante de células de uma subpopulação específica de leucemia mieloide aguda humana ($CD34^+$ e $CD38^-$) em ratos imunodeficientes. Essas células foram capazes de recapitular a leucemia e eram fenotipicamente e patologicamente idênticas às do paciente original. As populações de células remanescentes ($CD34^-$ e $CD38^+$) não foram capazes de dar origem a novos tumores (54, 55).

All-Hajj et al. (60), foram os primeiros a identificar uma população de CTCs em um tumor sólido. Os autores identificaram uma subpopulação de células $CD44^+$ e $CD24^-$ em câncer de mama e elas foram capazes de recapitular heterogeneamente e fenotipicamente o câncer de mama em ratos em experimentos xenográficos. Desde essa data, diversos pesquisadores isolaram populações de CTCs em outras neoplasias epiteliais, incluindo o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (11, 55, 60).

Duas hipóteses são aceitas para explicar como as CTCs se originam. A primeira afirma que elas podem surgir a partir de células-tronco normais que sofrem mutações de genes que as tornam células-tronco cancerígenas. A segunda hipótese afirma que elas podem ser originadas de células tumorais diferenciadas

que passam por alterações genéticas até adquirirem as características de CTCs (11, 50).

As células-tronco estão sujeitas a mudanças genéticas e epigenéticas devido a sua longevidade e com essas mudanças elas podem se comportar como células-tronco cancerígenas. Essa transformação das células pode ser exemplificada através da comparação de eventos ocorridos no estado estacionário e durante a carcinogênese (50, 60) .

No estado estacionário as células-tronco sofrem divisões assimétricas gerando células-tronco e células filhas diferenciadas que formam tecidos e/ou órgãos. Já na carcinogênese as células-tronco sofrem divisões simétricas gerando duas células-tronco idênticas e esse processo se repete diversas vezes levando assim a uma expansão clonal (50).

Os sinais envolvidos nesses eventos se originam dos nichos onde as células-tronco se encontram, portanto, o desarranjo dos nichos pode levar a uma desregulação na auto-renovação das células levando à carcinogênese (50).

As células-tronco cancerígenas podem migrar desses nichos e essa capacidade de locomoção é auxiliada por mediadores como a metaloproteinase 9 (MMP-9), laminina, tenascina e outros mediadores químicos presentes em estados inflamatórios de diferentes origens (50).

A figura 2.4 ilustra os dois tipos de divisões.

Figura 2.4 - Esquema da divisão simétrica e assimétrica das células-tronco

Um local importante na evolução neoplásica é a transição epitélio-mesênquimal (TEM) visto que nessa área, a célula epitelial assume o fenótipo de uma célula mesenquimal e ganha a capacidade de mobilidade e invasão. Durante esse processo, as células quebram as junções célula-célula e célula-matriz e migram para outro lugar. É justamente durante a progressão tumoral que algumas CTCs adquirem a habilidade para invadir tecidos e gerar metástases (16).

Na TEM as células também mudam suas estruturas citoesqueléticas para estabelecerem novas interações célula-matriz. Existem também alterações na polaridade das células envolvidas no processo, e estudos já mostraram que a perda de E-caderina parece estar correlacionada com a progressão tumoral (16).

Sabe-se que em câncer de mama e coloretal, os tumores que apresentam células que passaram pela TEM são aqueles que apresentam resistência a quimioterapia (61, 62). A aquisição de um fenótipo mesenquimal está relacionado com um aumento de invasão das células tumorais o que influencia na recorrência, metástases e em um prognóstico pior (16).

No câncer de cabeça e pescoço a proteína Twist1 induz a BMi-1 que é responsável pela regulação negativa da E-caderina. Interessantemente, a BMi-1 tem um papel essencial na regulação da auto-renovação das CTCs (63-66) e um estudo já mostrou que pacientes com aumento de Twist1 e BMi-1 tendem a ter um pior prognóstico (16).

Um membro da família de fatores de transcrição de zinco, o Snail, é um dos principais reguladores da TEM reprimindo a E-caderina, citoqueratina 18 e a desmoplaquina e aumentando a produção de vimentina e fibronectina. O Snail também é responsável por mediar a invasão e a metástase em diversos tipos de câncer (67).

A resistência a terapia vista em certas neoplasias sempre foi motivo de questionamento. Com a descoberta das células-tronco cancerígenas foi possível aos pesquisadores estabelecerem algumas explicações para essa resistência. Por si só, as CTCs são mais resistentes a diversas terapias clínicas, incluindo a quimioterapia e a radioterapia quando comparadas com células cancerosas não tronco. Com essas características as CTCs são consideradas as responsáveis por falhas em tratamentos e em recorrências tumorais (17).

Os tratamentos terapêuticos além de não serem totalmente eficazes ainda podem provocar mutações genéticas e a expansão dessas células, resultando em uma terapia de resistência adquirida. Por isso, caracterizar as CTCs e identificar as vias moleculares que mantêm essas células são passos importantes para a melhoria e a eficácia dos tratamentos contra o câncer (17).

No câncer de cabeça e pescoço estudos mostraram que uma alta porcentagem de células positivas para CD44 nos tumores primários vem sendo associada a falhas em tratamentos e que células que expressam os marcadores CD44, CD24, Oct4 e a integrina-B1 estão associadas a resultados ruins após a radioterapia (68, 69). Outro estudo mostrou que as CTCs que apresentavam expressão do CD44 tinham uma maior resistência a estímulos pró-apoptóticos e a agentes quimioterápicos quando comparadas a não CTCs (56, 70).

2.5 Nichos de células-tronco

O nicho de células-tronco (NCTs) é considerado um microambiente único dentro de cada tecido que tem por função regular a proliferação, sobrevivência, migração, o destino e o envelhecimento de células através da interação específica entre as suas células formadoras e moléculas bioativas (71).

A formação do nicho se inicia no desenvolvimento e continua após o nascimento, fornecendo células para o crescimento e auto-renovação do organismo. Os NCTs também podem ser ativados em caso de resposta a doenças e lesões, com função de fornecer células para a regeneração de tecido. Eles sofrem influência de fatores hereditários genéticos e/ou epigenéticos e/ou ambientais, sendo que essas influências podem induzir anormalidades diferentes na proliferação celular, diferenciação e na homeostase (71).

Assim, as células-tronco adultas são mantidas em nichos, que são microambientes dinâmicos e capazes de equilibrar a homeostase entre o repouso e células diferenciadas ativadas (50, 72).

Nichos de células-tronco são mais do que locais histológicos e anatômicos, eles são ambientes tridimensionais bem organizados que interagem e regulam o destino de células-tronco através da ação de componentes celulares e não celulares (12, 72, 73).

A localização das células-tronco não é suficiente para se definir um nicho. O nicho deve ter dimensões anatômicas e funcionais, para permitir que as células-tronco se reproduzam e/ou se renovem (71).

Também é função do nicho modular as funções das células-tronco quando necessário em casos de mudanças fisiológicas. É justamente essa capacidade dinâmica de impor funções para as células-tronco que faz com que o nicho seja vital tanto na medicina regenerativa, quando no tratamento de doenças mediado por células tronco. Para ocorrer a regulação, é necessária uma interação molecular que ocorre devido ao contato entre células, glicoproteínas da matriz e os espaços tridimensionais (71, 73).

Células tronco normais e tumorais dependem do seu nicho para sobreviverem e apresentarem suas funções principais (74). Os componentes celulares e não celulares encontrados nos nichos são responsáveis indiretamente pelos sinais de

proliferação, de auto renovação e portanto, ajudam as CTCs a manterem seu estado de indiferenciadas. Células do estroma, inflamatórias e as células vasculares tem se apresentado como componentes chaves para que o nicho suporte e sustente as CTCs (12, 73, 75).

Além desses fatores, o nicho ainda apresenta um papel de proteção para as CTCs já que contribui para a resistência das mesmas a terapias avançadas (12, 73, 74).

A manutenção da organização física do nicho é de extrema importância. No entanto, os sinais que regem essa manutenção não são bem definidos. Evidências sugerem que um importante mediador estrutural em tecido neural e vascular, as eferinas, podem participar de pelo menos um sistema de células-tronco. Por isso, é importante discernir eventos moleculares que sustentam a organização arquitetônica dos nichos e compreender como elementos dos nichos agem no crescimento desregulado de tumores (71).

No câncer de cabeça e pescoço, a maioria das células tronco são localizadas perto dos vasos sanguíneos e dependem das interações dos componentes dos nichos para sua sobrevivência. Assim, sugere-se a idéia da presença de um nicho perivascular para as células tronco do câncer de cabeça e pescoço. Todavia, ainda não é possível afirmar que o nicho perivascular seria alvo terapêutico viável para esse tipo de câncer (12, 16).

2.6 Marcadores de células-tronco epiteliais – ALDH-1 e CD44

As populações de CTCs são definidas e sinalizadas por biomarcadores, que não são exclusivos, mas eventualmente podem ser usados para sua detecção tanto no tumor primário, quanto nas lesões metastáticas. Acredita-se que o melhor conhecimento dessas células (CTCs) irá influenciar na decisão terapêutica e na modalidade de tratamento, o que por fim, terá influência direta no prognóstico dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (11, 41).

Entre os marcadores de células-tronco apresentados na literatura em estudos avaliando o carcinoma epidermóide podemos destacar o ALDH-1 (55, 76, 77) e o CD44 (55, 57, 78-80). Em seguida cada um desses marcadores será apresentado.

A aldeído deidrogenase (ALDH) pertence a uma família de enzimas intracelulares constituída por 19 isoformas localizadas no citoplasma, mitocôndria ou núcleo. Sua função é a oxidação do aldeído para ácido carboxílico, hidrólise de ésteres e serve também como uma proteína de ligação para várias moléculas. Os aldeídos são gerados por uma variedade de processos metabólicos e mais comumente resultam da degradação oxidativa dos lípidios de membrana, mas também podem surgir de aminoácidos, carboidratos e de catabolismo de neurotransmissores (10).

