MARCOS JOSÉ CUSTÓDIO NETO DA SILVA

**Análise da expressão de marcadores de células-tronco tumorais em queilite
actínica e carcinoma epidermoide de lábio**

São Paulo

2017

MARCOS JOSÉ CUSTÓDIO NETO DA SILVA

**Análise da expressão de marcadores de células-tronco tumorais em queilite
actínica e carcinoma epidermoide de lábio**

Versão Original

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

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais.

Orientador: Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins.

,

São Paulo

2017

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

Silva, Marcos José Custódio Neto da.

Análise da expressão de marcadores de células-tronco tumorais em queilite actínica e carcinoma epidermoide de lábio / Marcos José Custódio Neto da Silva ; orientador Marília Trierveiler Martins. -- São Paulo, 2017.

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

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Carcinoma epidermoide de lábio. 2. Fotocarcinogênese. 3. Célula-tronco tumoral. 4. Queilite actínica. I. Martins, Marília Trierveiler. II. Título.

Silva MJCN. Análise da expressão de marcadores de células-tronco tumorais em queilite actínica e carcinoma epidermoide de lábio. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / /2017

Banca examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, meu consolo nos dias de tribulação, a força que me trouxe até aqui, a esperança de um futuro melhor.

À minha mãe, porque desde pequeno me ensinou o valor do estudo. A senhora fez por nós o que minha avó não pôde fazer por você e hoje você deve se sentir extremamente abençoada por ver as sementes que plantou começarem a brotar. Quantas coisas você não abdicou ao sonhar os nossos sonhos? Devo tudo à senhora, te amo para sempre.

Aos meus irmãos e tias, pelo apoio emocional e suporte financeiro. Amo vocês! Não costumo dizer isso muito, como vocês bem sabem, mas vocês são mais que especiais para mim.

Aos amigos de infância lá em PK, porque é tão raro ver amizades duradouras. As nossas são! Aos amigos da graduação, porque sinto muita falta de vocês, uma viagem por ano não é suficiente. Aos amigos que fiz aqui em SP e na pós-graduação, vocês suprem um pouco a falta que o conforto de um lar pode ter. Em uma vida de efemeridades, espero que continuemos juntos.

Aos professores da graduação, que instigaram o espírito científico em mim.

Aos professores e funcionários da pós-graduação, mas em especial à minha orientadora. Você me recebeu de portas abertas em uma cidade até então desconhecida, em um momento novo de minha vida e confiou em meu potencial. Você me incentiva em vários aspectos da minha vida. Obrigado!

À profa. Luciana Corrêa, pelo empréstimo do p75NTR usado nessa pesquisa.

A CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado.

“ Não chores, meu filho;
Não chores, que a vida
É luta renhida:
Viver é lutar.
A vida é combate,
Que aos fracos abate,
Que aos fortes, aos bravos,
Só pode exaltar ”.

Gonçalves Dias

RESUMO

Silva MJCN. Análise da expressão de marcadores de células-tronco tumorais em queilite actínica e carcinoma epidermoide de lábio [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Original.

A hipótese das células-tronco tumorais vem ganhando destaque como um dos principais modelos para explicar a formação de neoplasias malignas. CD44, ALDH1 e p75NTR são alguns dos marcadores usados com êxito para separar a subpopulação de células-tronco tumorais, mas sua expressão imuno-histoquímica nunca foi estudada em lesões de lábio causadas pela radiação ultravioleta (UV). O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de CD44, ALDH1 e p75NTR em lábio normal (LN), queilite actínica (QA) e carcinoma epidermoide de lábio (CEL), além de estudar a expressão de p53 e correlacioná-la com a expressão dos marcadores de células-tronco tumorais. Para isso, foram selecionados blocos de material parafinado provenientes do serviço de patologia oral, resultando em 4 casos de LN, 43 casos de QA, subdivididos de acordo com o grau de displasia, e 20 casos de CEL. Os casos foram submetidos à reação imuno-histoquímica. Todos os casos foram positivos para CD44, com expressão membranosa e padrão de marcação praticamente invariável entre os grupos de QA e CEL ($p=0,09$). Os casos de LN foram negativos para o ALDH1; 51,1% e 55,5 % dos casos de QA e CEL, respectivamente, foram positivos para o ALDH1. A marcação era citoplasmática, geralmente em poucas células. Não houve diferença na expressão de ALDH1 entre os graus de displasia epitelial ($p=0,37$) e quando CEL era comparado à QA ($p=0,9$). Todos os casos de LN foram positivos para p75NTR; 95,3% e 80% dos casos de QA e CEL foram positivos para p75NTR. A expressão era membranosa/citoplasmática em LN e QA, em camada basal e parabasal, e citoplasmática em CEL, na região periféricas das ilhas. Houve diferença na expressão de p75NTR entre os grupos de displasia epitelial ($p<0,001$), mas não entre QA e CEL ($p=0,4$). Todos os casos de LN e QA foram positivos para p53; 80%

dos casos de CEL foram positivos. A expressão foi nuclear apenas, mas não houve diferença na expressão de p53 entre os graus de displasia epitelial ($p=0,33$) e entre QA e CEL (0,24). Não houve correlação significativa entre CD44, ALDH1 e p75NTR, quando avaliados entre si, e não houve correlação entre p53 e os marcadores de células-tronco tumorais. Os marcadores de células-tronco tumorais estão presentes em lesões potencialmente malignas e malignas de lábio, porém suas expressões não variaram entre QA e CEL. A expressão de p75NTR variou entre os graus de displasia epitelial.

Palavras-chave: Célula-tronco tumoral. Queilite actínica (QA). Carcinoma epidermoide de lábio (CEL). Fotocarcinogênese.

ABSTRACT

Silva MJCN. Expression analysis of stem cell markers in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Original.

Cancer stem cell hypothesis is becoming one of the main models to explain the generation of malignant neoplasms. CD44, ALDH1 and p75NTR are some of the markers successfully used to sort the subpopulation of cancer stem cells. However, their immunohistochemical expression were not studied in lip lesions caused by ultraviolet radiation (UV) so far. The aim of this study was to evaluate CD44, ALDH1 and p75NTR expression in normal lip (NL), actinic cheilitis (AC) and lip squamous cell carcinoma (LSCC). We also evaluated p53 expression and its correlation with the expression of the stem cell markers. In order to do that, paraffin-embbeded cases were selected from the oral pathology service, giving a total of 4 cases of NL, 43 cases of AC and 20 cases of LSCC. Immunohistochemical staining was performed in all the sample. All cases were positive for CD44, showing a membranous staining and a pattern of expression almost invariable between the groups AC and LSCC ($p=0,09$). All cases of NL were negative for ALDH1; 51,1% of AC and 55,5% of LSCC were positive. It was observed cytoplasmic staining, usually in a few cells. The ALDH1 expression showed no difference between the grades of epithelial dysplasia ($p=0,37$) and between AC and LSCC ($p=0,9$). All cases of NL were positive for p75NTR; 95,3% of AC and 80% of LSCC were positive for p75NTR. We observed membranous/cytoplasmic staining in NL and AC in the basal and parabasal layer and cytoplasmic staining in LSCC in the peripheral layers of the tumor islands. P75NTR showed difference in the expression among the grades of epithelial dysplasia ($p<0,001$) but showed no difference between the groups AC and LSCC ($p=0,4$). All cases of NL and AC were positive for p53; 80% of LSCC were positive for p53. The protein showed nuclear expression with no difference among the grades of epithelial dysplasia ($p=0,33$) and between AC and LSCC (0,24). There was no significant correlation among CD44, ALDH1 and p75NTR was observed and no significant

correlation between p53 expression and the stem cell markers. The stem cell markers are present in potentially malignant and malignant lesions of the lip, but their expression show no variation between AC and LSCC. The expression of p75NTR varied between the grades of epithelial dysplasia.

Keywords: Cancer stem cell. Actinic cheilitis (AC). Lip squamous cell carcinoma (LSCC). Photocarcinogenesis.

LISTAS DE FIGURAS

- Figura 5.1 - Expressão imuno-histoquímica representativa de CD44, ALDH1, p75NTR e p53 em LN, QA e CEL (400x) (Barra=50 μ m). CD44 tem expressão membranosa semelhante, independentemente do grau de displasia (A, E, I, Q). Um caso de QI teve expressão reduzida (M). ALDH1 não é expresso em LN (B) e geralmente marca poucas células em QA e CEL (cabeça de seta aponta as células positivas) (F, N, R). Ocasionalmente, uma extensa zona de marcação era vista (J). P75NTR marca camada basal e parabasal (C, G, K), às vezes se estendendo camadas acima (O). Padrão de células periféricas marcadas no CEL (S). P53 aumenta a expressão nuclear de LN até QI (D, H, L, P). Padrão de marcação em quase todas as células das ilhas tumorais (T).....55
- Figura 5.2 - Número de células positivas para ALDH1 (percentis 5% a 95%) entre os graus de displasia epitelial ($p=0,37$, Teste de Kruskal-Wallis).....56
- Figura 5.3 - Número de células positivas para ALDH1 (percentis 5% a 95%) entre QA e CEL ($p=0,9$, Teste de Mann-Whitney).....57
- Figura 5.4 - Número de células positivas para p75NTR (percentis 5% a 95%) entre os grupos de displasia epitelial ($p<0,001$, Teste de Kruskal-Wallis).....57
- Figura 5.5 - Número de células positivas para p75NTR (mínimo ao máximo) entre QA e CEL ($p=0,4$, Teste de Mann-Whitney).....58
- Figura 5.6 - Número de células positivas para p53 (percentis 5% a 95%) entre QA e CEL ($p=0,24$, Teste de Mann-Whitney).....58

LISTAS DE TABELAS

Tabela 5.1 - Percentual de casos positivos de LN, QA (displasia leve=QD; displasia moderada=QM; displasia intensa=QI) e CEL, sem considerar a quantidade de células marcadas.....	56
Tabela 5.2 - Associação entre a imunoexpressão de CD44 em QA e CEL.....	56
Tabela 5.3 - Imunomarcção de p53 nos graus de displasia epitelial (displasia leve=QD; displasia moderada=QM; displasia intensa=QI).....	61
Tabela 5.4 - Comparação entre a imunomarcção para p53 e p75NTR em QA.....	61
Tabela 5.5 - Comparação entre a imunomarcção para p53 e p75NTR em CEL.....	61
Tabela 5.6 - Correlação entre CD44, ALDH1 e p75NTR em QA (Correlação de Spearman).....	62
Tabela 5.7 - Correlação entre CD44, ALDH1 e p75NTR em CEL (Correlação de Spearman).....	62
Tabela 5.8 - Correlação entre p53 e CD44, ALDH1 e p75NTR em QA (Correlação de Spearman).....	62
Tabela 5.9 - Correlação entre p53 e CD44, ALDH1 e p75NTR em CEL (Correlação de Spearman).....	62

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
2.1 FOTOCARCINOGENESE	21
2.1.1 Radiação UV	21
2.1.2 Radiação UV e os danos causados no DNA	22
2.2 LESÕES DE INTERESSE ODONTOLÓGICO CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO CRÔNICA À RADIAÇÃO UV.....	23
2.2.1 Queilite actínica.....	24
2.2.2 Carcinoma epidermoide de lábio	25
2.2.3 p53 em QA e CEL	26
2.3 A CARCINOGENESE E AS CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS.....	27
2.3.1 A hipótese das células-tronco tumorais	27
2.3.2 Células-tronco teciduais versus células-tronco tumorais.....	30
2.3.3 Marcadores de células-tronco tumorais	31
2.3.3.1 CD44.....	33
2.3.3.2 ALDH1.....	34
2.3.3.3 p75 ^{NTR}	36
2.3.4 Marcadores de células-tronco tumorais no câncer intraoral e de pele.....	37
2.3.4.1 Marcadores no câncer intraoral	38
2.3.4.2 Marcadores no câncer de pele	40
3 PROPOSIÇÃO	43
3.1 PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS	43