A família da enzima ALDH está envolvida na diferenciação celular, na desintoxicação e na resistência a drogas pela via da oxidação dos aldeídos intracelulares. A ALDH-1 é requerida na conversão do retinol (vitamina A) para ácido retinóico e apresenta alta expressão nas células-tronco hematopoiéticas e nas células progenitoras hematopoiéticas humanas. Além disso, essa proteína tem sido usada como marcador de células-tronco mamárias tanto normais, quanto malignas (77).

A expressão da ALDH pode ser usada com sucesso como marcadora de CTCs para muitos tipos de câncer, incluindo os de osso, pulmão, fígado, pâncreas, próstata, cabeça e pescoço, cérebro e cervical. Sendo assim, detecção da atividade dessa enzima é considerada um marcador universal para CTCs (10). A atividade do ALDH-1 já foi também associada à resistência de células progenitoras a substâncias quimioterápicas, já que ela pode quebrar drogas citotóxicas. Portanto, células ALDH-1 positivas estão sendo consideradas como um alvo em novas modalidades terapêuticas para o câncer (49).

O trabalho de Cheung et al. (81) foi o primeiro a mostrar que é possível isolar células tronco de leucemias com base no aumento da atividade da ALDH e Ginestier et al. (82) isolaram células ALDH+ de câncer de mama capazes de iniciar o tumor e fazer auto-renovação.

Chen e colaboradores em 2009 estudaram a ALDH-1 e sua importância na marcação de células-tronco malignas em câncer epidermóide de cabeça e pescoço. Nesse estudo eles isolaram as células ALDH-1 positivas e demonstraram que essas células apresentam radio resistência e representam um reservatório para a geração de novos tumores (67).

No carcinoma adenóide cístico, Sun et al. encontraram expressão altos níveis de ALDH-1. As células de carcinoma adenóide cístico que apresentam ALDH-1⁺

possuíam alta capacidade invasiva e eram responsáveis por mediar as metástases (83).

Ucar et al. estudou a função da ALDH-1 como marcadora para câncer de pulmão. Os autores afirmaram que as células ALDH ^{alta expressão} apresentam características das células-tronco malignas, mas precisam do suporte de outras células (ALDH ^{baixa expressão}) para sustentar o aumento do tumor. Essas informações em conjunto com o que já se sabe sobre a ALDH em relação a resistência a drogas pode ter implicações significativas no tratamento de câncer de pulmão (84).

No câncer de cabeça e pescoço uma pequena população de células cancerígenas ALDH1-/CD44+ obtidas de tecidos tumorais frescos formaram esferas tumorais e aumentaram a formação de novos tumores em camundongos nude. Entretanto, segundo os autores a associação desses dois anticorpos para o isolamento de uma população enriquecida em CTCs ainda precisa ser mais estudada (85, 86).

A proteína CD44 é uma glicoproteína trans-membrânica amplamente distribuída, que desempenha um papel crítico em diversos comportamentos celulares, incluindo adesão, migração, invasão e sobrevivência (87).

A CD44 funciona como receptor para o ácido hialurônico e apresenta afinidade com outros ligantes, como a osteopontina e metaloproteinases da matriz (MMPs) (77). Essa proteína já foi usada no isolamento e caracterização das CTCs em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, porém, somente a expressão de CD44 não é suficiente para essa função, visto que como uma glicoproteína da superfície celular a CD44 participa de variadas funções celulares (11, 88). Assim, a população de CTCs não pode ser determinada somente com o uso do CD44, e é necessária a combinação com outros marcadores. Alguns exemplos são: CD2, CD3, CD10, CD18, CD31, CD64 e CD140 (11).

A CD44 foi o marcador usado no primeiro experimento de isolamento de células-tronco cancerígenas em tumor maligno sólido. Nesse estudo, Prince et al. em 2007 revelaram que as populações CD44 positivas de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço possuem propriedades únicas de células-tronco malignas em ensaios de auto-renovação e diferenciação e também formam um micro domínio histológico único e que pode ser útil no diagnóstico do câncer (42)

Estudos subsequentes em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço mostraram que a população de CTCs CD44+ possui não só a capacidade de formar

esferas tumorais, proliferar, migrar e invadir *in vitro*, mas as mesmas também adquirem resistência a agentes quimioterápicos (11, 56).

2.6.1 ALDH-1 e CD44 em lesões potencialmente malignas

A expressão do marcador ALDH em lesões potencialmente malignas que apresentam displasias epiteliais ainda é pouco estudada e não há na literatura muitos trabalhos entre essa interação.

Visus et al. analisaram a expressão do marcador ALDH1A1 em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, epitélio normal e epitélio displásico, observando a expressão positiva desse marcador em 32,5% dos pacientes com displasias orais e em 61,5% de pacientes com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (89). Já Liu et al. estudaram a expressão desse marcador correlacionando com o risco de transformações malignas de leucoplasias orais, utilizando uma amostra de 141 pacientes e observaram que 54 pacientes apresentaram positividade para esse marcador. Utilizando um método estatístico os autores afirmaram que desses 54 pacientes, 48,1% desenvolveram um câncer oral. Desse modo os autores demonstram que esse marcador está correlacionado com o risco de malignização em leucoplasias (13).

Outro estudo que correlacionou carcinomas epidermóides orais, epitélio normal e epitélio displásico foi o de Dalley et al. Os autores desenvolveram culturas organotípicas utilizando como arcabouço a pele humana. A técnica imunohistoquímica foi utilizada para a análise da expressão de potenciais marcadores de células-tronco, dentre eles o ALDH. Os autores observaram que a expressão de ALDH1a1 nas camadas basais foi muito fraca e afirmar que essa marcação baixa deve-se a uma diferença de métodos utilizados para a detecção da expressão. Porém, não descartam que o método escolhido no estudo para a cultura esteja influenciando na expressão do marcador (78).

AbdulMajeed et al. estudaram essa mesma comparação de marcação do ALDH1 entre carcinoma epidermóide oral e epitélio normal e displásico, porém o estudo foi feito com tecido parafinado. Nesse estudo foi utilizado 107 casos, sendo 18 epitélios de mucosa oral normal, 27 displasias orais leves, 13 displasias orais moderadas a intensas e 49 carcinomas epidermóides orais. A expressão do

marcador foi observada no carcinoma, no epitélio normal e no displásico. Porém, sua expressão foi mais significativa em carcinomas quando comparados com as displasias, confirmando com esses resultados, que a expressão do marcador ALDH1 deve estar relacionada a malignização de displasias epiteliais orais (18).

A proteína CD44 vem sendo estudada em displasias epiteliais e em carcinomas epidermóides há anos. Um dos primeiros estudos com foco nesse tema foi o de Bahar et al. (90), que verificaram a expressão de uma variação do CD44, o CD44v6, como um marcador de progressão tumoral analisando casos de epitélio normal, lesões pré-malignas e lesões malignas e obtiveram resultados de marcações positivas nos 3 tecidos estudados, sendo que houve uma perda de expressão com a evolução das lesões (90).

Rautava et al. também estudaram a CD44v6 em epitélios displásicos e em carcinomas orais e observaram expressão positiva desse marcador em todas as suas amostras que, segundo os autores, pode estar relacionada à maturação desordenada do epitélio. Os autores não encontraram diferença estatisticamente significativa entre os grupos e concluíram que a CD44v6 não é um marcador útil para a progressão do tumor (91).

Resultado semelhante foi obtido por Mack et al. quando os autores analisaram a expressão por imunohistoquímica do CD44 e CD44v6 em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Os resultados mostraram expressão em epitélio normal, leucoplasias orais e em carcinomas, sendo que em leucoplasias e em carcinomas moderadamente diferenciados houve um aumento de marcação. Assim, os autores concluíram que esse marcador não diferencia epitélio normal do epitélio maligno e que seu uso como marcador de CTCs deve ser revisto (88).

Um estudo mais recente realizado por Bidaud et al. refere-se ao CD44v6 no entanto, afirma que essa proteína não é específica suficientemente para ser usado sozinha, mas, pode ser útil quando associada a outros marcadores. (57).

A expressão do CD44v3 e CD44v6 no epitélio oral pré-maligno foi descrita como baixa em casos de moderados a intensos e alguns autores afirmam que essa perda de expressão com a progressão da lesão pode facilitar a perda de adesão célula/célula, colaborando para um deslocamento da membrana basal e invasão no tecido subjacente (92).

3 PROPOSIÇÃO

Identificar as células que expressam marcadores de células-tronco em lesões epiteliais displásicas através da expressão em cortes seqüenciais de lesões potencialmente malignas (leucoplasias, eritroplasias e/ou eritroleucoplasias) e carcinomas epidermóides intra-bucais.

3.1 Proposições específicas

- 1) Classificar as displasias epiteliais encontradas nas lesões potencialmente malignas segundo o proposto pela OMS em 2005 e por Kujan et al. (8).
- 2) Avaliar a expressão dos marcadores ALDH-1 e CD44.
- 3) Correlacionar as marcações com o grau de displasias e com áreas de maior ou menor diferenciação celular em carcinomas epidermóides intra-bucais.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Seleção de casos

Para esse trabalho foram coletados, entre os anos 2010 e 2014, 61 casos aleatórios de leucoplasias, 4 casos de eritroplasias e 1 caso de eritroleucoplasia que apresentavam displasia epitelial, além de 18 casos de carcinoma epidermóide intra-oral. Todos os casos foram provenientes do banco de material parafinado da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Foram excluídos os casos que não apresentavam material suficiente para a realização de todas as reações de imunohistoquímica.

Foram obtidos de cada caso selecionado para o estudo dados clínicos a saber:

- Numero do caso
- Diagnóstico histopatológico
- Local da lesão
- Idade do paciente
- Gênero
- Tabagista
- Etilista

4.2 Graduação dos casos selecionados

As graduações das displasias epiteliais e das diferenciações dos carcinomas epidermóides intra-orais foram realizadas por 2 observadores independentes e calibrados utilizando os critérios estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde, 2005 e por Kujal et al. (8) citados nos quadros 1, 2, 3 e 5 da revisão da literatura. Na eventual discordância dos 2 observadores, um terceiro observador calibrado foi consultado.

4.3 Análise morfológica

Os blocos foram cortados no micrótomo da marca Leica (modelo RM 2045) na espessura de 4µm de forma que de cada caso sejam obtidas 8 lâminas (4 reações de imunohistoquímica, 1 lâmina para H.E anterior e 1 posterior e 2 cortes extra para eventual repetição). As lâminas de H.E foram utilizadas para a graduação da displasia presente e para a checagem de que essa displasia estava mantida na totalidade dos cortes submetidos a reação de imunohistoquímica.

Para as reações de imunohistoquímica, todas as lâminas usadas foram previamente silanizadas de acordo com o protocolo estabelecido no laboratório de patologia bucal da Faculdade de Odontologia da FOUSP.

4.4 Reação de imunohistoquímica

As lâminas histológicas selecionadas para as reações de imunohistoquímica foram desparafinizadas em banho de Xilol (I) a 60°C por 30 min e em Xilol (II) a temperatura ambiente, por 15 minutos e reidratados em cadeia descendente em concentração de etanol (álcool absoluto I, álcool absoluto II, álcool absoluto III, álcool 95%, 90%, 85% e 80%) durante 3 minutos cada. A recuperação antigênica foi realizada com produto, tempo e temperatura específicos determinados para cada anticorpo estudado e pré-estabelecido na quadro 4.1. Após a recuperação foi feita duas lavagens de 5 minutos com PBS1X.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com 3% de H₂O₂ em água destilada por 10 minutos, seguido de duas lavagens de 5 minutos com PBS1X. Após essa etapa foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos com BSA 1% por 45 minutos seguido da incubação do anticorpo primário com diluições e tempos já pré-estabelecidos (quadro 4.1). Após a retirada do anticorpo primário foram feitas de 2 lavagens de 5 minutos com PBS1X.

Para a reação da ALDH-1 foi usado o anticorpo de ligação e o complexo terciário do kit LSAB (Dako LSAB+ System, AP) seguido de duas lavagens com

PBS1X por 5 minutos.

Para o anticorpo CD44 foi usado o complexo EnVision (Dako EnVision+ System-HRP) por 30 minutos seguido de duas lavagens com PBS1X por 5 minutos cada.

A revelação da reação foi realizada com substância cromógena de 3-3'diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+) e a contra-coloração foi realizada com solução de hematoxilina de Mayer.

Por fim, as lâminas passaram pela bateria de desidratação e foram montadas para a análise das reações.

No quadro abaixo estão descritos os anticorpos com suas diluições, marcas, recuperações antigênicas e controles positivos.

<i>Anticorpo</i>	<i>Marca</i>	<i>Clone</i>	<i>Diluição do anticorpo primário</i>	<i>Anticorpo Secundário</i>	<i>Recuperação antigênica</i>	<i>Tecido de controle positivo</i>
ALDH-1	BD Transduction Laboratories	44/ALDH	1:300	LSAB (Dako)	Ácido Cítrico	Câncer de pulmão
CD44	Cell Signaling	4.1.1.1.1.1 56-3C11	1:700	EnVision(Dako)	Ácido Cítrico	Câncer de mama

Quadro 4.1 - Anticorpos utilizados para a técnica de imunohistoquímica

4.5 Análise dos resultados

Foram avaliadas e comparadas as marcações de células positivas de cada marcador analisado e correlacionadas com o grau de displasia epitelial vista nas lesões potencialmente malignas e no carcinoma epidermóide. Além disso a localização das células marcadas em todas as lesões também foram observadas.

Os resultados foram tabulados e apresentados na forma de tabelas e figuras.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização dos casos analisados

Após a aplicação dos critérios de exclusão foram selecionados 45 casos de lesões potencialmente malignas com displasia epitelial e 13 casos de carcinoma epidermóide intra-oral para compor o estudo.

Entre os 45 casos de lesões potencialmente malignas selecionados para o trabalho, 23 eram do sexo feminino e 22 do sexo masculino, sendo a média de idade para os casos em mulheres de 42,87 anos e a média de idade para os casos em homens de 37,55 anos.

Do total de casos, 17 eram tabagistas, 2 eram etilistas e 6 eram tabagistas e etilistas. O local mais acometido foi a língua com 38,30% dos casos. Os dados foram relatados na tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Descrição dos dados dos casos de leucoplasia, eritroplasia e leucoeritroplasia com displasias epiteliais, utilizados no estudo. Sendo M- gênero masculino, F- gênero feminino, T- tabagista, E- etilista, N/E- não especificado e N/U- não usuário

Caso	Diagnóstico clínico	Localização da lesão	Idade/Gênero	Tabagista/Etilista
1.	leucoplasia	palato mole	58 F	T
2.	leucoplasia	ventre lingual	64 M	T
3.	leucoplasia	borda lateral da língua	40 M	N/U
4.	leucoplasia	mucosa retrocomissura I	58 M	T
5.	leucoplasia	mucosa retrocomissura I	58 M	T
6.	leucoplasia	não informado	74 M	N/U
7.	leucoplasia	borda lateral da língua	N/E M	N/U
8.	leucoplasia	ventre de língua	36 M	N/U
9.	eritroplasia	borda lateral da língua	59 M	N/U
10.	leucoplasia	comissura labial ate a	50 M	T

		mucosa jugal		
11.	leucoplasia	mandíbula e assoalho bucal	N/E M	N/U
12.	leucoplasia	rebordo da língua	N/E M	E
13.	leucoplasia	não informado	N/E M	N/E
14.	eritroplasia	borda lateral da língua	N/E M	E
15.	leucoplasia	borda lateral e ventre de língua	54 F	T
16.	leucoplasia	borda lateral da língua	72 F	N/U
17.	leucoplasia	mucosa retrocomissura I	57 M	T
18.	leucoplasia	palato mole	N/E M	T/E
19.	leucoplasia	não informado	77 F	N/U
20.	eritroplasia	ventre anterior da língua	63 M	T
21.	leucoplasia	borda lateral da língua	72 F	N/E
22.	leucoplasia	assoalho	37 M	N/U
23.	leucoeritroplasia	mucosa jugal	59 M	N/U
24.	leucoplasia	borda lateral da língua	N/E F	T
25.	leucoplasia	mucosa jugal anterior	29 F	T
26.	leucoplasia	assoalho anterior	29 F	T
27.	leucoplasia	assoalho posterior	29 F	T
28.	leucoplasia	borda de língua	52 F	N/U
29.	leucoplasia	mucosa jugal	N/E F	T
30.	leucoplasia	assoalho	N/E F	T
31.	leucoplasia	palato duro	62 F	N/U
32.	leucoplasia	trígono retromolar	63 F	N/U
33.	leucoplasia	borda lingual	50 M	N/E
34.	leucoplasia	trígono direito	N/E F	T
35.	leucoplasia	rebordo inferior	66 F	T
36.	leucoplasia	mucosa jugal	59 F	T/E
37.	leucoplasia	borda lateral da língua	N/E M	N/U
38.	leucoplasia	rebordo	48 F	T/E

		alveolar		
39.	leucoplasia	rebordo alveolar	48 F	T/E
40.	leucoplasia	rebordo alveolar	48 F	T/E
41.	leucoplasia	mucosa jugal	63 M	T
42.	leucoplasia	ventre de língua	68 F	N/U
43.	leucoplasia	ventre lingual	58 M	T/E
44.	leucoplasia	rebordo alveolar	52 F	N/U
45.	leucoplasia	língua	N/E M	N/U

Dentro dos 13 casos de carcinoma epidermóide intra-oral selecionados para a pesquisa, 8 casos eram do gênero feminino e 5 do masculino, sendo a idade média das mulheres de 30,25 anos e dos homens de 52,8 anos. Além disso, nos 13 casos, 1 caso era tabagista, 2 casos eram etilistas e 5 casos eram tabagistas e etilistas. O local mais acometido foi a língua com 60% dos casos.

Em relação a diferenciação dos carcinomas epidermóides, 7 foram classificados como bem diferenciados e 6 casos foram classificados como mal diferenciados, dados descritos na tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Descrição dos dados dos carcinomas epidermóides intra-orais, utilizados no estudo. Sendo M- gênero masculino, F- gênero feminino, T- tabagista, E- etilista, N/E- não especificado e N/U- não usuário

Casos	Localização da lesão	Idade/Gênero	Tabagista/Etilista	Diferenciação
1.	língua	N/E F	N/U	Mal diferenciado
2.	língua	79 M	T/E	Bem diferenciado
3.	língua	56 F	T	Bem diferenciado
4.	borda e ventre de língua	76 M	T/E	Bem diferenciado
5.	língua	48 M	N/U	Bem diferenciado
6.	língua	45 F	T/E	Mal diferenciado
7.	borda lateral de língua	N/E M	T/E	Mal diferenciado
8.	língua	N/E F	E	Mal diferenciado
9.	assoalho bucal	61M	T/E	Mal

				diferenciado
10.	assoalho bucal	87 F	E	Bem diferenciado
11.	palato mole	N/E F	N/E	Mal diferenciado
12.	rebordo alveolar	54 F	N/U	Bem diferenciado
13.	palato duro	N/E F	N/U	Bem diferenciado

5.2 Classificação do grau de displasias

A classificação do grau das displasias, segundo os critérios propostos pela OMS, mostrou que entre os 45 casos analisados, 19 casos (42,22%) apresentaram displasia leve, 18 casos (40%) apresentaram displasia moderada e 8 casos (17,78%) apresentaram displasia intensa.

Já seguindo os critérios estabelecidos por Kujan et. al.2006, as displasias foram divididas em 22 casos (48,89%) de baixo risco e 23 casos (51,11%) de alto risco de malignização. A figura 5.1 mostra a classificação das displasias.