4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 SELEÇÃO DE CASOS	45
4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA	45
4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA	46
4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA	47
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
5 RESULTADOS	51
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	51
5.2 CD44	51
5.3 ALDH1	52
5.4 p75NTR	53
5.5 p53	54
5.6 COMPARAÇÃO ENTRE A IMUNOMARCAÇÃO DE p53 E OS MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS	59
5.7 CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS	59
5.8 CORRELAÇÃO ENTRE p53 E OS MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS	60
6 DISCUSSÃO	63
7 CONCLUSÕES	71
REFERÊNCIAS	73
ANEXOS	88

1 INTRODUÇÃO

Existem muitos modelos para explicar a formação de neoplasias malignas, mesmo porque existem vários tipos de tumores completamente diferentes uns dos outros. Contudo, boa parte dos tumores parece obedecer ao modelo proposto pela hipótese das células-tronco tumorais. Esse modelo sugere que existe uma hierarquia de funções das células no tumor, tal qual existe nos tecidos normais, e a célula-tronco tumoral estaria no topo dessa hierarquia. Basicamente, as células-tronco tumorais representariam uma pequena subpopulação de células com potencial ilimitado de replicação e capacidade de se autorrenovar, características que as diferenciam das demais células não-tumorigênicas, além da exclusiva capacidade de iniciar e sustentar o crescimento do tumor (1–3).

É imprescindível reconhecer quais tumores obedecem a esse modelo, pois as células-tronco tumorais têm sido imputadas como as responsáveis pela recorrência dos tumores e resistência à terapia anti-câncer e, dessa forma, se tornam automaticamente o principal alvo terapêutico (4). Nas pesquisas atuais, essas populações tumorigênicas são separadas das demais com base na utilização de determinados marcadores, como o CD44, ALDH, CD133, CD34, p75NTR, entre outros, e o repertório de marcadores varia de acordo com o tecido em que o tumor se originou (5–10). Depois, ensaios *in vitro* e *in vivo* são realizados para confirmar as propriedades “tronco” da população separada, que geralmente demonstra alta expressão de fatores de transcrição relacionados à autorrenovação de células embrionárias, como o Sox2 e Oct4 (11).

O câncer de cabeça e pescoço, incluindo cavidade oral, e o de pele não-melanoma parecem obedecer a esse modelo de hierarquia tumoral (12,13). As células separadas por marcadores de células-tronco são mais tumorigênicas tanto *in vitro* como *in vivo* nessas neoplasias; além disso, a alta expressão de marcadores de células-tronco tem sido associada a um pior prognóstico (14). Contudo, o câncer de lábio sofre uma crise de identidade, uma vez que se origina de uma estrutura anatômica que nem é pele nem é mucosa oral e, embora seja bem provável que ele

siga esse modelo, não existem pesquisas que comprovem isso. Também não existem pesquisas que demonstrem a expressão proteica desses marcadores em queilite actínica, a lesão potencialmente maligna de lábio, e no próprio carcinoma epidermoide de lábio. Assim, é interessante verificar se existe alteração desses marcadores, ou mesmo se eles estão presentes, durante a fotocarcinogênese de lábio.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FOTOCARCINOGENESE

A fotocarcinogênese refere-se ao processo de transformação maligna de um tecido causado pela radiação ultravioleta (UV). Em qualquer população estudada, o câncer de pele do tipo não melanoma protagoniza a maior incidência entre todos os cânceres. Evidências robustas já comprovaram que o principal fator de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia é a radiação solar (15), sendo que a exposição de longa duração está fortemente associada ao carcinoma epidermoide da pele.

Basicamente, tudo que se sabe hoje sobre fotocarcinogênese vem de estudos sobre câncer de pele. No entanto, sabendo que a queilite actínica (QA) e o carcinoma epidermoide de lábio (CEL) também estão associados à radiação solar, o conhecimento da fotocarcinogênese vem sendo utilizado para a compreensão dessas lesões de interesse odontológico. Ambas as lesões, portanto, têm uma fisiopatologia mais similar à das lesões de pele do que das lesões intraorais malignas e potencialmente malignas.

2.1.1 Radiação UV

A radiação solar é composta pela luz visível, radiação infravermelha e radiação UV. Esta última contém três espectros de energia, o UVA (320-400), o UVB (290-320 nm) e o UVC (200-290 nm). Somente as frações UVA e UVB alcançam a superfície da Terra e são absorvidos por cromóforos dos tecidos biológicos. Na pele esses cromóforos incluem o DNA, a melanina, aminoácidos, caroteno e ácido trans-urânico, sendo o de maior importância na fotocarcinogênese o DNA (16).

A fração UVA compõe a maior parte da radiação ultravioleta, penetra mais profundamente na pele, porém é menos absorvida pelo DNA. Já a fração UVB é menos abundante, tem menor profundidade de penetração na pele, mas é a mais implicada na fotocarcinogênese, por ser mais facilmente absorvida pelo DNA (17). A radiação UVB é considerada mais mutagênica do que a UVA (18), porém ambas as frações estão envolvidas na patogênese do câncer.

2.1.2 Radiação UV e os danos causados no DNA

No DNA, a radiação UVB é absorvida e induz a formação de fotoprodutos em regiões do genoma contendo bases pirimidinas vizinhas: citosina-citosina (CC) ou citosina-timina (CT). Esses fotoprodutos podem ser o 6-4 pirimidina-pirimidona (6-4 PP), isômeros de Dewar e o dímero de pirimidina ciclobutano (CPD). Este último, mais frequentemente produzido, é resultado da ligação covalente de duas bases pirimidinas vizinhas, mais precisamente da saturação da dupla ligação dos carbonos 5 de uma base e 6 de outra, com posterior formação de um anel unindo essas bases (19).

A DNA polimerase não consegue interpretar as bases onde houve formação de dímeros e, por um mecanismo padrão do DNA, insere bases adenina (A) como complementares. Na duplicação semiconservativa seguinte, as bases A erroneamente pareadas serão agora pareadas com bases timina (T), constituindo as mutações com transições C→T ou CC→TT (20). Essas mutações são chamadas de mutação com assinatura UV. Os queratinócitos possuem sistemas de reparo capazes de remover tais lesões durante a replicação celular; no entanto, quando a maquinaria de reparo falha, tais lesões persistem e levam a erros de leitura durante a replicação celular (20).

Dependendo da região genômica, muitas dessas mutações podem ser inócuas. O problema acontece quando elas ocorrem em genes participantes de vias de sinalização que controlam o destino da célula. Sabe-se, por exemplo, que mutações pontuais com assinatura UV foram extensivamente identificadas no gene *TP53* (21,22). Diversos trabalhos mostram que tais mutações acontecem em estágios

iniciais da fotocarcinogênese, pois estão presentes também na pele de aparência normal e na queratose actínica, a lesão potencialmente maligna de pele causada pela exposição crônica à radiação ultravioleta (23,24).

A principal contribuição da radiação UVA também é formação de fotoprodutos CPD, mas principalmente em bases pirimidinas TT adjacentes e em uma quantidade extremamente baixa, se comparada aos fotoprodutos produzidos por UVB (25). A radiação UVA também induz quebras de fita simples no DNA e geração de espécies reativas de oxigênio (ROs). A própria UVB e outros carcinógenos também podem produzir ROs e, logo, esses danos ao DNA não são exclusivos da fotocarcinogênese (26).

2.2 LESÕES DE INTERESSE ODONTOLÓGICO CAUSADAS PELA EXPOSIÇÃO CRÔNICA À RADIAÇÃO UV

A radiação UV, como visto anteriormente, pode provocar alterações genéticas e epigenéticas na pele, mas também em qualquer outra superfície corporal exposta ao sol. O vermelhão do lábio é um tecido exclusivo da espécie humana, que não é pele nem mucosa, mas que sofre também alterações causadas pela exposição crônica à radiação. Essa região anatômica é de particular interesse para o dentista, pois ela compõe o limite anterior da cavidade bucal. Os dermatologistas quase nunca inspecionam essa região e raramente incluem as lesões potencialmente malignas ou malignas do vermelhão em suas pesquisas e levantamentos epidemiológicos. Cabe ao dentista avaliar cuidadosamente essa região, identificando as duas principais alterações que podem surgir: a QA e o CEL.

2.2.1 Queilite actínica

A QA é uma desordem potencialmente maligna do vermelhão do lábio, análoga à queratose actínica da pele. A região anatômica do vermelhão do lábio possui um revestimento epitelial mais fino, com menos camadas de queratina e menor quantidade de melanina quando comparada à pele, o que em teoria poderia tornar essa região mais suscetível à ação da radiação UV (27). Homens com idade avançada, de pele clara e com histórico de exposição solar de longa duração são tipicamente mais acometidos, sendo o lábio inferior a localização preferencial da lesão (28).

As alterações clínicas na QA são variáveis e podem envolver toda a semimucosa labial ou apenas áreas focais. Tais modificações incluem placas brancas, atrofia epitelial, ressecamento, apagamento da zona entre semimucosa e pele, áreas ásperas, fissuradas e até ulceradas (29). Na avaliação histológica, a lâmina própria obrigatoriamente exibe elastose solar, acompanhada de um infiltrado inflamatório variável. O epitélio geralmente exibe hiperqueratose e atrofia, embora possa estar acantótico ou ulcerado. Apresenta também atipias arquiteturais e citológicas que permitem classificar essa lesão de acordo com seu grau de displasia (28).

O grau de displasia epitelial é uma informação útil, porém limitada para o manejo do paciente com uma desordem potencialmente maligna de boca. Supõe-se que quanto mais displásico, maior o risco de transformação. Contudo, é difícil saber o verdadeiro valor prognóstico da displasia epitelial (30). Os critérios de avaliação propostos pela OMS ou pelo sistema binário, definem quais são as alterações citológicas e arquiteturais que devem ser consideradas na avaliação das displasias epiteliais (31), mas na prática ainda deixam um terreno aberto para a interpretação subjetiva de cada patologista. Portanto, a falta de acurácia dos critérios morfológicos justifica a busca por marcadores confiáveis na evolução da QA para o CEL.

Na literatura são descritas várias opções de tratamento para a QA, guiadas em parte pela informação fornecida no exame histopatológico. As modalidades mais conhecidas e com melhor nível de recomendação incluem a vermelhnectomia, criocirurgia, aplicação tópica de 5-Fluorouracil e Imiquimode, terapia fotodinâmica e

ablação com laser de CO₂ (32). O acompanhamento clínico é imprescindível em todos os casos, bem como a restrição à exposição solar para prevenir o aparecimento novas lesões ou progressão de alterações no lábio afetado.

2.2.2 Carcinoma epidermoide de lábio

O CEL é uma neoplasia maligna que surge de queratinócitos do vermelhão do lábio. Além do fator etiológico distinto, em muitos sentidos essa neoplasia é diferente dos carcinomas epidermóides intraorais e semelhante ao carcinoma epidermoide da pele. O CEL tende a ser menos agressivo, causar menos metástases nos linfonodos cervicais e menor taxa de mortalidade (33). O aparente melhor prognóstico pode ser atribuído à localização das lesões, mais facilmente visualizadas e identificadas em estágios iniciais de desenvolvimento (34).