Figura 5.1 - Cortes corados por Hematoxilina e Eosina exibindo displasia epitelial. Figura A: displasia epitelial leve (caso nº01); figura B: displasia epitelial moderada (caso nº20); figura C: displasia epitelial intensa (caso nº03); figura D: displasia epitelial de baixo risco (caso nº 29); figura E: displasia epitelial de alto risco (caso nº43)

5.3 Análise Imunohistoquímica

Os resultados das análises imunohistoquímicas estão sumarizados nas tabelas 5.3 e 5.4 .

Tabela 5.3 - Expressão de ALDH-1 e CD44 em lesões potencialmente malignas

Numero do Caso	Diagnóstico Binário	Diagnóstico OMS	ALDH-1	CD44
1.	baixo risco	leve	camada basal	camada espinhosa
2.	alto risco	moderada	ausência de marcação	marcação fraca na camada basal
3.	alto risco	intensa	camada basal	marcação fraca na camada espinhosa

4.	alto risco	moderada	ausência de marcação	camada basal
5.	alto risco	intensa	ausência de marcação	camada basal e camada espinhosa
6.	baixo risco	leve	marcação fraca na camada espinhosa	marcação fraca na camada basal
7.	baixo risco	leve	ausência de marcação	camada basal e camada espinhosa
8.	alto risco	intensa	ausência de marcação	camada basal e camada espinhosa
9.	alto risco	moderada	ausência de marcação	marcação fraca na camada basal
10.	baixo risco	leve	ausência de marcação	camada basal
11.	alto risco	moderada	camada basal	camada basal
12.	baixo risco	leve	ausência de marcação	camada basal e camada espinhosa
13.	baixo risco	moderada	ausência de marcação	camada basal
14.	alto risco	intensa	camada basal	camada basal e camada espinhosa
15.	alto risco	intensa	ausência de marcação	camada basal e camada espinhosa
16.	alto risco	moderada	ausência de marcação	camada basal
17.	alto risco	moderada	ausência de marcação	camada basal e camada espinhosa
18.	baixo risco	leve	camada basal e camada espinhosa	camada basal
19.	baixo risco	leve	camada basal	camada basal
20.	baixo risco	moderada	camada basal e camada espinhosa	camada basal
21.	baixo risco	leve	camada basal	camada basal
22.	alto risco	intensa	ausência de marcação	camada basal
23.	alto risco	moderada	ausência de marcação	camada basal
24.	alto risco	moderada	ausência de marcação	camada basal

25.	baixo risco	leve	ausência de marcação	marcação forte na camada basal
26.	baixo risco	leve	marcação fraca na camada basal	camada basal
27.	baixo risco	leve	camada espinhosa	camada basal
28.	baixo risco	moderada	ausência de marcação	camada basal
29.	baixo risco	leve	ausência de marcação	camada basal
30.	alto risco	moderada	camada basal	marcação fraca em todas as camadas
31.	alto risco	moderada	camada basal	camada basal
32.	baixo risco	leve	camada basal	camada basal
33.	baixo risco	leve	ausência de marcação	camada basal
34.	alto risco	moderada	ausência de marcação	camada basal
35.	baixo risco	leve	ausência de marcação	camada basal
36.	alto risco	intensa	ausência de marcação	camada basal
37.	alto risco	moderada	ausência de marcação	camada basal e camada espinhosa
38.	baixo risco	leve	ausência de marcação	ausência de marcação
39.	baixo risco	leve	ausência de marcação	ausência de marcação
40.	baixo risco	leve	ausência de marcação	marcação fraca na camada basal
41.	baixo risco	leve	camada basal	camada basal
42.	alto risco	moderada	ausência de marcação	camada basal
43.	alto risco	moderada	ausência de marcação	ausência de marcação
44.	alto risco	moderada	camada basal e camada espinhosa	camada basal e camada espinhosa
45.	alto risco	moderada	ausência de marcação	camada basal

Tabela 5.4 - Expressão de ALDH-1 e CD44 em carcinomas epidermóides intra-orais

Caso	Classificação	ALDH-1	CD44
1.	Mal diferenciado	ausência de marcação	células periféricas
2.	Bem diferenciado	ausência de marcação	marcação difusa no epitélio neoplásico e em torno das pérolas córneas
3.	Bem diferenciado	células periféricas e células dos ninhos tumorais	células periféricas e células em torno da pérola córnea
4.	Bem diferenciado	ausência de marcação	células periféricas e células em torno da pérola córnea
5.	Bem diferenciado	ausência de marcação	marcação difusa no epitélio neoplásico
6.	Mal diferenciado	marcação no epitélio neoplásico	células periféricas e células neoplásicas do conjuntivo
7.	Mal diferenciado	marcação difusa no epitélio neoplásico	marcação difusa no epitélio neoplásico
8.	Mal diferenciado	marcação difusa no epitélio neoplásico	células periféricas e células neoplásicas do conjuntivo
9.	Mal diferenciado	células periféricas	células periféricas e células dos ninhos neoplásicos
10.	Bem diferenciado	células periféricas	marcação difusa no epitélio neoplásico
11.	Mal diferenciado	ausência de marcação	ausência de marcação
12.	Bem diferenciado	células periféricas e células em torno das pérolas córneas	marcação difusa no epitélio neoplásico e em torno das pérolas córneas
13.	Bem diferenciado	ausência de marcação	marcação difusa no epitélio neoplásico e nos ninhos

5.3.1 ALDH-1

A localização da marcação do anticorpo ALDH-1 foi citoplasmática em todos os casos estudados.

Nas lesões potencialmente malignas, a expressão de ALDH-1 foi encontrada em 16 casos (35,56% do total de casos) na camada basal e em alguns casos as marcações se estendiam até a porção média do epitélio. Interessantemente, em áreas mais indiferenciadas, os queratinócitos que se encontravam na camada basal perdiam a expressão.

Utilizando a graduação binária como padrão para determinar o grau de displasia epitelial, foi observada expressão de ALDH-1 em 10 lesões potencialmente malignas de baixo risco (22,22% do total de casos e 62,5% dentro dos casos positivos) e em 6 casos de alto risco de malignização (13,33% do total de casos e 37,5% dentro dos casos positivos). Os casos de baixo risco apresentaram positividade na camada basal. O mesmo padrão de marcação foi observado na maioria dos casos de alto risco.

Seguindo o padrão de graduação preconizado pela OMS, foi observada expressão de ALDH-1 em 9 casos classificados como displasia leve (20% do total de casos e 56,25% dentro dos casos positivos), em 5 casos classificados como displasia moderada (11,11% do total de casos e 31,25% dentro dos casos positivos) e em 2 casos classificados como displasia intensa (4,44% do total de casos e 12,5% dentro dos casos positivos).

A expressão em displasias epiteliais leves localizava-se na camada basal e na camada espinhosa do epitélio, nas displasias epiteliais moderadas a expressão localizava-se na camada basal e em alguns casos essa expressão se estendia na camada espinhosa e nas displasias epiteliais intensas expressão de ALDH-1 localizava-se somente na camada basal do epitélio.

A intensidade da expressão de ALDH-1 manteve um padrão na maioria dos casos avaliados.

Figura 5.2 - Expressão imunohistoquímica de ALDH-1 em lesões potencialmente malignas,. Figura A: Leucoplasia com displasia epitelial leve (caso nº18); figura B: Eritroplasia com displasia epitelial moderada (caso nº20); figura C: Leucoplasia com displasia epitelial intensa (caso nº14). Figura D: Leucoplasia com displasia epitelial de baixo risco (caso nº18); figura E: Leucoplasia com displasia epitelial de alto risco (caso nº44)

Em relação ao carcinoma epidermóide intra-oral houve expressão de ALDH-1 em 7 casos (53,85% do total de casos), sendo 3 casos bem diferenciados (23,08% do total de casos e 42,86% dentro dos casos positivos) e 4 casos mal diferenciados (30,77% do total de casos e 57,14% dentro dos casos positivos). Nesses casos positivamente marcados a expressão de ALDH-1 foi observada difusamente pelo epitélio e em alguns casos houve expressão em células periféricas dos ninhos epiteliais e dos cordões celulares como também em células das pérolas córneas, sendo que as células mais indiferenciadas exibiam expressão mais intensa.

Figura 5.3 - Expressão imunohistoquímica de ALDH-1 em carcinomas epidermóides intra-orais. Figura A (caso nº08); figura B (caso nº12) mostrando o padrão de marcação no epitélio, seta preta indicando células positivamente marcadas em torno da pérola córnea; figura C (caso nº09) exemplificando a marcação positiva de células mais periféricas dos ninhos epiteliais

5.3.2 CD44

A expressão de CD44 localizava-se na membrana celular em todos os casos estudados. Essa expressão foi positiva em 42 casos de lesões potencialmente malignas que exibiam os 3 graus de displasia epitelial (93,33% do total de casos) principalmente na camada basal do epitélio.

Utilizando a graduação binária como padrão para a classificação da displasia epitelial, foi observada expressão em 20 casos de baixo risco (44,44% do total de casos e 47,62% dentro dos casos positivos) e em 22 casos de alto risco (48,89% do total de casos e 52,38% dentro dos casos positivos). Dos casos estudados 40 apresentaram expressão na camada basal, dentro desses, 10 casos também

apresentaram expressão na camada espinhosa do epitélio e apenas dois casos, sendo um de baixo risco e o outro de alto risco, apresentaram marcação positiva apenas em células da camada espinhosa.

Utilizando a classificação da OMS et al., 2005, foram observadas marcações positivas em 17 displasias leves e 17 displasias moderadas (37,78% do total de casos e 40,48% dentro dos casos positivos) e em 8 displasias intensas (17,78% do total de casos e 19,05% dentro dos casos positivos).

Figura 5.4 - Expressão imunohistoquímica de CD44 em lesões potencialmente malignas,. Figura A: Leucoplasia com displasia epitelial leve (caso nº32); figura B: Eritroplasia com displasia epitelial moderada (caso nº20); figura C: Leucoplasia com displasia epitelial intensa (caso nº15). Figura D: Leucoplasia com displasia epitelial de baixo risco (caso nº19); figura E: Leucoplasia com displasia epitelial de alto risco (caso nº14)

Interessantemente dos 42 casos de lesões potencialmente malignas displásicas que expressaram CD44, em 39 casos verificou-se que as células da camada basal do epitélio não apresentam positividade para CD44 na área em íntimo contato com a membrana basal. Assim foi possível observar a expressão

dessa proteína circundando as paredes da célula mas ausente em sua base (Figura 5.5).

Figura 5.5 - Expressão imunohistoquímica da CD44 em casos de displasia epitelial, figura A (caso nº32): displasia epitelial de baixo risco/leve e figura B (caso nº37): displasia epitelial de alto risco/moderada. Setas indicam áreas da base das células que não apresentam positividade para o anticorpo CD44

Nos casos de carcinoma epidermóide intra-oral foi observada expressão de CD44 em 12 casos (figura 5.6) (92,31% do total de casos). A expressão era difusa pelo epitélio neoplásico, em torno de pérolas córneas e em ninhos epiteliais.

Figura 5.6 - Expressão imunohistoquímica da CD44 em carcinomas epidermóides intra-orais. Figura A e B (casos nº02 e nº13 respectivamente) exemplificando a marcação observada em todas as camadas do epitélio; figura C (caso nº03) mostrando marcação do epitélio e das pérolas córneas (seta preta); figura D (caso nº09) exemplificando a marcação epitelial em ninhos de células neoplásicas (seta preta)

A ausência de expressão do CD44 existente em células da camada basal do epitélio descrita acima para as displasias epiteliais também foi observada nos carcinomas epidermóides intra-orais, como é mostrado na figura 5.7 .

Figura 5.7 - Expressão imunohistoquímica da CD44 em casos de carcinoma epidermóide intra-oral, figura A (caso nº12) e figura B (caso nº13). Setas indicam áreas da base das células que não apresentam positividade para o anticorpo CD44

6 DISCUSSÃO

O uso dos sistemas de classificações de displasias epiteliais utilizados nessa pesquisa mostrou que a utilização da classificação de acordo com a OMS não foi significativa em relação aos casos de displasias epiteliais moderadas, visto que dentro dos nossos resultados apenas dois casos classificados como displasia epitelial moderada não foram classificados como displasia de alto risco de transformação maligna.

Nesse sentido, Kujan et.al. já tinham demonstrado que o método binário era eficaz para complementar o método utilizado pela OMS, visto que foi demonstrado alto índice de precisão (82%) para prever a transformação maligna (93).

Estudos apontam o tabaco como um possível fator associado ao o desenvolvimento de lesões pré-malignas (19, 26, 94-97). Em nossa pesquisa, dos 23 casos classificados como de alto risco de malignização, 8 pacientes relataram uso de tabaco e na classificação da OMS das 8 displasias intensas foi relatado o uso em 2 pacientes. Portanto em nenhuma das duas classificações o numero de usuários de tabaco chegou a 50%. Esse resultado pode ser explicado devido o numero total de casos não ser elevado.

A média de idade em nosso estudo foi de 40,26 anos, sendo a média entre os homens de 37,55 e entre as mulheres de 42,87 anos. A literatura afirma que a faixa etária que apresenta maior prevalência de lesões pré-malignas é a de 50-60 anos de idade, porem é entre os 60-70 anos de idade que há um maior risco de transformação maligna (2, 96, 98). Dentre os nossos casos de displaisas com idades identificadas há uma prevalência de 13 pacientes na faixa etária de 50 a 60 anos, seguido de 11 pacientes com mais de 60 anos e 9 pacientes com menos de 50 anos. Esses resultados estão de acordo com a literatura, contudo em relação a faixa etária que apresenta maior chances de transformação maligna nossos resultados mostraram que a porcentagem de lesões classificadas de alto risco de malignização é maior entre a faixa de 50-60 anos (69,23%) e o mesmo ocorre nos classificações de displasias epiteliais moderadas ou intensas.

A literatura não são unânime em afirmar qual gênero apresenta maior probabilidade de transformações malignas (2, 19, 96, 99). Nossos resultados mostram um equilibrio nesse parâmetro, visto que de 45 casos de lesões

displásicas, 22 são do gênero masculino e 23 do gênero feminino. Se considerarmos apenas os casos de alto risco de transformação maligna, 60,87% são do gênero masculino e 39,13% são do gênero feminino. Pela classificação da OMS, em displasias epiteliais intensas, 75% são do gênero masculino e 25% são do gênero feminino. Isso mostra uma prevalência do gênero masculino quando é observado apenas graus mais elevados de displasias epiteliais.

Nos carcinomas epidermóides intra-orais o tabaco também é considerado um fator de risco e está frequentemente associado a lesão neoplásica. Além do tabaco, outro fator de risco também associado é o álcool (100, 101). Um estudo recente que avaliou 346 pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide oral apresentou um resultado de 80% dos pacientes como usuários ativo ou inativos do tabaco e 70% como usuários ativos ou inativos de álcool, sendo a maioria do gênero masculino (101). Em concordância com a literatura, no grupo portador de carcinoma epidermóide, nossos resultados mostraram uma maior incidência de pacientes que fazem uso do tabaco e do álcool em conjunto (5 casos de um total de 13 casos), sendo que desses, 4 casos eram do gênero masculino (101-104).

O gênero masculino apresenta uma maior frequência de casos de carcinoma epidermóide intra-oral (101, 105-107) na maioria dos estudos publicados. Porém, Reddy et.al.2010 e Kruse et.al. 2011 demonstraram em suas pesquisas que o número de pacientes femininos que desenvolvem câncer oral tem aumentado (108, 109). Isso provavelmente se deve a mudanças no modo de vida das mulheres e o aumento no uso do tabaco e do consumo de álcool, que antigamente era mais restrito ao gênero masculino (101, 110).

Em relação as classificações de diferenciação do carcinoma epidermóide é relatado na literatura que a maioria dos carcinomas epidermóides orais são classificados como bem ou moderadamente diferenciados (101, 103, 111, 112). Em nossos resultados, o número de mulheres e homens acometidos pelo carcinoma epidermóide é praticamente equilibrado com uma pequena maior diferença para o número de homens (7 de 13 casos).

De acordo com os resultados obtidos na análise imunohistoquímica, é possível afirmar que independente da classificação do grau de displasia epitelial, é possível observar marcação para ALDH-1 e CD44. Todavia, em lesões potencialmente malignas, a marcação para ALDH1 é restrita a alguns casos enquanto a marcação para CD44 é vista quase na totalidade dos casos incluídos nesse estudo.

Somente considerando os casos de lesões potencialmente malignas onde foi observada a expressão de ALDH-1 (18 de 45 casos – 40%), foi possível verificar que os grupos de baixo risco de malignização (10 casos - 62,5%) e de displasia leve (9 casos - 56,25%) foram os que apresentaram um maior número de casos positivos. Esse valor é compatível com o descrito por outros autores que estudaram a expressão desse marcador em displasias orais. Visus et.al. encontraram expressão em 32,5% dos casos estudados enquanto Liu et.al. obtiveram expressão em 38,3% de casos de leucoplasia oral (13, 89).

Quando encontrada, a marcação para ALDH-1 era citoplasmática e as células positivas para o marcador se localizavam predominantemente na camada basal do epitélio do tecido. Esse padrão de marcação não apresentou uma alteração de acordo com o grau de displasia epitelial estudado.

Estudos em lesões potencialmente malignas mostram que a ALDH-1 apresenta uma marcação citoplasmática predominante em queratinócitos da camada basal do epitélio (18, 78, 86, 113). Células positivas são detectadas em todos os graus de displasias orais e em carcinoma epidermóide oral (18) corroborando com o encontrado em nossos resultados.

No entanto, a literatura é controversa nesse ponto e mostra em alguns estudos que o aumento da expressão da ALDH-1 em displasias orais está relacionada ao aumento da gravidade da displasia e um maior risco de transformação (18, 35, 114).

Um estudo de 2013 observou a expressão de ALDH-1 em amostras de câncer de cabeça e pescoço e em casos de displasias orais. Nesse estudo, Liu et.al. verificaram a expressão do ALDH-1 em 141 pacientes que tiveram diagnósticos de leucoplasias orais e verificaram que 54 pacientes apresentaram marcação positiva nos queratinócitos da camada basal. Esses pacientes foram acompanhados em média por 5,5 anos e foi constatado que 48,1% dos pacientes que apresentaram marcação positiva para o ALDH-1 desenvolveram câncer oral, contra 12,6% dos pacientes que não apresentaram marcação. Segundo os autores, esses resultados mostraram que a expressão do ALDH está associada a um prognóstico ruim em relação ao risco de malignização das lesões potencialmente malignas (13). Porém, nossos resultados mostraram um maior número de casos positivamente marcados em displasias orais classificadas como de baixo risco ou de grau leve em comparação aos outros graus de displasia e mesmo analisando a intensidade das

marcações não foi visto um aumento nos casos classificados como de alto risco de malignização ou de displasia intensa.

Essa associação com a carcinogênese pode ser explicada pelo menos em parte pela função da enzima ALDH-1. O membro A1 da família ALDH1 junto com a ALDH2 estão envolvidos na conversão do acetaldeído para ácido acético que corresponde a segunda etapa do metabolismo do álcool. Portanto, a diminuição da atividade de ALDH1A1 nos tecidos pode contribuir para um aumento de níveis do acetaldeído que é um conhecido carcinógeno, aumentando assim, o risco do desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço (13, 89).