Mesmo sendo uma neoplasia com comportamento e etiologia distintas do carcinoma epidermoide intraoral, os dados epidemiológicos oficiais do Instituto Nacional do Câncer (INCA) agrupam ambas as lesões na mesma categoria (35). Segundo esse órgão, em 2016 estimam-se 15.490 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e mulheres, respectivamente, sem distinguir o tipo de neoplasia ou a localização. A pouca informação que existe sobre a prevalência dessa lesão no Brasil vem de estudos retrospectivos regionais com amostras pequenas (36,37). Nos levantamentos epidemiológicos globais, o lábio é o sítio acometido em 50 % dos carcinomas epidermóides de boca na Austrália, mas a incidência no Brasil nem sequer é mencionada (38). A localização dessa lesão, em uma área de transição entre a pele e a mucosa labial, talvez faça com que ela seja esquecida nos levantamentos tanto da área médica quanto odontológica.

O perfil da maioria dos pacientes acometidos por essa neoplasia, que é o mesmo observado para a QA, é o típico perfil do paciente com câncer de pele não melanoma (33). Geralmente, o lábio inferior é o mais acometido e apresenta uma úlcera crostosa indolor ou uma lesão exofítica que não cicatriza. Na avaliação

histológica, o CEL é composto por ilhas e cordões de queratinócitos com citoplasma eosinofílico e variados graus de pleomorfismo nuclear e celular, por vezes formando pérolas de queratina e queratinização individual de células. A invasão dos queratinócitos malignos é acompanhada de uma resposta inflamatória variável em uma lâmina própria com elastose solar (29).

A ressecção cirúrgica do lábio ainda é o tratamento de escolha, acompanhada ou não de radioterapia. Tal modalidade responde por uma alta taxa de sobrevivência do paciente, estando a recorrência do tumor associada ao comprometimento cirúrgico das margens (39). O avanço nas técnicas cirúrgicas minimizou os danos estéticos ao paciente (34), porém algum grau de comprometimento estético e funcional sempre vai existir.

2.2.3 p53 em QA e CEL

O gene *TP53* é um gene supressor tumoral responsável por codificar a proteína p53. Essa proteína tem múltiplas funções celulares, entre elas o controle do ciclo celular e indução das células à apoptose, particularmente importante para impedir que células com determinadas mutações consigam progredir no ciclo celular. Por isso mesmo, mutações desse gene estão presentes em uma alta frequência de neoplasias malignas (40).

Diversas publicações apontam uma forte relação entre radiação UV e mutação do gene *TP53*. Por exemplo, as chamadas mutações com assinatura UV são frequentemente identificadas nesse gene. No câncer de pele, a frequência de alterações no *TP53* é alta e sugere-se que esta esteja presente em uma fase precoce de sua evolução, podendo estar relacionada à progressão de uma lesão potencialmente maligna para uma maligna (24,41,42).

Na literatura, existem inúmeras publicações sobre o papel do p53 e as implicações da perda de função em outros tipos de câncer. Em lábio, apenas 5 publicações existem sobre o assunto (43–47), sendo que apenas um trabalho investigou a presença da mutação no gene (47). A maioria dos trabalhos avaliou a

expressão proteica de p53, que parece aumentar conforme a lesão progride de QA para CEL (44,43).

2.3 A CARCINOGENÊSE E AS CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

Todos os cânceres resultam de uma subversão na homeostase tecidual, que favorece proliferação e sobrevivência de células, quase como se fosse um “organismo inteligente”. Contudo, cada câncer é uma doença diferente, que diverge não só entre os vários tipos, mas até mesmo em indivíduos diferentes com o mesmo tipo de câncer.

Pelo menos a maior parte dos tumores malignos apresenta heterogeneidade genética, o que implica dizer que as células neoplásicas têm características e funções diferentes. Essa heterogeneidade genética no tumor, que explicaria porque as células possuem tendências diferentes de invadir localmente ou à distância e de resistir ao tratamento, pode ser explicada com base em alguns modelos de desenvolvimento do câncer (48). Nesse cenário, a hipótese das células-tronco tumorais vem ganhando destaque na pesquisa do câncer, mesmo ainda não sendo um modelo que se aplique a todas as neoplasias ou que seja acreditado por toda a comunidade científica.

2.3.1 A hipótese das células-tronco tumorais

A primeira evidência científica da existência de células-tronco tumorais surgiu em estudo pioneiro de 1994 (49). Nesse estudo, uma fração de células com fenótipo CD34⁺ CD38⁻ era capaz de produzir leucemia em camundongos imunodeficientes, enquanto que frações com fenótipos distintos não tinham essa capacidade. As células com características especiais foram denominadas de células iniciadoras da leucemia, trazendo pela primeira vez a ideia de que células dentro uma neoplasia obedecem a uma hierarquia de funções e que, portanto, somente uma determinada população de células seria responsável pelo início e manutenção da neoplasia (49).

Anos mais tarde, em 2003, surge a primeira evidência de células-tronco tumorais em uma neoplasia sólida, mais precisamente no câncer de mama (6). Esse estudo separou populações de células tumorais com base em marcadores de superfície e concluiu que uma pequena população de células, cujo fenótipo era CD44⁺CD24⁻, tinha capacidade de formar tumores em camundongos imunocomprometidos, enquanto que outras populações não (6), reforçando a ideia da hierarquia de funções no tumor.

Desde então, a identificação de uma subpopulação de células chamadas de células-tronco tumorais ou células-tronco cancerígenas vem sendo feita em diversas neoplasias sólidas, como: câncer de cérebro (7), ovário (50), próstata (5), pulmão (51), pele (13) trato digestivo (52) e de cabeça e pescoço (53). É importante salientar que as pesquisas selecionam aquelas populações que mais se assemelham, em termos de comportamento, ao que se espera de uma célula-tronco tumoral. Muitos autores preferem usar a nomenclatura “célula iniciadora do tumor”, alegando que não se pode afirmar que tais populações sejam de fato as verdadeiras células-tronco tumorais. Para fins de praticidade, utilizaremos aqui nesse trabalho o termo célula-tronco tumoral.

A hipótese das células-tronco tumorais descreve um modelo de hierarquia tumoral, no qual as células têm fenótipo e função diferentes. No topo dessa hierarquia estão as células-tronco tumorais, uma pequena e rara população responsável pelo início e manutenção da neoplasia, com uma alta capacidade proliferativa e exclusivo poder de autorrenovação. Elas são capazes não só de se autorrenovar, como também de gerar clones fenotipicamente distintos, o que explicaria em parte a heterogeneidade dos tumores. No extremo oposto, a maior parte das células que compõem o corpo do tumor não seriam tumorigênicas (2,3,54). Existe, portanto, uma clara cisão de funções entre células tumorigênicas e não tumorigênicas baseado em uma ideia de hierarquia fixada.

Experimentalmente, essa subpopulação é separada das demais com base em marcadores, principalmente de superfície, como será comentado posteriormente (55). Além disso, ensaios funcionais são necessários para comprovar se o fenótipo tronco corresponde ao comportamento esperado da célula. Assim, só se considera como subpopulação tronco aquelas células que geram tumores malignos quando

transplantadas para camundongos imunocomprometidos, sendo que os tumores gerados devem possuir uma população mista de células tumorigênicas e não-tumorigênicas. Quando transplantadas em série, elas devem ser capazes de continuar produzindo tumores, indicando a manutenção da capacidade de autorrenovação (44, 49).

Em termos práticos, assumir esse modelo de formação de tumores significa dizer que a recorrência e a resistência à terapia anti-câncer devem ser atribuídas às células-tronco tumorais. A ideia é que se elas não forem eliminadas durante o tratamento, terão a capacidade de reconstituir o tumor; as outras células, consideradas não tumorigênicas, mesmo que persistam, não apresentariam o mesmo potencial (4,56,57). As células-tronco tumorais seriam o cerne do problema e o principal alvo terapêutico a se alcançar, sendo importante para fins terapêuticos identificar quais os tipos de câncer obedecem a esse modelo fixado de hierarquia.

Em contrapartida, o modelo estocástico ou de evolução clonal é um modelo de desenvolvimento de câncer no qual todas as células do tumor são potencialmente tumorigênicas, sendo igualmente capazes de iniciar e sustentar o crescimento do tumor. As células individualmente vão adquirindo mutações e alterações epigenéticas diferentes, transmitindo essas alterações a sua progênie. Tais alterações vão conferindo às células vantagens adaptativas e os clones com melhor potencial tumorigênico são selecionados, passando a predominar sobre os demais fenótipos existentes no tumor. Em outras palavras, não existe uma hierarquia no sentido em que todas as células têm a mesma probabilidade de se tornarem tumorigênicas (3,48,58).

Apesar de destoarem em alguns pontos, a evolução clonal pode ser encaixada na hipótese das células-tronco tumorais, uma vez que, provavelmente, essas surjam por evolução clonal. Evidências científicas apontam para existência de células-tronco pré-tumorais, que por evolução clonal se tornariam células-tronco tumorais. Essas células parecem ter o mesmo ou quase o mesmo fenótipo de suas contrapartes malignas e também ser capazes de se autorrenovar, mas divergem quanto ao seu potencial de diferenciação (59,60).

As pesquisas com células-tronco pré-tumorais ainda estão em seu alvorecer, mas acredita-se que a evolução clonal que ocorre até chegar na célula-tronco tumoral esteja refletida na evolução de uma lesão potencialmente maligna para uma lesão maligna. As lesões potencialmente malignas podem ser ou não reversíveis, bem como podem progredir ou não, comportamento observado nas células-tronco pré-tumorais (59,60). Isso é relevante para pesquisa das lesões/desordens que antecedem as neoplasias malignas, como na área de estágios pré-câncer, incluindo a odontologia que lida diariamente com leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica, por exemplo.

2.3.2 Células-tronco teciduais versus células-tronco tumorais

Como podemos observar, o modelo proposto pela hipótese das células-tronco tumorais se assemelha à hierarquia unidirecional observada nos tecidos normais, em que as células-tronco adultas são as únicas capazes de se autorrenovar e também de gerar uma progênie comprometida com a diferenciação. Nos tecidos adultos, as células-tronco podem se dividir de forma simétrica ou assimétrica, sendo que esta última forma é a que provavelmente acontece para manter a homeostase tecidual (53).

Na divisão assimétrica, a célula-tronco adulta se divide gerando uma célula-filha com fenótipo tronco e uma outra célula-filha comprometida com a diferenciação, a célula amplificadora transitória ou progenitora. Esta última tem um potencial de proliferação limitado, mas não de autorrenovação, e cada vez que se divide vai gerando clones mais comprometidos com a diferenciação, até que gera, por fim, uma célula diferenciada (61). Tecidos lábeis, como epitélios de revestimento e o tecido hematopoiético, são constantemente renovados, o que implica na constante sinalização para que células-tronco substituam as células diferenciadas eificadoras transitórias (62).