Em carcinomas epidermóides intra-orais nossos resultados mostraram positividade para ALDH-1 em 53,85% dos casos. Essa marcação era abrangente, não incluía áreas de maior diferenciação como por exemplo as camadas internas das pérolas córneas e era mais intensa na periferia de ilhas e cordões epiteliais invasivos. Esses resultados são confirmados com base em outro estudo no qual a expressão de ALDH-1 foi comparada entre diferentes graus de displasia e de carcinoma epidermóide oral (18) e estudos em outros tipos de câncer (35, 113, 115-117).

Estudos já avaliaram a capacidade de células ALDH-1⁺ que foram cultivadas e implantadas em camundongos imunocomprometidos e como resultado obtiveram células capazes de alta renovação, tumorigenicidade e radioresistência. Portanto as células ALDH-1⁺ eram aptas a formarem novos tumores e foram consideradas células tronco neoplásicas (11, 42, 82).

Em nossa pesquisa foi possível observar um número grande de células que expressam ALDH-1 tanto em displasias epiteliais como em carcinomas epidermóides intra-orais. Entretanto, sabe-se que o número de células-tronco localizadas no epitélio é naturalmente menor representando de 0,1 a 1% das células desse tecido. Portanto, é possível afirmar que as células marcadas em nossas amostras não são em sua totalidade células-tronco cancerígenas, ocorrendo a marcação de outras subpopulações celulares. Assim há necessidade de uma associação de marcadores epiteliais para aumentar a especificidade na identificação desse tipo de célula.

Um ponto crucial no desenvolvimento e evolução de um câncer são as metástases. Entender e encontrar um modo de combater essa disseminação seria a chave para a diminuição no número de mortes e de recorrências das doenças. A

transição epitélio-mesenquimal é a etapa na qual as células do epitélio adquirem características mesenquimais e assim se deslocam pelo tecido. Algumas das células que passam por essa transição são células-tronco cancerígenas. Chen et.al. mostraram que células ALDH-1⁺ e CD44⁺CD24⁻ ALDH-1⁺ apresentaram uma alta expressão de genes relacionados a células-tronco embrionárias, genes de resistência a drogas e genes relacionados a transição epitélio-mesenquimal (67).

Já é de conhecimento dos pesquisadores de que a transição epitélio-mesenquimal tem como um dos maiores reguladores o gene Snail, membro de uma família de fatores de transcrição responsável pela mediação da invasão e metástase em diferentes tipos de cânceres (67, 118, 119).

Chen e colaboradores em 2009 estudaram a relação entre o gene Snail e a enzima ALDH-1 em células-tronco cancerígenas de câncer de cabeça e pescoço e observaram que após utilizar o método de siRNA com um vetor lentiviral, o ensaio de FACs demonstrou um decréscimo na quantidade de ALDH-1 e de CD44⁺ e CD44⁻ em amostras tratadas, além disso a expressão do Snail em células ALDH-1⁺ CD44⁺CD24⁻ diminuiu a invasão tumoral e a habilidade de formação de colônias dessas células. Uma super expressão da proteína ALDH-1 em linhagens ALDH-1⁻ (negativas) de câncer de cabeça e pescoço, resultou em um aumento nas propriedades tumorigênicas, de invasão e de radio e quimioresistência. Além disso, os resultados da citometria de fluxo confirmaram que o fator de transcrição Snail apresenta a habilidade de regular a expressão de marcadores mesenquimais como o CD44 em células de câncer de cabeça e pescoço. Com tudo isso os autores sugeriram que a expressão da Snail pode conferir o potencial para regular a tumorigênese, radio e quimioresistência e as propriedades de células-tronco em tumores malignos de cabeça e pescoço (67).

Em relação ao CD44, nosso estudo observou que as células da camada basal do epitélio não apresentam positividade na área em íntimo contato com a membrana basal, fato também observado por outro estudo (120). Essa falta de expressão acontece pois a proteína é uma proteína de adesão celular. Como nessa área da célula não há mais ligações com células do epitélio não ocorre a expressão do marcador.

Foi observada expressão de CD44 em 93,33% das lesões potencialmente malignas displásicas e em 92,31% de carcinoma epidermóide. Na literatura é possível encontrar porcentagens variadas de expressão de CD44 em carcinoma

epidermóide oral, variando de 15% (121), 62,2% (70), 65,2% (86). Oliveira et.al. observaram que a expressão para o CD44 em carcinoma epidermóide oral foi predominante em regiões associadas com células basais, além disso também foi observado um aumento de marcação nas células neoplásicas comparando com o epitélio normal do tecido (121).

A glicoproteína de adesão celular CD44 é expressa na membrana de células que estão envolvidas na adesão, migração, angiogênese e na disseminação de células do câncer (122, 123). A família dessa proteína é composta de diversos membros que regulam o processo de interação entre células no epitélio normal e no epitélio neoplásico. Assim, essa proteína influencia na infiltração tumoral e na disseminação metastática (57, 70, 78, 86, 121, 124, 125).

Diversos estudos já mostraram a importância da CD44 como marcador de células de iniciação tumoral (12, 57, 79, 121, 126-128). Estudos feitos com cultura de células ou xenotransplantes em camundongos identificaram que células positivas de CD44 eram capazes de exibir duas características básicas de uma célula-tronco, a auto-renovação e diferenciação (42, 69).

A expressão de CD44 é descrita pela literatura na camada basal nas displasias e na totalidade do epitélio neoplásico em carcinomas epidermóides (18, 78). Nossos resultados dos casos de displasias epiteliais mostram positividade para CD44 na camada basal, mas que em alguns casos se estendia até a camada suprabasal e nos casos de carcinomas epidermóides intra-orais a expressão do anticorpo foi observada por todo o epitélio.

Bidaud et.al. estudaram a expressão do CD44 e do p53 em carcinomas epidermóides orais e lesões pré-malignas e a relação dessa expressão com a tumorigenese. Um dos resultados que eles encontraram foi que esse marcador estava ausente em regiões do epitélio bem diferenciadas (57). Essa ausência de marcação também foi encontrada em alguns dos nossos casos.

Tendo em mente que o ALDH-1 e o CD44 são reconhecidos na literatura como marcadores de células-tronco, a presença de ambos nos diferentes graus de displasias e no carcinoma epidermóide intra-oral é esperado. Contudo, nossos resultados mostraram uma expressão em diferentes camadas do epitélio das displasias orais como também em áreas bem diferenciadas e pouco diferenciadas dos carcinomas epidermóides. Portanto, apenas o uso de um só marcador não é suficiente para a identificação dessas células. É importante salientar que a

expressão tanto de CD44 quanto de ALDH-1 não é específica para o reconhecimento de células-tronco. Com isso, além da co-expressão desses 2 marcadores, o uso de outros marcadores também é necessário para o melhor conhecimento sobre o papel dessas células no desenvolvimento das lesões potencialmente malignas como também nos carcinomas epidermóides.

7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse trabalho é possível concluir que:

- O sistema de classificação binário para graduação histológica das lesões potencialmente malignas se mostrou mais eficiente.
- A enzima ALDH-1 apresentou expressão citoplasmática predominante nas células da camada basal tanto nas displasias epiteliais como nos carcinomas epidermóides intra-orais.
- A glicoproteína CD44 apresentou maior expressão na camada basal das displasias epiteliais, porém, foi encontrada expressão em camadas superiores em alguns casos. Nos carcinomas epidermóides intra-orais a CD44 foi expressa por todo o epitélio e em alguns casos em células em torno da pérola córnea.
- Ambos os marcadores mostraram expressão em todos os casos de displasia epitelial não importando a graduação histológica.
- O uso dos marcadores ALDH-1 e CD44 isoladamente não foi eficaz para o estudo do papel das células tronco em lesões potencialmente malignas e no carcinoma epidermóide intra-oral.

REFERÊNCIAS¹

1. Organization WH. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors: World Health Organization Classification of Tumors: Lyon: IARC; 2005.
2. Amagasa T, Yamashiro M, Ishikawa H. Oral Leukoplakia Related to Malignant Transformation. *Oral Sci Int.* 2006;3(2):45-55.
3. Bouquot JE. Oral leukoplakia and erythroplakia: a review and update. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1994;6(6):9-17; quiz 9.
4. Meiller TF, Garber K, Scheper M. A review of common oral pathology lesions, with a focus on periodontology and implantology. *J Evid Based Dent Pract.* 2012;12(3 Suppl):254-62.
5. Feng JQ, Mi JG, Wu L, Ma LW, Shi LJ, Yang X, et al. Expression of podoplanin and ABCG2 in oral erythroplakia correlate with oral cancer development. *Oral Oncol.* 2012;48(9):848-52.
6. Tanaka T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol.* 2011;2011:603740.
7. Tanaka T, Tanaka M, Tanaka T. Oral carcinogenesis and oral cancer chemoprevention: a review. *Patholog Res Int.* 2011;2011:431246.
8. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 2006;42(10):987-93.
9. Inca. Estimativa 2014, Incidência de Câncer no Brasil; 2014.
10. Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PWK. Aldehyde dehydrogenase Its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle.* 2011;10(9):1378-84.

11. Chen ZG. The cancer stem cell concept in progression of head and neck cancer. *J Oncol*. 2009;2009:894064.
12. Krishnamurthy S, Nor JE. Head and neck cancer stem cells. *J Dent Res*. 2012;91(4):334-40.
13. Liu W, Wu L, Shen XM, Shi LJ, Zhang CP, Xu LQ, et al. Expression patterns of cancer stem cell markers ALDH1 and CD133 correlate with a high risk of malignant transformation of oral leukoplakia. *Int J Cancer*. 2013;132(4):868-74.
14. Lim YC, Oh SY, Cha YY, Kim SH, Jin X, Kim H. Cancer stem cell traits in squamospheres derived from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 2011;47(2):83-91.
15. Brabletz T, Jung A, Spaderna S, Hlubek F, Kirchner T. Migrating cancer stem cells - an integrated concept of malignant tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 5. England 2005. p. 744-9.
16. Satpute PS, Hazarey V, Ahmed R, Yadav L. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: a review. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(10):5579-87.
17. Rycaj K, Tang DG. Cancer stem cells and radioresistance. *Int J Radiat Biol*. 2014;90(8):615-21.
18. Abdulmajeed AA, Dalley AJ, Farah CS. Putative cancer stem cell marker expression in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2013;42(10):755-60.
19. van der Waal I, Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol*. 1997;33(5):291-301.
20. Bouquot JE, Speight PM, Farthing PM. Epithelial dysplasia of the oral mucosa-Diagnostic problems and prognostic features. *Curr Diagn Pathol*. 2006;12(1):11-21.
21. Kuffer R, Lombardi T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). *Oral Oncol*. 2002;38(2):125-30.