Parte dos pesquisadores acredita que a célula-tronco tumoral é a própria célula-tronco normal transformada. Dessa forma, a célula-tronco tumoral se valeria da própria “maquinaria” de sua contraparte normal para se autorrenovar e proliferar, potencializados talvez por alterações genéticas e epigenéticas e perturbações do

nicho. Vale lembrar, no entanto, que a hipótese da célula-tronco tumoral não resolve a origem dessa célula: É a própria célula-tronco transformada? É uma célula progenitora ou adulta diferenciada que se desdiferenciou? Ou uma combinação de ambos? (1)

Se pensarmos, por exemplo, em termos de longevidade, as únicas células em tecidos lábeis que sobrevivem tempo suficiente para acumular todas as alterações necessárias para um fenótipo maligno são as células-tronco. Todas as células diferenciadas ou amplificadoras transitórias serão substituídas e, em tecidos como o epitélio de revestimento da mucosa oral, a velocidade de renovação é bem alta (63,64). Portanto, não daria tempo de acumular todas as alterações necessárias para aquisição de um fenótipo maligno. No entanto, não devemos esquecer que a célula amplificadora transitória ou progenitora é uma célula que também prolifera e a instabilidade genética herdada de uma célula-tronco adulta pode aumentar a suscetibilidade a mutações adicionais, podendo revertê-la a um estado tronco (62,65).

Não há como afirmar qual a verdadeira origem dessa célula e nos tumores pode haver uma mistura de células-tronco tumorais provenientes da própria célula-tronco adulta ou de uma célula progenitora. Contudo, não importando quem veio primeiro, é indiscutível a importância da célula-tronco adulta para a carcinogênese, seja como acumuladora e perpetuadora das mutações, seja como a própria células transformada (1,66).

2.3.3 Marcadores de células-tronco tumorais

As células-tronco tumorais, à semelhança das células-tronco teciduais, são caracterizadas por um fenótipo que as distingue das demais células do tumor e do estroma. Não existe um conjunto de marcadores que define atualmente o fenótipo tronco, mesmo porque este é variável de acordo com o tecido de origem e das alterações genéticas/epigenéticas acumuladas. Na literatura, uma série de marcadores de membrana, citoplasmáticos e nucleares vêm sendo utilizados para

identificar as populações de células com um fenótipo “tronco” (5,7,13,50–53). Nas pesquisas, o ponto de partida para identificação dessa subpopulação são os próprios marcadores de células-tronco adultas, uma vez que sabemos que elas compartilham várias características.

Alguns desses marcadores podem ser identificados na maior parte dos tumores, enquanto outros são mais específicos para determinadas neoplasias (67). Pelo fato de não necessariamente possuírem o mesmo fenótipo, torna-se necessário caracterizar as populações de diferentes tipos de neoplasias que seguem o modelo da célula-tronco tumoral. No entanto, vale ressaltar que nenhum marcador ou conjunto de marcadores, até o presente momento, conseguiu definir qual é a verdadeira população de células-tronco tumorais dentro das células selecionadas (55).

A citometria de fluxo é apenas uma das estratégias para enriquecer a população de células-tronco tumorais derivadas de linhagens estabelecidas ou de tumores primários, mas tem suas limitações porque utiliza apenas marcadores de superfície. Outras estratégias incluem o ensaio do ALDEFLUOR, que se baseia na atividade enzimática do ALDH, e a formação de esferoides em placas com baixa aderência, geralmente com posterior confirmação que tais esferoides formados *in vitro* têm as propriedades desejadas (53). Marcadores nucleares, como o Sox2, Oct4 e Bmi1, não são utilizados para distinguir essas populações por limitações de metodologia. Porém, as expressões gênica e proteica desses marcadores são costumeiramente analisadas nas populações com fenótipo tronco que foram separadas.

Dentro dos vários marcadores disponíveis na literatura, abordaremos aqui os marcadores CD44, ALDH1 e p75NTR, por serem esses o escopo do presente trabalho.

2.3.3.1 CD44

CD44 (*cluster of differentiation 44*), também conhecido como H-CAM, compõe uma família de glicoproteínas transmembranas codificadas pelo gene *CD44*, que fica localizado em humanos no cromossomo 11. Essa família é composta de várias isoformas com heterogeneidade funcional, em parte atribuída ao *splicing* alternativo que os transcritos do gene sofrem (68). Esse receptor de superfície possui um domínio extracelular, um domínio transmembrana e um intracelular. No domínio extracelular existe uma região amino-terminal, comum a todas as isoformas, que funciona como um sítio de ligação para vários componentes da matriz extracelular. Esse domínio também possui uma região variável, que é bem curta na forma padrão da glicoproteína (CD44s), mas vai aumentando na dependência das isoformas (CD44v) que vão sendo produzidas (69).

O epítopo CD44 foi primeiro descoberto em leucócitos, mas logo foi identificado em vários outros tipos de células. O vermelhão do lábio, mucosa jugal, dorso e ventre lingual, assoalho, palato duro e gengiva têm forte expressão de CD44s, v3, v4-5, v6 e v9 na camada basal, suprabasal e espinhosa, sem demonstrar variação regional (70). A forma padrão parece ter ampla distribuição pelo corpo, enquanto que as isoformas variantes têm distribuição mais restrita, o que sugere que o processo de *splicing* alternativo é altamente regulado (71). No entanto, o *splicing*, que regula a inclusão ou exclusão de exons dos transcritos do gene, é em certo grau modificado por sinais oncogênicos. Assim, uma célula tumoral de um determinado tecido pode expressar isoformas do CD44 que sua contraparte normal não faria (69).

A molécula do CD44 tem uma plethora de funções, mesmo por conta de sua diversidade estrutural e da sua presença em diferentes tecidos. O CD44 participa da ativação de linfócitos, mielopoiese, linfopoiese e angiogênese, adesão intercelular dependente de hialuronato e interação com vários componentes da matriz extracelular, mas principalmente com o hialuronato. Além deste, o CD44 também atua como correceptor de vários outros ligantes e se liga a proteínas do citoesqueleto de actina (68,71). A interação do CD44 com o ácido hialurônico parece ser importante

para regular muitas vias de sinalização, que quando alteradas favorecem a progressão de tumores (72).

O interesse na pesquisa do câncer partiu da observação de que o aumento da expressão gênica do CD44 influi no prognóstico do paciente. Tanto o aumento da expressão do CD44s como das isoformas variantes, principalmente CD44v6, tem sido associada a um prognóstico ruim e à severidade da doença no câncer de estômago, ovário, pulmão, laringe e faringe (73–76), embora a associação com o câncer bucal não tenha sido clara (77). Além disso, várias pesquisas têm demonstrado que uma subpopulação de células CD44⁺ ou CD44^{high}, selecionadas por métodos experimentais, apresentam melhores propriedades tumorigênicas, assemelhando-se (ou mesmo sendo) às chamadas células-tronco tumorais (6,78,79). A utilização do CD44 como marcador no câncer de cabeça e pescoço, incluindo câncer bucal, será discutida posteriormente.

2.3.3.2 *ALDH1*

ALDH (Aldehyde dehydrogenase) compõe um grupo de 11 famílias e 4 subfamílias de enzimas, codificadas por pelo menos 19 genes conhecidos na espécie humana e localizados em cromossomos diferentes. Existem vários isotipos dessa enzima, com localização celular, distribuição tecidual e os níveis enzimáticos variáveis; porém, em comum elas possuem a função de catalisar a oxidação de aldeídos de fontes endógenas ou exógenas, transformando-os em ácido carboxílico. Além dessa função de detoxificação, especialmente as enzimas da família ALDH1 (ALDH1A1, ALDH1A2 e ALDH1A3) catalisam também a oxidação de retinol a ácido retinoico. O desequilíbrio na via de sinalização mediada pelo ácido retinoico e seus derivados pode levar à expressão de genes que favorecem a sobrevivência e proliferação celular. Por isso, o ALDH1 tem sido mais implicado no funcionamento tanto de células-tronco normais como de células-tronco tumorais (67,80).

A família do ALDH1 tem localização citoplasmática e tem ampla distribuição tecidual no fígado, rins, cérebro, pâncreas, pulmão, mama, ovário, próstata, músculo

esquelético, dentre outros (80). Em mucosa oral, pouco se conhece sobre sua localização e distribuição. Como ele é considerado um marcador de células-tronco normais em outros tecidos (8), esperar-se-ia que ele estivesse presente em ocasionais células na camada basal. Porém, não se pode afirmar isso porque em pouquíssimos trabalhos essa questão é levantada. Por exemplo, um trabalho verificou que, em mucosa do palato, não há expressão de ALDH1A1, enquanto que ALDH1A3 tem expressão citoplasmática nas camadas suprabasais, mas não na basal (81). Outro estudo utilizou a mucosa oral adjacente a uma área de tumor e verificou que a expressão de ALDH1 acontecia em camada basal e parabasal, sem dar mais detalhes sobre a extensão dessa marcação (82). Por isso, somando-se à escassez de trabalhos, temos ainda que considerar que existem diferenças regionais da mucosa oral e várias isoformas de ALDH1.

As pesquisas mostram que células do câncer que foram separadas com base na expressão de ALDH (ALDH^{high} ou ALDH⁺) demonstram mais propriedades tumorigênicas tanto *in vitro* como *in vivo* comparadas às células ALDH^{low} ou ALDH⁻ em diversos tipos de neoplasia (8,83,84). Pesquisas também apontam que há um enriquecimento de populações de células tumorais ALDH^{high} após tratamento *in vitro* com quimioterápicos, e que o ALDH confere proteção celular contra a ação de radicais livres gerados por tais drogas (85,86). Isso sugere que essa enzima pode estar intimamente relacionada à resistência às terapias anticâncer e recorrência do tumor (86). Além disso, o aumento da expressão de ALDH em tumores tem sido correlacionado com piores parâmetros clínicos e prognóstico ruim (87–89), inclusive no câncer de cabeça e pescoço (14). O somatório dessas evidências científicas atuais leva a crer que o ALDH, mais especificamente ALDH1, é um bom marcador para identificar as populações de células com fenótipo tronco tumoral em boa parte dos tumores sólidos.

2.3.3.3 *p75NTR*

A proteína p75NTR (p75 neurotrophin receptor), também chamada de receptor para o fator de crescimento neural (NGFR) ou CD271, é um receptor transmembrana que foi primeiro identificado em células neurais, de onde vem seu nome, mas que logo depois foi identificado em outros tipos de células. Seus principais ligantes são as neurotrofinas, incluindo o fator de crescimento neural e pró-neurotrofinas, que também não são exclusivamente produzidas por células neurais, como seu nome pode sugerir (90,91). A função desse receptor é bem variável e, por vezes, antagônica; em algumas células ele parece promover a sobrevivência e o crescimento, enquanto que em outros tipos ele favorece a apoptose. Tal variedade de funções pode estar na dependência do tipo de ligante e na atuação conjunta com outros receptores de membrana, como o TrkA (92).

O p75NTR também é um bom marcador para identificar células-tronco normais entre as células da crista neural e, mais recentemente, de células-tronco de alguns tecidos adultos, principalmente células-tronco mesenquimais (93). Porém, tecidos epiteliais, como o esôfago e mucosa oral também possuem células p75+ com propriedades tronco (94,95). O estudo de Nakamura et al. utilizou células obtidas a partir de amostras frescas de mucosa jugal e gengiva, e verificou a existência de grupos de células p75+ em localizações específicas da camada basal, principalmente no ápice das cristas epiteliais e na ponta das papilas conjuntivas. As células p75+ tinham maior expressão de integrina $\beta 1$ e ABCG2, proliferavam mais *in vitro* e formavam holoclones, propriedades atribuídas às células-tronco (95). Em estudos utilizando imunolocalização de proteínas, no entanto, a expressão de p75 em gengiva, língua e mucosa jugal envolveu toda a extensão da camada basal, e não apenas localizações específicas (96,97), distribuição semelhante à observada na epiderme (98).

Geralmente, parte-se de marcadores de células-tronco normais de um tecido específico para selecionar as populações de células-tronco tumorais. Em queratinócitos da mucosa oral, CD44 e ALDH1 não são marcadores específicos de células-tronco adultas, mas mesmo assim são usados com êxito para separar

populações tumorigênicas desses tecidos. Nesse sentido, p75NTR pode ser um marcador interessante para ser adicionado na análise das populações tumorais, uma vez que é específico da camada basal (composta por células progenitoras e células-tronco). O único estudo até o momento com esse marcador em câncer de cabeça e pescoço demonstrou que, dentro de uma população CD44+, existe uma subpopulação CD271+ que é bem mais tumorigênica que a subpopulação CD271- (9).

Poucos trabalhos avaliaram a expressão do p75NTR com relação ao prognóstico do paciente com câncer bucal, e os que fizeram encontraram uma associação entre a expressão de p75NTR e um prognóstico ruim, principalmente quando esta análise é combinada com o padrão de invasão do tumor (97,99). Esses resultados contrastam com outros tipos de câncer, como o de pâncreas, onde a expressão aumentada de p75NTR está relacionada a um prognóstico favorável (100). Ainda há muito a ser estudado sobre o papel do p75NTR e sua contribuição na seleção de células-tronco tumorais.

2.3.4 Marcadores de células-tronco tumorais no câncer intraoral e de pele

O carcinoma epidermoide de lábio surge a partir de queratinócitos da semimucosa que reveste o vermelhão do lábio, uma área de transição entre a pele e a mucosa. Essa localização o torna meio esquecido nas pesquisas, sendo que não há, por exemplo, linhagens estabelecidas desse carcinoma. Por isso mesmo nada se sabe sobre o fenótipo das células-tronco tumorais desse câncer (assumindo que, como a maioria dos carcinomas, essa neoplasia siga o modelo das células-tronco tumorais). A presente revisão de literatura, portanto, discutirá o que se sabe a respeito de marcadores de células-tronco tumorais do carcinoma epidermoide intraoral e do carcinoma epidermoide de pele, por serem as regiões que são contíguas ao vermelhão do lábio.

2.3.4.1 *Marcadores no câncer intraoral*

Na maior parte das pesquisas, o câncer intraoral está inserido na abrangente categoria de tumores de cabeça e pescoço, que inclui, por exemplo, câncer na tireoide, laringe e faringe (101). Portanto, deve-se analisar com cautela os resultados das pesquisas que levam no título “câncer de cabeça e pescoço”, porque algumas delas podem não se referir ao câncer bucal (102).

Em 2007, um grupo de pesquisa identificou pela primeira vez células com propriedades tronco no câncer de cabeça e pescoço, incluindo duas espécimes tumorais provenientes da língua, uma de assoalho bucal e uma de orofaringe (12). Em todos esses tumores foram identificadas, por citometria de fluxo, duas populações de células com diferentes potenciais tumorigênicos, CD44⁺ e CD44⁻. A subpopulação CD44⁺ foi a única capaz de formar tumores em camundongos, mesmo com a inoculação de poucas células. Além disso, as células CD44⁺ apresentaram altos níveis proteicos e de RNAm de Bmi1 em comparação às células CD44⁻. A expressão de Bmi1, importante marcador de autorrenovação, foi inclusive maior do que em células embrionárias humanas usadas como controle (12).

A partir de então, o CD44 ganhou visibilidade como marcador no câncer de cabeça e pescoço. No entanto, a adição de outros marcadores a uma população CD44⁺ ou CD44^{high}, ao invés de usá-lo como marcador único, parece ser capaz de selecionar ainda melhor as células com fenótipo tronco tumoral. Por exemplo, Kaseb et al. combinaram uma subpopulação CD44 com o marcador de diferenciação epitelial CD166 (103). A combinação de marcadores mais reportada na literatura é do CD44 com o ALDH1 (104–107).

Clay et al. observaram que as células com alta expressão de ALDH1 (ALDH^{high}) também coexpressavam CD44. Contrariamente, quando células eram separadas com base no marcador de superfície CD44, somente uma menor proporção delas apresentava alta atividade de ALDH. O trabalho então concluiu que dentro da subpopulação de células CD44⁺ deve existir tanto células tumorigênicas, que coexpressam ALDH, como não-tumorigênicas e, logo, a combinação desses dois marcadores seria mais eficaz (105).

Tal conclusão pode ser endossada no trabalho de Chen et al., que separou duas populações de células: CD44+/CD24-/ALDH+ e CD44+/CD24-/ALDH-. As células ALDH+ foram mais tumorigênicas tanto *in vitro* como *in vivo*, além de apresentarem aumento da regulação de genes implicados na manutenção da programação “tronco” (Oct-4, Nanog, Sox2, Klf4, bmi1), radiorresistência (MDR-1, MRP-1 e ABCG2) e transição epitélio-mesenquimal (Snail). Assim, o estudo mostrou que dentro de uma população sabidamente positiva para o CD44, a subpopulação com maior atividade de ALDH tem células com melhores propriedades de uma célula-tronco tumoral e, talvez por isso, CD44 isoladamente não seria um bom marcador (108).

Além desse, outro estudo observou que populações CD44^{high}ALDH^{high} proliferavam menos e tinham mais características de células mesenquimais, como alta expressão de vimentina, baixa expressão de E-caderina, e alta expressão de Snail. Já as células CD44^{high}ALDH^{low} proliferavam mais, tinham mais características de células epiteliais e a via do EGFR estava mais ativa (107). Esses resultados, juntamente com o de outros estudos, sugerem a existência de pelo menos dois fenótipos tronco tumorais que coexistem, com parte das células apresentando características de transição epitélio-mesenquimal e outra parte não. Mais ainda, sugere-se que esses dois fenótipos podem ser intercambiáveis, isto é, células-tronco com características epiteliais podem se tornar mais semelhantes às mesenquimais, e vice-versa (109,110).

Nem mesmo há consenso se o CD44 é um marcador confiável de células-tronco em cabeça e pescoço. O trabalho de Oh et al. não encontrou diferenças significativas em relação à quimiorresistência, expressão de marcadores tronco e formação de tumores quando comparou populações CD44+ e CD44- (111). Apesar desse único resultado contrastante e dos poucos trabalhos sobre esse assunto, atualmente o CD44, principalmente quando é combinado com outro marcador, parece ser eficaz em isolar as populações tumorigênicas desse tipo de neoplasia.

O CD133 também pode ser útil nesse sentido. O trabalho de Zhang et al. mostrou que células CD133+ derivadas de linhagens de câncer bucal são mais tumorigênicas *in vitro* e *in vivo* que as CD133-, além de expressarem mais Oct-4,

hTERT, Nanog e ABCG2 (10). No estudo, no entanto, não foi relatado se tais células também coexpressam CD44 ou possuem alta atividade de ALDH.

2.3.4.2 Marcadores no câncer de pele

Existem poucos trabalhos sobre células-tronco tumorais no câncer de pele não-melanoma, mais especificamente no carcinoma epidermoide de pele. O estudo de Biddle et al. mostrou que as populações com alta expressão de CD44, tanto a CD44^{high}ESA^{low} como a CD44^{high}ESA^{high}, são ambas tumorigênicas e capazes de recapitular a heterogeneidade do tumor original *in vivo*, requisitos para a candidatura de uma célula-tronco tumoral (110). Esse estudo mostrou que existem pelo menos dois fenótipos biologicamente distintos que coexistem no tumor, sendo um fenótipo epitelial, com células mais proliferativas, (CD44^{high}ESA^{high}), e o outro com células que passaram por transição epitélio-mesenquimal (CD44^{high}ESA^{low}). Mais interessante ainda, a habilidade de realizar a transição mesenquimal-epitelial está restrita às células que têm alta atividade de ALDH (110).

Em outro estudo, dessa vez utilizando amostras de tumores frescos, não foi encontrada expressão de CD44 nas células tumorais. Nas projeções dos tumores, especialmente na camada basal, foram detectadas CD71+ e, em meio a essas células, existia uma subpopulação que também coexpressava CD133. As células dessa subpopulação CD133+ cumpriam todos os requisitos para serem células-tronco tumorais, ou como os autores preferiram chamar, células iniciadoras de tumor e, portanto, o CD133 pode ser um marcador interessante no carcinoma epidermoide de pele (112). O método de dissociação de células, como tripsina mais collagenase ou só collagenase, pode reduzir a quantidade de células CD44+ detectadas em amostras tumorais (113). Embora esse estudo não tenha usado nenhum desses dois métodos, pode ser que outros métodos tenham influência nessa detecção.

A formação de esferoides em placas de baixa de aderência é uma outra estratégia para selecionar células com melhor potencial tumorigênico. No trabalho de Adhikary et al., esses esferoides tinham maior expressão de células ALDH+ comparadas às células em meio de cultura convencional. Quando esses esferoides foram separados por citometria de fluxo com base na utilização do marcador ALDH, verificou-se que as células ALDH+ formavam 60 vezes mais esferoides em cultura do que as células ALDH-. Interessantemente, a formação de esferoides nessas condições seleciona células com maior expressão de marcadores de células-tronco adultas da epiderme, tanto de células-tronco da região da epiderme interfolicular (integrina $\alpha 6$) como do folículo piloso (CD100, K15 e K19) (114).

3 PROPOSIÇÃO

Analisar a expressão imuno-histoquímica de conhecidos marcadores de células-tronco tumorais em queilite actínica (QA) com diversos graus de displasia e em carcinoma epidermoide de lábio (CEL) e comparar à expressão imuno-histoquímica de p53, proteína que frequentemente está mutada no processo de fotocarcinogênese.

3.1 PROPOSIÇÕES ESPECÍFICAS

- 1) Avaliar a presença e o padrão de marcação de CD44, ALDH1, p75NTR e p53 em casos de QA subdivididos de acordo com o grau de displasia (leve=QD, moderada=QM, intensa=QI) e CEL, comparando com a expressão do epitélio do vermelhão do lábio com aspecto de normalidade (LN).
- 2) Avaliar a quantidade de células marcadas para cada um dos anticorpos, a fim de verificar se há aumento ou diminuição de células positivas com a progressão de LN para QA e CEL.
- 3) Correlacionar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores de células-tronco tumorais entre si e com a expressão da proteína p53 nos mesmo casos analisad

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DE CASOS

O estudo obteve a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP (Anexo A). Para a realização do mesmo, foram selecionados um total de 67 espécimes, oriundos do vermelhão do lábio, a partir dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. Desses, 43 casos receberam diagnóstico histopatológico de “queilite actínica” (QA), e 20 casos de “carcinoma epidermoide” (CEL). Além desses, 4 espécimes de outras lesões em vermelhão de lábio (fibroma e hemangioma), que apresentavam fragmento de epitélio pavimentoso estratificado ortoqueratinizado, característico da zona de vermelhão de lábio normal, foram selecionados para constituir o grupo controle do estudo (LN). Todos os casos de QA e CEL selecionados exibiam faixa de degeneração basofílica das fibras elásticas e colágenas (elastose solar), que demonstra a ação da radiação UV sobre os tecidos. Além disso, apenas espécimes contendo material suficiente fixado em formol e emblocado em parafina

4.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA

Lâminas coradas em hematoxilina e eosina referentes a cada um dos casos foram analisadas em microscópio de luz para confirmação do diagnóstico e, nos casos de QA, para a classificação do grau de displasia epitelial. Essa foi realizada baseada nos critérios arquiteturais e citológicos propostos pela Organização Mundial da Saúde em 2005. Os casos de QA foram classificados nas seguintes categorias:

- Displasia epitelial discreta: alterações arquiteturais limitadas ao terço inferior do epitélio, acompanhado de mínima atipia citológica;
- Displasia epitelial moderada: alterações arquiteturais se estendendo ao terço médio do epitélio. Presença de atipia citológica a níveis consideráveis. O maior número de atipias citológicas pode aumentar o grau de displasia;
- Displasia epitelial intensa: alterações arquiteturais em mais de dois terços do epitélio associadas e presença marcante de atipias citológicas.