22. Woo SB. Atlas de Patologia Oral. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
23. Neville BW. Patologia Oral & Maxilofacial. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.
24. Bhattacharyya I, Chehal HK. White lesions. Otolaryngol Clin North Am. 2011;44(1):109-31, vi.
25. Brouns ER, Baart JA, Bloemena E, Karagozoglu H, van der Waal I. The relevance of uniform reporting in oral leukoplakia: definition, certainty factor and staging based on experience with 275 patients. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. 2013;18(1):e19-26.
26. Martorell-Calatayud A, Botella-Estrada R, Bagan-Sebastian JV, Sanmartin-Jimenez O, Guillen-Barona C. [Oral leukoplakia: clinical, histopathologic, and molecular features and therapeutic approach]. Actas Dermosifilogr. 2009;100(8):669-84.
27. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. Oral Oncol. 2009;45(4-5):317-23.
28. Scanlon CS, Van Tubergen EA, Inglehart RC, D'Silva NJ. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. J Dent Res. 2013;92(2):114-21.
29. Maserejian NN, Joshipura KJ, Rosner BA, Giovannucci E, Zavras AI. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2006;15(4):774-81.
30. Villa A, Villa C, Abati S. Oral cancer and oral erythroplakia: an update and implication for clinicians. Aust Dent J. 2011;56(3):253-6.
31. Reichart PA, Philipsen HP. Oral erythroplakia - a review. Oral Oncol. 2005;41(6):551-61.
32. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. Oral Oncol. 2010;46(6):423-5.

33. Scully C, Sudbo J, Speight PM. Progress in determining the malignant potential of oral lesions. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(5):251-6.
34. Shafer WG, Waldron CA. Erythroplakia of the oral cavity. *Cancer*. 1975;36(3):1021-8.
35. Feng JQ, Xu ZY, Shi LJ, Wu L, Liu W, Zhou ZT. Expression of cancer stem cell markers ALDH1 and Bmi1 in oral erythroplakia and the risk of oral cancer. *J Oral Pathol Med*. 2013;42(2):148-53.
36. Qin GZ, Park JY, Chen SY, Lazarus P. A high prevalence of p53 mutations in pre-malignant oral erythroplakia. *Int J Cancer*. 1999;80(3):345-8.
37. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007;36(10):575-80.
38. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(3):127-33.
39. Kujan O, Khattab A, Oliver RJ, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. *Oral Oncol*. 2007;43(3):224-31.
40. Walden MJ, Aygun N. Head and neck cancer. *Semin Roentgenol*. 2013;48(1):75-86.
41. Bhajjee F, Pepper DJ, Pitman KT, Bell D. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: a review of current knowledge and future applications. *Head Neck*. 2012;34(6):894-9.
42. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(3):973-8.
43. Rowe RG, Weiss SJ. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol*. 2008;18(11):560-74.

44. Lourenço SQC SA, Camisasca DR, Lindenblatt RC, Bernardo VG. Classificações Histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral: Revisão de Sistemas Propostos. *Rev Bras cancerol.* 2007;53(3):325-33.
45. Paleri V, Mehanna H, Wight RG. TNM classification of malignant tumours 7th edition: what's new for head and neck? *Clin Otolaryngol.* 2010;35(4):270-2.
46. Hubert Low TH, Gao K, Elliott M, Clark JR. Tumor classification for early oral cancer: Re-evaluate the current TNM classification. *Head Neck.* 2013.
47. Lindenblatt Rde C, Martinez GL, Silva LE, Faria PS, Camisasca DR, Lourenco Sde Q. Oral squamous cell carcinoma grading systems--analysis of the best survival predictor. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(1):34-9.
48. Zhen W, Karnell LH, Hoffman HT, Funk GF, Buatti JM, Menck HR. The National Cancer Data Base report on squamous cell carcinoma of the base of tongue. *Head Neck.* 2004;26(8):660-74.
49. Albers AE, Chen C, Koberle B, Qian X, Klussmann JP, Wollenberg B, et al. Stem cells in squamous head and neck cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2012;81(3):224-40.
50. Sayed SI, Dwivedi RC, Katna R, Garg A, Pathak KA, Nutting CM, et al. Implications of understanding cancer stem cell (CSC) biology in head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol.* 2011;47(4):237-43.
51. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature.* 2001;414(6859):105-11.
52. Tang DG, Patrawala L, Calhoun T, Bhatia B, Choy G, Schneider-Broussard R, et al. Prostate cancer stem/progenitor cells: identification, characterization, and implications. *Mol Carcinog.* 2007;46(1):1-14.
53. Kitamura H, Torigoe T, Hirohashi Y, Asanuma H, Inoue R, Nishida S, et al. Prognostic impact of the expression of ALDH1 and SOX2 in urothelial cancer of the upper urinary tract. *Mod Pathol.* 2013;26(1):117-24.

54. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 1994;367(6464):645-8.
55. Monroe MM, Anderson EC, Clayburgh DR, Wong MH. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *J Oncol*. 2011;2011:762780.
56. Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol*. 2009;45(7):633-9.
57. Bidaud P, Chasle J, Sichel F, Rousseau S, Petit P, Pottier D, et al. Expression of p53 family members and CD44 in oral squamous cell carcinoma (OSCC) in relation to tumorigenesis. *Histol Histopathol*. 2010;25(3):331-9.
58. Fujita S, Ikeda T. Cancer stem-like cells in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: relationship with morphogenesis of histological variants. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(3):207-13.
59. Ma H, Zhang M, Qin J. Probing the role of mesenchymal stem cells in salivary gland cancer on biomimetic microdevices. *Integr Biol (Camb)*. 2012;4(5):522-30.
60. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(7):3983-8.
61. Yang AD, Fan F, Camp ER, van Buren G, Liu W, Somcio R, et al. Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to-mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res*. 2006;12(14 Pt 1):4147-53.
62. Cheng GZ, Chan J, Wang Q, Zhang W, Sun CD, Wang LH. Twist transcriptionally up-regulates AKT2 in breast cancer cells leading to increased migration, invasion, and resistance to paclitaxel. *Cancer Res*. 2007;67(5):1979-87.
63. Park IK, Morrison SJ, Clarke MF. Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest*. 2004;113(2):175-9.
64. Valk-Lingbeek ME, Bruggeman SW, van Lohuizen M. Stem cells and cancer; the polycomb connection. *Cell*. 2004;118(4):409-18.

65. Spivakov M, Fisher AG. Epigenetic signatures of stem-cell identity. *Nat Rev Genet.* 2007;8(4):263-71.
66. Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, et al. Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nat Genet.* 2007;39(2):157-8.
67. Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;385(3):307-13.
68. Chikamatsu K, Ishii H, Takahashi G, Okamoto A, Moriyama M, Sakakura K, et al. Resistance to apoptosis-inducing stimuli in CD44+ head and neck squamous cell carcinoma cells. *Head Neck.* 2012;34(3):336-43.
69. Joshua B, Kaplan MJ, Doweck I, Pai R, Weissman IL, Prince ME, et al. Frequency of cells expressing CD44, a head and neck cancer stem cell marker: correlation with tumor aggressiveness. *Head Neck.* 2012;34(1):42-9.
70. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Tsakmaki V, Danielidis V, Sivridis E. Cancer stem cell phenotype relates to radio-chemotherapy outcome in locally advanced squamous cell head-neck cancer. *Br J Cancer.* 2012;106(5):846-53.
71. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature.* 2006;441(7097):1075-9.
72. Feng J, Mantesso A, Sharpe PT. Perivascular cells as mesenchymal stem cells. *Expert Opin Biol Ther.* 2010;10(10):1441-51.
73. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004;116(6):769-78.
74. Borovski T, De Sousa EMF, Vermeulen L, Medema JP. Cancer stem cell niche: the place to be. *Cancer Res.* 2011;71(3):634-9.
75. Kuhn NZ, Tuan RS. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol.* 2010;222(2):268-77.

76. Chen YC, Chang CJ, Hsu HS, Chen YW, Tai LK, Tseng LM, et al. Inhibition of tumorigenicity and enhancement of radiochemosensitivity in head and neck squamous cell cancer-derived ALDH1-positive cells by knockdown of Bmi-1. *Oral Oncol.* 2010;46(3):158-65.
77. Zhang Z, Filho MS, Nor JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol.* 2012;48(1):1-9.
78. Dalley AJ, AbdulMajeed AA, Upton Z, Farah CS. Organotypic culture of normal, dysplastic and squamous cell carcinoma-derived oral cell lines reveals loss of spatial regulation of CD44 and p75 NTR in malignancy. *J Oral Pathol Med.* 2013;42(1):37-46.
79. Chikamatsu K, Takahashi G, Sakakura K, Ferrone S, Masuyama K. Immunoregulatory properties of CD44+ cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head and Neck.* 2010;33(2):208-15.
80. Oh S-Y, Kang HJ, Kim YS, Kim H, Lim YC. CD44-negative cells in head and neck squamous carcinoma also have stem-cell like traits. *Eur J Cancer.* 2012(0).
81. Cheung AM, Wan TS, Leung JC, Chan LY, Huang H, Kwong YL, et al. Aldehyde dehydrogenase activity in leukemic blasts defines a subgroup of acute myeloid leukemia with adverse prognosis and superior NOD/SCID engrafting potential. *Leukemia.* 2007;21(7):1423-30.
82. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007;1(5):555-67.
83. Sun S, Wang Z. ALDHhigh adenoid cystic carcinoma cells display cancer stem cell properties and are responsible for mediating metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;396(4):843-8.
84. Ucar D, Cogle CR, Zucali JR, Ostmark B, Scott EW, Zori R, et al. Aldehyde dehydrogenase activity as a functional marker for lung cancer. *Chem-Biol Interact.* 2009;178(1-3):48-55.
85. Lo WL, Yu CC, Chiou GY, Chen YW, Huang PI, Chien CS, et al. MicroRNA-200c attenuates tumour growth and metastasis of presumptive head and neck squamous cell carcinoma stem cells. *J Pathol.* 2011;223(4):482-95.