4.3 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Para cada caso selecionado foi realizada reação imuno-histoquímica utilizando os anticorpos anti-CD44 (clone 156-3C11, Cell Signal, Denver, MA, USA), anti-ALDH1 (clone 44/ALDH1, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA), anti-p75NTR (clone D4B3, Cell Signal, Denver, MA, USA) e anti-p53 (clone DO-7, Dako, Carpinteria, CA, USA).

A partir do material embocado em parafina, foram feitos cortes de 3 micrômetros de espessura estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas pelo 3-aminopropiltrietoxissilano para aumento da adesividade do corte. Os cortes seguiram para desparafinização em dois banhos de xilol, sendo o primeiro por 30 minutos e o por 15 minutos, ambos a temperatura ambiente. A seguir, foi feita reidratação em cadeia descendente de etanóis, passando imediatamente para a remoção do pigmento formólico pela incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica, por 10 minutos. Após lavagem em água destilada, as lâminas receberam os tratamentos de recuperação dos sítios antigênicos sempre imersos em banho aquecido a 95°C por 30 minutos. Para os anticorpos anti-CD44, ALDH1 e p75NTR o tratamento utilizou solução de citrato (10mM), pH6,0 e para o anticorpo anti-p53 a solução de Tris (50mM) e EDTA (1mM), pH 9,0.

Após o tratamento, os cortes foram novamente lavados em água destilada e seguiram para a etapa de eliminação da peroxidase endógena tecidual, que se constitui pela incubação em dois banhos, de 15 minutos cada, em uma solução 1:1 (v/v) de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol. Repetida a lavagem em água destilada, os cortes foram imersos em solução salina de Tris (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) pH 7,6 (TBS), solução tampão da reação, em três banhos de 5 minutos cada. Previamente à incubação do anticorpo primário, realizou-se etapa de bloqueio com soro de cabra a 10% diluído em albumina sérica bovina (BSA) nos cortes que seriam submetidos aos anticorpos anti-ALDH1 e CD44. Seguiu-se a incubação do anticorpo primário, diluído em TBS acrescido de BSA (CD44 1:700; ALDH1 1:300; p75NTR e p53 1:100), por um período de 14h (ALDH e CD44) e 16h (p75NTR e p53) a 4 °C em câmara úmida.

O sistema de amplificação utilizado foi o do polímero marcado pelo kit Envision (DAKO, Carpinteria, CA, USA) conforme especificações do fabricante. As reações foram reveladas pela diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468) em incubação de 10 minutos e, após lavagem em TBS e água deionizada, para remoção de excessos, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer. Após nova lavagem, os cortes foram desidratados em cadeia crescente de etanóis, diafanizados em xilol, montados em resina para microscopia e examinados em microscópio de luz.

4.4 ANÁLISE DOS RESULTADOS DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

A análise para o CD44 foi realizada de forma semiquantitativa por dois avaliadores, dividindo os casos de acordo com o padrão de marcação membranosa: marcação preservada e marcação reduzida. Nos casos de QA, foi considerada marcação preservada quando a reação acontecia em todas as camadas do epitélio, exceto granulosa e córnea. Foi considerada marcação reduzida quando a reação não ocorria em todas as camadas. Nos casos de CEL, foi considerada marcação

preservada quando 75% ou mais de células eram positivas e reduzida quando menos de 75% de células eram positivas.

A análise para os demais anticorpos foi realizada de forma quantitativa, contando-se o número de células positivas em quatro campos microscópicos com expressão mais significativa em um aumento de 400x. Para isso, foram obtidas imagens digitais com auxílio de microscópio de luz (Axio Imager A2, Zeiss, Oberkochen, Germany) com uma câmera digital acoplada (Axio Cam HRc-Zeiss®) e do software de aquisição de imagens Axio Vision (Zeiss). As células positivas foram contadas com o auxílio do software ImageJ (ImageJ para windows, versão 1.6.0., 64 bit Java). Para o ALDH1, foram contadas as células com marcação no citoplasma; para o p75NTR, as células com marcação membranosa/citoplasmática foram consideradas como positivas; e para o p53, foram contadas as células que apresentaram coloração acastanhada no núcleo.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

No grupo de QA, a expressão das proteínas foi primeiramente comparada entre os graus de displasia epitelial (leve=QD, moderada=QM, intensa=QI). Depois, o grupo de QA total (somatório de todos os casos de displasia epitelial) foi usado para comparação com a expressão nos casos de CEL. Para fins estatísticos, o grupo LN não foi utilizado pela pouca quantidade de casos selecionados.

Após a coleta dos dados, os mesmos foram organizados em um banco de dados informatizado com o auxílio dos programas estatísticos SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 20.0 e GraphPad Prism 7 e submetidos inicialmente à análise descritiva. As variáveis qualitativas foram apresentadas na forma de frequências absolutas e relativas e as variáveis quantitativas em forma de média ou mediana e desvio padrão. Os dados mostraram distribuição não-Gaussiana, de acordo com o teste de normalidade de D'Agostino Pearson. Para comparar a imunoexpressão das proteínas entre as variáveis, os dados foram submetidos aos testes estatísticos Kruskal-Wallis, Mann-Whitney e Exato de Fisher. Para correlacionar

a imunoexpressão das proteínas entre si, os dados foram submetidos ao teste de correlação de Spearman. Foi adotado nível de significância de 5% para todos os testes, sendo considerados significativos os valores de $p \leq 0.05$.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra consistiu de 67 espécimes localizados em vermelhão do lábio inferior, sendo 72% homens e 28% mulheres com uma média de idade de $61,26 \pm 12,75$ (média $\pm$ desvio padrão) no momento do diagnóstico. Dos casos de queilite actínica (QA) ($n=43$), 72% eram homens e 28% mulheres com uma média de idade de $60,41 \pm 12,44$ (média $\pm$ desvio padrão), variando de 25 a 83 anos; dos casos de carcinoma epidermoide de lábio (CEL) ($n=20$), 75% eram homens e 25% mulheres com uma média de idade de $63,35 \pm 14,46$ (média $\pm$ desvio padrão), variando de 29 a 85 anos; dos espécimes de lábio normal (LN) ($n=4$), 50% eram homens e 50% mulheres com uma média de idade de $60,75 \pm 9,39$ (média $\pm$ desvio padrão), variando de 52 a 73 anos. O grupo de QA foi composto por 13 casos com displasia epitelial intensa (QI), 15 casos com displasia moderada (QM) e 15 casos com displasia discreta (QD).

5.2 CD44

Todos os 67 casos estudados foram positivos para o marcador CD44, com imunoexpressão membranosa apenas. Em LN e QA, a marcação geralmente ocorria em todas as camadas do epitélio, excluindo as camadas queratinizadas (Figura 5.1 A, E, I). Não houve diferenças na expressão de CD44 entre os graus de displasia epitelial, pois apenas um caso (2,4%) apresentou marcação reduzida (Figura 5.1 M). Este caso pertencia à categoria de QI (Tabela 5.1).

Em todas as áreas de invasão e ilhas dos casos de CEL, notou-se positividade membranosa nas células (Figura 5.1 Q), com 85% dos casos apresentando marcação preservada e 15% demonstrando marcação reduzida. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o padrão de marcação de QA e CEL ($p=0,09$) (Tabela 5.2).

5.3 ALDH1

A imunolocalização do ALDH1 foi exclusivamente citoplasmática em QA e CEL. Nenhum caso de LN foi positivo para o marcador (Figura 5.1 B).

No grupo QA a positividade geralmente ocorria na camada basal, na forma de células isoladas ao longo dessa camada (Figura 5.1 F). Ocasionalmente, observou-se também células positivas nas camadas mais altas do epitélio (Figura 5.1 N). Em poucos casos notaram-se células positivas contíguas formando uma extensa zona de marcação, às vezes se estendendo desde a basal até a camada granulosa (Figura 5.1 J). No grupo QA, 51,1 % dos casos foram positivos. Para investigar se há aumento de expressão de ALDH1 com o avanço da displasia, as células positivas foram contadas. A quantidade de células positivas variou bastante entre as displasias, com muitos negativos, outros com um número reduzido de células positivas e outros poucos com uma grande quantidade de células positivas (Tabela 5.1). O valor médio do número de células positivas foi maior no grupo de QM, porém esse foi o que apresentou maior amplitude na distribuição dos dados. Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de ALDH1 entre os graus de displasia ($p=0,37$) (Figura 5.2).

No CEL, 55% dos casos foram positivos. Não foi observado um padrão específico de marcação, pois alguns casos foram positivos na camada basal, outros nas regiões mais centrais das ilhas (Figura 5.1 R), ou uma combinação de ambos, às vezes adjacentes à formação de uma pérola córnea. Geralmente, a positividade estava restrita a algumas células isoladas, distantes uma das outras, com raros casos em que havia formação de uma extensa zona de marcação. O grupo de CEL apresentou maior variação na distribuição dos dados em comparação ao grupo de

QA. Não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão de ALDH em QA e CEL ($p=0,9$) (Figura 5.3).

Comparando-se todos os grupos, observou-se um aumento do número de casos positivos de acordo com o aumento na severidade da doença (Tabela 5.1).

5.4 p75NTR

No grupo de QA, 95,3 % dos casos foram positivos para o marcador p75NTR. Em LN e QA, a localização do p75 era principalmente membranosa acompanhada de marcação citoplasmática, embora marcação exclusivamente membranosa tenha sido observada em alguns casos. Geralmente, a marcação em LN e QA ocorria concomitantemente em camada basal de forma contínua e, em um número variável de células da camada parabasal (Figura 5.1 C, G, K, O).

Poucos casos mostraram marcação exclusivamente limitada à camada basal. Quando ocorria hiperplasia desta camada, a marcação se estendia para células acima da basal (Figura 5.1 O). Isso ocorreu em um caso de QD, 4 casos de QM e 5 casos de QI. Ocasionalmente, células da camada espinhosa também foram positivas, sempre adjacentes à área de marcação basal e parabasal. Para verificar se há aumento da expressão com o aumento do grau da displasia, as células positivas foram contadas. Foi observado que a quantidade de células positivas aumentou com o aumento na severidade da displasia epitelial, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p<0,001$) (Figura 5.4).

Nos casos de CEL, 80% dos casos foram positivos e 20% negativos nas ilhas e áreas de invasão tumoral, notando-se positividade no controle interno e epitélio adjacente. Dos casos positivos, 50% apresentaram marcação em todas ou quase todas as áreas de invasão, principalmente na região periférica (Figura 5.1 S), enquanto que os outros 50% apresentaram marcação focal, também geralmente nas

células periféricas. A marcação era predominantemente citoplasmática (Figura 5.1 S) e, em alguns casos, notou-se também positividade nuclear (que não foi considerada para fins de contagem). Foram contadas as células positivas nas áreas mais significativas de marcação. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão de p75NRT em relação à QA ($p=0,4$) (Figura 5.5).

Avaliando-se todos os grupos do estudo, observou-se um aumento do número de casos negativos com a progressão da doença (Tabela 5.1).

5.5 p53

Todos os espécimes de LN e QA tiveram positividade nuclear para p53 (Tabela 5.1). Em casos de LN, a marcação para o p53 foi restrita à camada basal e parabasal apenas, com poucas células positivas (Figura 5.1 D). Já em quase todos os casos de QA, independente do grau de displasia, notava-se que a marcação envolvia células na camada basal, parabasal e espinhosa (Figura 5.1 H, L, P) diferindo na quantidade de células marcadas. Observou-se uma tendência de maior positividade celular com o aumento no grau de displasia epitelial, porém não houve diferença estatisticamente significativa ($p=0,33$) (Tabela 5.3).

Nos casos de CEL, 80% dos casos foram positivos e 20% negativos nas ilhas tumorais avaliadas, embora o epitélio adjacente à invasão fosse positivo. Não foi observado um padrão específico de marcação; algumas ilhas eram quase completamente positivas (Figura 5.1 T), enquanto que em outros casos havia marcação predominante em células periféricas. Também se observou uma tendência de maior expressão de p53 no CEL quando comparado à QA, porém essa relação não foi estatisticamente significativa ($p=0,24$) (Figura 5.6).

Figura 5.1 - Expressão imuno-histoquímica representativa de CD44, ALDH1, p75NTR e p53 em LN, QA e CEL (400x) (Barra=50 μ m). CD44 tem expressão membranosa semelhante, independentemente do grau de displasia (A, E, I, Q). Um caso de QI teve expressão reduzida (M). ALDH1 não é expresso em LN (B) e geralmente marca poucas células em QA e CEL (cabeça de seta aponta as células positivas) (F, N, R). Ocasionalmente, uma extensa zona de marcação era vista (J). P75NTR marca camada basal e parabasal (C, G, K), às vezes se estendendo camadas acima (O). Padrão de células periféricas marcadas no CEL (S). P53 aumenta a expressão nuclear de LN até QI (D, H, L, P). Padrão de marcação em quase todas as células da ilhas tumorais (T)

Tabela 5.1 - Percentual de casos positivos de LN, QA (displasia leve=QD; displasia moderada=QM; displasia intensa=QI) e CEL, sem considerar a quantidade de células marcadas

	CD44 n (%)	ALDH1 n (%)	p75NTR n (%)	p53 n (%)
LN	4 (100)	0 (0)	4 (100)	4 (100)
QD	15 (100)	6 (40)	15 (100)	15 (100)
QM	15 (100)	10 (66,7)	15 (100)	15 (100)
QI	13 (100)	6 (46,1)	11 (84,6)	13 (100)
QA total	43 (100)	22 (51,1)	41 (95,3)	43 (100)
CEL	20 (100)	11 (55)	16 (80)	16 (80)

Tabela 5.2 - Associação entre a imunoexpressão de CD44 em QA e CEL

CD44	Marcação reduzida	Marcação preservada	p*
QA	1 (2,4%)	41 (97,6%)	0,09
CEL	3 (15%)	17 (85%)	

* Teste exato de Fisher

Figura 5.2 - Número de células positivas para ALDH1 (percentis 5% a 95%) entre os graus de displasia epitelial (p=0,37, Teste de Kruskal-Wallis)

Figura 5.3 - Número de células positivas para ALDH1 (percentis 5% a 95%) entre QA e CEL ($p=0,9$, Teste de Mann-Whitney)

Figura 5.4 - Número de células positivas para p75NTR (percentis 5% a 95%) entre os grupos de displasia epitelial ($p<0,001$, Teste de Kruskal-Wallis)

Figura 5.5 - Número de células positivas para p75NTR (mínimo ao máximo) entre QA e CEL
($p=0,4$, Teste de Mann-Whitney)

Figura 5.6 - Número de células positivas para p53 (percentis 5% a 95%) entre QA e CEL
($p=0,24$, Teste de Mann-Whitney)

5.6 COMPARAÇÃO ENTRE A IMUNOMARCAÇÃO DE p53 E OS MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

Quando a média de células positivas de p53 foi comparada à média de p75NTR, observou-se que ambas possuíam valores aproximados tanto nos casos de QA como nos de CEL, porém essas associações não foram estatisticamente significativas. ($p=0,88$ e $p=0,36$, respectivamente) (Tabela 5.4 e 5.5, respectivamente). Não foi possível realizar a comparação da média entre p53 e ALDH1.

5.7 CORRELAÇÃO ENTRE OS MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

Para analisar a correlação dos marcadores CD44, ALDH1 e p75NTR entre si, o coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado. Para isso, a média de células positivas do ALDH1 e p75NTR foi calculada para cada grupo de QA e CEL. Os casos que ficaram abaixo da média foram considerados como de “baixa expressão” e os que ficaram acima da média como “alta expressão”.

Tanto em QA como em CEL não houve correlação significativa entre os marcadores (Tabela 5.6 e 5.7, respectivamente).

5.8 CORRELAÇÃO ENTRE p53 E OS MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

Para analisar a correlação entre p53 e CD44, ALDH1 e p75NTR , o coeficiente de correlação de Spearman foi utilizado. Para isso, a média de células positivas do p53 foi calculada para cada grupo de QA e CEL. Os casos que ficaram abaixo da média foram considerados como de “baixa expressão” e os que ficaram acima da média como “alta expressão”.

Tanto em QA como em CEL não houve correlação significativa entre os marcadores (Tabela 5.8 e 5.9, respectivamente).

Tabela 5.3 - Imunomarcção de p53 nos graus de displasia epitelial (displasia leve=QD; displasia moderada=QM; displasia intensa=QI)

p53	Mediana	Média $\pm$ desvio padrão	Intervalo de confiança (95%)	p*
QD	329	347,6 $\pm$ 181,2	247,2 – 447,9	0,33
QM	319	384,4 $\pm$ 255,10	243,1 – 525,7	
QI	569	604,7 $\pm$ 461,6	325,7 – 883,66	

* Teste de Kruskal Wallis

Tabela 5.4 - Comparação entre a imunomarcção para p53 e p75NTR em QA

QA	Mediana	Média $\pm$ desvio padrão	Intervalo de confiança (95%)	U de Mann-Whitney	p*
p53	363	438,2 $\pm$ 325,7	337,9 – 538,4	908	0,88
p75NTR	350	404,1 $\pm$ 247,4	327,9 – 480,2		

* Teste de Mann-Whitney

Tabela 5.5 - Comparação entre a imunomarcção para p53 e p75NTR em CEL

CEL	Mediana	Média $\pm$ desvio padrão	Intervalo de confiança (95%)	U de Mann-Whitney	p*
p53	723	623,9 $\pm$ 490,4	394,4 – 853,4	166	0,36
p75NTR	431.5	466,9 $\pm$ 383,4	287,4 – 646,4		

* Teste de Mann-Whitney

Tabela 5.6 – Correlação entre CD44, ALDH1 e p75NTR em QA (Correlação de Spearman)

Imunomarcacão em QA		CD44	ALDH	p75NTR
CD44	ρ de Spearman	--	0,05	0,10
	p	--	0,71	0,51
ALDH1	ρ de Spearman	0,05	--	-0,08
	p	0,71	--	0,58
p75NTR	ρ de Spearman	0,10	-0,08	--
	p	0,51	0,58	--

Tabela 5.7 - Correlação entre CD44, ALDH1 e p75NTR em CEL (Correlação de Spearman)

Imunomarcacão em CEL		CD44	ALDH	p75NTR
CD44	ρ de Spearman	--	0,21	-0,09
	p	--	0,37	0,67
ALDH1	ρ de Spearman	0,21	--	-0,30
	p	0,37	--	0,19
p75NTR	ρ de Spearman	0,21	-0,30	--
	p	0,67	0,19	--

Tabela 5.8 - Correlação entre p53 e CD44, ALDH1 e p75NTR em QA (Correlação de Spearman)

Imunomarcacão em Queilite Actínica		CD44	p75NTR	ALDH
p53	ρ de Spearman	-0,17	0,28	-0,08
	p	0,26	0,06	0,57

Tabela 5.9 - Correlação entre p53 e CD44, ALDH1 e p75NTR em CEL (Correlação de Spearman)

Imunomarcacão em CEL		CD44	p75NTR	ALDH
p53	ρ de Spearman	0,18	0,19	0,20
	p	0,44	0,41	0,39

6 DISCUSSÃO

Esse é o primeiro estudo a demonstrar a expressão imuno-histoquímica de CD44, ALDH1 e p75NTR em lábio normal (LN), na lesão potencialmente maligna de lábio queilite actínica (QA) e em carcinoma epidermoide de lábio (CEL). Tais marcadores, especialmente o CD44 e o ALDH1, são comumente utilizados na separação de frações de células com melhores propriedades tumorigênicas tanto *in vitro* como *in vivo* (103,106,107). Essas subpopulações separadas, imputadas como sendo as células-tronco tumorais, têm sido responsabilizadas pela recidiva tumoral e resistência ao tratamento de cânceres (4,57,115,116).

O CD44 foi positivo em todos os casos da amostra, exibindo um padrão de marcação praticamente invariável entre os grupos. Em mucosa oral normal, leucoplasia e carcinoma intraoral, a expressão da forma padrão da proteína (CD44s), bem como de algumas isoformas variantes (CD44v), é semelhante aos achados do nosso estudo para LN, QA e CEL (117,118). Mesmo em casos de carcinomas indiferenciados, a expressão de CD44 se mantém em um elevado número de células (117). Em pele normal, queratose actínica e carcinoma epidermoide de pele, a expressão de CD44 também parece ser invariável (119,120). Portanto, o CD44 marca amplamente células epiteliais normais e sua expressão persiste quando esse epitélio se transforma em uma lesão potencialmente maligna e, posteriormente, persiste na lesão maligna, não importando se esse epitélio é proveniente de vermelhão do lábio, mucosa oral ou pele.

Se a premissa básica para ser um marcador de célula-tronco tumoral é ter sua expressão restrita a uma pequena subpopulação de células, o CD44 parece não cumprir esse requisito. Curiosamente, no entanto, este tem sido utilizado como um dos principais marcadores de células-tronco tumorais no câncer de cabeça e pescoço (104,106,107,110,121). A utilização desse marcador geralmente produz resultados mais satisfatórios quando combinada à utilização de outros anticorpos, como o CD24, CD66, ESA e ALDH1, o que parece selecionar melhor células com fenótipo “tronco” tumoral (104,107,110,121). Sua utilização isolada é capaz de formar tumores, mas

apenas quando um alto número de células é injetado em camundongos, indicando que as populações separadas só por esse marcador não são puras (12). Nem todas as células positivas da ilha tumoral serão igualmente tumorigênicas; mesmo assim, existe uma enorme discrepância na quantidade de células marcadas por imunohistoquímica e na quantidade de células caracterizadas por citometria de fluxo.

Essa aparente contradição pode ser em parte explicada pelos próprios métodos utilizados na detecção do CD44. É preciso lembrar que a maioria dos trabalhos que separam as populações de células-tronco utilizam anticorpos que reconhecem a forma padrão (CD44s) e todas as isoformas de CD44 indiscriminadamente (12,106,107). O método enzimático utilizado para dissociar as células em cultura e tumores frescos pode destruir algumas isoformas de CD44 da superfície das células (113). Isso acabaria mudando, de forma não intencional, o perfil das células selecionadas com fenótipo “tronco”, talvez mais tumorigênicas, além de diminuir numericamente a quantidade de células CD44+ (113). Na imunohistoquímica, contrariamente, a expressão conjunta de todas as isoformas de CD44 permanece inalterada, o que explicaria a expressão difusa desse marcador.