86. Huang CF, Xu XR, Wu TF, Sun ZJ, Zhang WF. Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. *J Oral Pathol Med.* 2014;43(7):492-8.
87. Cichy J, Pure E. The liberation of CD44. *J Cell Biol.* 2003;161(5):839-43.
88. Mack B, Gires O. CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *PLoS One.* 2008;3(10):e3360.
89. Visus C, Ito D, Amoscato A, Maciejewska-Franczak M, Abdelsalem A, Dhir R, et al. Identification of human aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 as a novel CD8+ T-cell-defined tumor antigen in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 2007;67(21):10538-45.
90. Bahar R, Kunishi M, Kayada Y, Yoshiga K. CD44 variant 6 (CD44v6) expression as a progression marker in benign, premalignant and malignant oral epithelial tissues. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1997;26(6):443-6.
91. Rautava J, Soukka T, Inki P, Leimola-Virtanen R, Saloniemi I, Happonen RP, et al. CD44v6 in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. *Oral Oncol.* 2003;39(4):373-9.
92. Godge PY, Poonja LS. Quantitative assessment of expression of cell adhesion molecule (CD44) splice variants: CD44 standard (CD44s) and v5, v6 isoforms in oral leukoplakias: an immunohistochemical study. *Indian J Dent Res.* 2011;22(3):493-4.
93. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncology.* 2006;42(10):987-93.
94. Lima JS, Pinto Ddos S, Jr., Sousa SO, Correa L. Oral leukoplakia manifests differently in smokers and non-smokers. *Braz Oral Res.* 2012;26(6):543-9.
95. Silverman S, Jr., Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer.* 1984;53(3):563-8.
96. Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE, van der Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population

of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. *Oral Oncol.* 1998;34(4):270-5.

97. Lee JJ, Hung HC, Cheng SJ, Chen YJ, Chiang CP, Liu BY, et al. Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: prevalence and risk factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006;101(4):472-80.

98. Chiesa F, Boracchi P, Tradati N, Rossi N, Costa L, Giardini R, et al. Risk of preneoplastic and neoplastic events in operated oral leukoplakias. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1993;29B(1):23-8.

99. Reddi SP, Shafer AT. Oral premalignant lesions: management considerations. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2006;18(4):425-33.

100. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AA. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol* 2000. 2011;57(1):19-37.

101. Pires FR, Ramos AB, Oliveira JB, Tavares AS, Luz PS, Santos TC. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. *J Appl Oral Sci.* 2013;21(5):460-7.

102. Albuquerque R, Lopez-Lopez J, Mari-Roig A, Jane-Salas E, Rosello-Llabres X, Santos JR. Oral tongue squamous cell carcinoma (OTSCC): alcohol and tobacco consumption versus non-consumption. A study in a Portuguese population. *Braz Dent J.* 2011;22(6):517-21.

103. Nemes JA, Redl P, Boda R, Kiss C, Marton IJ. Oral cancer report from Northeastern Hungary. *Pathol Oncol Res.* 2008;14(1):85-92.

104. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(2):541-50.

105. Grimm M. Prognostic value of clinicopathological parameters and outcome in 484 patients with oral squamous cell carcinoma: microvascular invasion (V+) is an independent prognostic factor for OSCC. *Clin Transl Oncol.* 2012;14(11):870-80.

106. Losi-Guembarovski R, Menezes RP, Poliseli F, Chaves VN, Kuasne H, Leichsenring A, et al. Oral carcinoma epidemiology in Parana State, Southern Brazil. *Cad Saude Publica*. 2009;25(2):393-400.
107. Gervasio OL, Dutra RA, Tartaglia SM, Vasconcellos WA, Barbosa AA, Aguiar MC. Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. *Braz Dent J*. 2001;12(1):57-61.
108. Reddy VM, Cundall-Curry D, Bridger MW. Trends in the incidence rates of tonsil and base of tongue cancer in England, 1985-2006. *Ann R Coll Surg Engl*. 2010;92(8):655-9.
109. Kruse AL, Bredell M, Gratz KW. Oral cancer in men and women: are there differences? *Oral Maxillofac Surg*. 2011;15(1):51-5.
110. Marocchio LS, Lima J, Sperandio FF, Correa L, de Sousa SO. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. *J Oral Sci*. 2010;52(2):267-73.
111. Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *J Can Dent Assoc*. 2007;73(4):339-44.
112. Larsen SR, Johansen J, Sorensen JA, Krogdahl A. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(8):657-62.
113. Currie MJ, Beardsley BE, Harris GC, Gunningham SP, Dachs GU, Dijkstra B, et al. Immunohistochemical analysis of cancer stem cell markers in invasive breast carcinoma and associated ductal carcinoma in situ: relationships with markers of tumor hypoxia and microvasculature. *Hum Pathol*. 2013;44(3):402-11.
114. Abd Elmageed ZY, Yang Y, Thomas R, Ranjan M, Mondal D, Moroz K, et al. Neoplastic reprogramming of patient-derived adipose stem cells by prostate cancer cell-associated exosomes. *Stem Cells*. 2014;32(4):983-97.
115. Mimeault M, Batra SK. Molecular biomarkers of cancer stem/progenitor cells associated with progression, metastases, and treatment resistance of aggressive cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2014;23(2):234-54.

116. Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, et al. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*. 2010;32(9):1195-201.
117. Alamgeer M, Peacock CD, Matsui W, Ganju V, Watkins DN. Cancer stem cells in lung cancer: Evidence and controversies. *Respirology*. 2013;18(5):757-64.
118. Batlle E, Sancho E, Franci C, Dominguez D, Monfar M, Baulida J, et al. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol*. 2000;2(2):84-9.
119. Zhou BP, Deng J, Xia W, Xu J, Li YM, Gunduz M, et al. Dual regulation of Snail by GSK-3 β -mediated phosphorylation in control of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Cell Biol*. 2004;6(10):931-40.
120. Tuhkanen AL, Tammi M, Pelttari A, Agren UM, Tammi R. Ultrastructural analysis of human epidermal CD44 reveals preferential distribution on plasma membrane domains facing the hyaluronan-rich matrix pouches. *J Histochem Cytochem*. 1998;46(2):241-8.
121. Oliveira LR, Castilho-Fernandes A, Oliveira-Costa JP, Soares FA, Zucoloto S, Ribeiro-Silva A. CD44⁺/CD133⁺ immunophenotype and matrix metalloproteinase-9: Influence on prognosis in early-stage oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2013.
122. Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Sionov RV. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in cancer dissemination. *Semin Cancer Biol*. 2008;18(4):260-7.
123. Richard V, Pillai MR. The stem cell code in oral epithelial tumorigenesis: 'the cancer stem cell shift hypothesis'. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1806(2):146-62.
124. Ponta H, Sherman L, Herrlich PA. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003;4(1):33-45.
125. Bourguignon LY, Wong G, Earle C, Chen L. Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J Biol Chem*. 2012;287(39):32800-24.

126. Xu D, Xu H, Ren Y, Liu C, Wang X, Zhang H, et al. Cancer stem cell-related gene periostin: a novel prognostic marker for breast cancer. *PLoS One*. 2012;7(10):e46670.
127. Perez A, Neskey DM, Wen J, Pereira L, Reategui EP, Goodwin WJ, et al. CD44 interacts with EGFR and promotes head and neck squamous cell carcinoma initiation and progression. *Oral Oncol*. 2013;49(4):306-13.
128. Perrone G, Gaeta LM, Zagami M, Nasorri F, Coppola R, Borzomati D, et al. In situ identification of CD44+/CD24- cancer cells in primary human breast carcinomas. *PLoS One*. 2012;7(9):e43110.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Expressão de ADLH-1 e CD44 em lesões epiteliais displásicas e no carcinoma epidermóide intra-oral.

Pesquisador: Andrea Mantesso Pobocik

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 11090313.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 803.801

Data da Relatoria: 24/09/2014

Apresentação do Projeto:

O estudo do mecanismo das células-tronco cancerígenas em doenças bucais, como leucoplasia e eritroplasia, com displasias de diferentes graus é essencial para um melhor entendimento de como as células-tronco influenciam a etiopatogenia dessas doenças. Ao longo dos anos e com a evolução da biologia molecular, os estudos sobre o câncer bucal aumentaram e com isso os questionamentos sobre o papel benéfico e maléfico das células-tronco. A identificação de marcadores celulares representa uma das principais ferramentas usados para se identificar células que apresentam características de células-tronco, e também para se elucidar os mecanismos de oncogênese no caso de lesões potencialmente malignas e no câncer. Assim, esse projeto de pesquisa visa analisar pela técnica de imunofluorescência por dupla marcação a expressão de proteínas previamente associadas a células-tronco epiteliais em lesões potencialmente malignas com diferentes graus de displasias e no carcinoma epidermóide oral.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar as células que expressam marcadores de células-tronco em lesões orais displásicas analisando esses marcadores de forma combinada através de co-expressão em cortes sequenciais de lesões potencialmente malignas e carcinomas epidermóides.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 803.801

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos.

Benefícios: identificar os marcadores úteis no diagnóstico das doenças estudadas

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa não fere nenhum preceito ético

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram apresentados corretamente

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 24 de Setembro de 2014

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br