Tal qual esses trabalhos, o presente estudo também utilizou um anticorpo dirigido contra uma região comum a todas as formas de CD44. Partindo desse ponto, outra questão também merece consideração. Pelas próprias características do anticorpo usado, é impossível saber se existem mudanças no perfil de expressão das isoformas variantes na transição de LN para QA e CEL. Muito provavelmente, à semelhança de outros tumores, os casos de CEL expressem múltiplas isoformas simultaneamente, que podem ter sentidos biológicos diferentes na progressão de uma neoplasia (117,122,123). Seria interessante, portanto, utilizar anticorpos mais específicos a fim de verificar as possíveis alterações no padrão de marcação das isoformas variantes durante a progressão da lesão.

Diferente do CD44, na amostra deste estudo, observou-se um ganho na expressão de ALDH1, uma vez que todos os casos de LN foram negativos enquanto que 51,1 % e 55% dos casos de QA e CEL, respectivamente, foram positivos. É importante saber a expressão normal do marcador pois, em muitos tecidos adultos, o ALDH1 é considerado como marcador de células-tronco normais (124), o que não parece ser o caso em vermelhão do lábio. A epiderme também não expressa ALDH1,

observando-se células positivas somente na região dos anexos cutâneos (125). Em mucosa oral normal, os poucos trabalhos que avaliaram a expressão de ALDH1 trazem resultados conflitantes em relação à positividade do marcador, padrão de marcação e, geralmente, também não especificam qual a região da mucosa foi analisada (81,82,126,127).

Entre os casos positivos de QA, observou-se uma tendência de marcação em poucas e isoladas células, em especial, mas não exclusivamente, na camada basal. Apesar dessa tendência e do valor médio de células positivas ter sido baixo em todas os graus de displasia, é possível notar que a amostra apresentou grande variabilidade na quantidade de células positivas dentro dos grupos, não sendo possível observar uma diferença estatisticamente significativa na expressão de ALDH1 com a progressão da lesão. Um estudo anterior avaliou a expressão de ALDH1 em lesões potencialmente malignas intraorais e mostrou que, diferente dos nossos resultados, existe uma tendência a maior expressão de ALDH1 com o aumento na severidade do grau da displasia (126). Outros estudos mostram que o risco de transformação maligna aumenta quando a lesão potencialmente maligna (leucoplasia e eritroplasia) é positiva para ALDH1, independente da quantidade de células marcadas (127–129). Esse risco de transformação é melhor predito quando se considera a marcação positiva de ALDH1 ao invés da gradação histológica (127,128).

No CEL, observa-se a mesma tendência de marcação da QA. Mesmo nos poucos casos que fogem a esse padrão, a expressão de ALDH1 é sempre focal, limitada a poucas ilhas tumorais. O fato do ALDH1 ter expressão confinada a algumas células conta pontos a favor desse marcador ser considerado como marcador de célula-tronco tumoral. Corroborando com isso, estudos em vários tipos de câncer, incluindo câncer de cabeça e pescoço, mostram que células com alta atividade de ALDH (ALDH^{high} ou ALDH+) existem como uma pequena subpopulação dentro do tumor, sendo altamente tumorigênicas quando comparadas à maioria das células que têm baixa expressão de ALDH (ALDH^{low} ou ALDH-) (8,83,84,104,106,107).

A alta expressão de ALDH nas células ajuda a conferir resistência a drogas quimioterápicas (86). Além disso, as células ALDH+ têm expressão aumentada de genes relacionados à manutenção da programação “tronco”, radiorresistência e

transição epitélio-mesenquimal (104). Atualmente, sabe-se que existem pelo menos dois fenótipos de células-tronco tumorais biologicamente distintos, coexistindo dentro do tumor: um fenótipo mais proliferativo e outro com mais características de transição epitélio-mesênquima (109,110). As células ALDH+ no câncer de cabeça e pescoço possuem mais características de células mesenquimais e, comparativamente, proliferam menos que as células ALDH- (107). Apesar desses fenótipos serem intercambiáveis, a capacidade de fazer a transição mesenquimal-epitelial parece estar restrita às células ALDH+ (110).

A expressão imuno-histoquímica de ALDH1 está relacionada a um pior prognóstico em pacientes com diversos tipos de câncer (87–89). Em uma recente e única meta-análise em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço, a expressão de ALDH1 se correlacionou positivamente com o grau histológico do tumor, metástase linfonodal e com diminuição na sobrevida livre de doença (14). Pela análise dos artigos avaliados, fica claro que é preciso definir melhor o que significa expressão positiva ou alta/baixa expressão. Por exemplo, há trabalhos que consideraram como negativos casos com até 10% de células marcadas, enquanto outros consideraram apenas aqueles com ausência de células positivas (14). Esse tipo de heterogeneidade nos critérios de seleção da amostra, comum nas pesquisas científicas, pode atrapalhar na interpretação do significado clínico dessa proteína. Será que 1% de células positivas teria o mesmo significado de 25% de células positivas?

Na amostra do presente estudo, quase todos os casos de câncer eram bem diferenciados, pois, devido à localização, geralmente as lesões em lábio são mais rapidamente identificadas em um estágio precoce. Dessa forma, não conseguimos tirar conclusões se casos de CEL grau 3 expressariam mais ALDH1 que os de grau 1 e 2. Ainda, uma limitação desse estudo é não termos o acompanhamento desses pacientes, pelas características do nosso serviço de patologia. Assim, apesar das evidências científicas apontarem que a expressão de ALDH1 aumenta o risco de transformação maligna em lesões precursoras e que ela está relacionada a um pior prognóstico do câncer em outras localidades, nenhuma conclusão pode ser feita sobre o desenrolar clínico de QA e CEL com base na expressão do ALDH1.

O marcador p75NTR, também conhecido como CD271, vem sendo usado com êxito para identificar células-tronco normais/progenitoras de alguns tecidos adultos, principalmente de origem mesenquimal (93), mas também de tecidos epiteliais, como o esôfago e mucosa oral (94,95). A imunolocalização dessa proteína é muito mais específica que a do CD44, marcando toda a extensão da camada basal em gengiva, língua, mucosa jugal e epiderme (96–98), mesmo padrão de marcação observado em LN. Portanto, ele marca justamente onde residem as células-tronco adultas e progenitoras do epitélio. Por extensão, poderíamos considerar o p75NTR como um marcador de células-tronco adultas ou células progenitoras em vermelhão do lábio.

Embora a célula-tronco tumoral não necessariamente seja uma célula-tronco normal transformada, é fato que elas mimetizam muitas das características de uma célula-tronco normal (1); assim, o p75NTR também poderia ser considerado um forte candidato a marcador de célula-tronco tumoral nesses tecidos. Nos carcinomas de cabeça e pescoço, por exemplo, alguns trabalhos mostram que a subpopulação CD271+ representa um pequeno percentual de células localizadas dentro de uma população CD44+ (9). As células CD271+ parecem preencher todos os requisitos de células iniciadoras de tumor em comparação com as células CD271- (9,130–133). O fato desse marcador estar presente tanto em células-tronco normais como tumorais pode contribuir com a hipótese de que ambas estão intrinsecamente relacionadas em um mesmo processo, que culmina na aquisição do fenótipo maligno.

No presente estudo, observamos que houve um aumento no número de células p75NTR positivas nos casos de QA com o aumento na severidade da displasia epitelial ($p < 0,001$). Na transição de QA para CEL, não houve diferença numérica entre a marcação de QA e CEL; no entanto, observamos que 20% dos casos foram negativos e, dentre os casos positivos, 50% apresentou marcação difusa e 50% apresentou marcação focal. Esses resultados podem ser interpretados de várias formas. A primeira é considerar que houve perda de expressão, entendendo que durante a progressão da QA, há um aumento no número de células positivas, que se reflete na expressão inicialmente difusa desse marcador nas ilhas invasoras e que,

posteriormente, com o acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, essa expressão passa a ser focal e, finalmente, é perdida.

Essa explicação pode ser embasada por evidências científicas sugerindo que células-tronco tumorais devam surgir por uma espécie de evolução clonal, a partir de uma célula-tronco pré-tumoral (59,60). Esse processo de evolução clonal pode continuar acontecendo, gerando uma diversidade de fenótipos nas células tumorais existentes dentro de um mesmo tumor (134). Nesse sentido, talvez o p75NTR seja um marcador interessante de células-tronco tumorais apenas em determinadas fases do tumor, mas não em todas. Contudo, um trabalho que avaliou a expressão em carcinoma oral verificou que, ao invés de perder a expressão, o câncer tende a expressar mais p75NTR com a evolução do grau histológico (97). Os casos de CEL podem até não obedecer a tendência dos carcinomas orais, mas devemos lembrar que no presente trabalho quase todos os casos pertenciam à mesma categoria histológica, o que não justificaria tal explicação.

Outra forma de interpretar esses resultados é simplesmente considerar que o p75NTR é um marcador com expressão variável. Em outros trabalhos de imuno-histoquímica avaliando esse marcador, o número de células positivas variou de 10 a 100% de células marcadas no câncer, e a expressão de p75NTR não foi relacionada com o grau histológico (99,135). Ou seja, casos bem-diferenciados marcaram tanto focalmente quanto difusamente. O número de casos negativos também variou, dependendo da localização do câncer estudado (9). Vale lembrar que, apesar dessa variação, casos bem-diferenciados continuavam expressando essa proteína preferencialmente na periferia das ilhas tumorais, tal como ocorreu nos casos de CEL (9,97,99,126,135).

Também foi observado que alguns casos de CEL apresentaram marcação nuclear de p75NTR, que podia ou não ser concomitante com a expressão citoplasmática. Isso pode ser explicado pelo fato de que o p75NTR, assim como outras proteínas localizadas na membrana, pode sofrer um processo de proteólise intramembranosa regulada que culmina com a liberação de seu domínio intracelular. Esse domínio então pode se translocar para o núcleo e lá atuar como regulador na transcrição de genes (136,137). Entretanto, apesar dessa explicação, nenhum estudo imuno-histoquímico que avaliou a expressão de p75NTR nos carcinomas intraorais,

ou em outras localizações na região de cabeça e pescoço, reporta a expressão desse marcador no núcleo.

A mutação no gene *TP53* é uma das principais alterações genéticas que ocorre em vários tipos de carcinoma, inclusive nos que são provocados pela exposição crônica à radiação ultravioleta (47,44). A proteína p53 é constantemente referida como “guardiã” do genoma, pelo seu papel como proteína supressora tumoral e múltipla atuação em várias vias de sinalização intracelulares. Mais recentemente, estudos na área de células-tronco tumorais têm mostrado que a deficiência ou perda de função da proteína p53 está também relacionada à expansão das células-tronco tumorais (138–140). A interação do p53 com a região promotora do CD44 e CD133, por exemplo, suprime a transcrição desses genes relacionados às células-tronco tumorais; isso tem repercussão na proliferação e potencial tumorigênico das células (138,141).

Devido essa interação, no presente trabalho nós também investigamos a expressão imuno-histoquímica de p53 e a correlação deste com os marcadores de células-tronco tumorais. Em nossa amostra, foi notada uma tendência à maior expressão de p53 com o aumento grau de displasia epitelial e em CEL comparado à QA, porém esses resultados não apresentaram significância estatística. Também não foi observado correlação entre a expressão dos marcadores entre si ou entre p53 e os marcadores CD44, ALDH1 e p75NTR.

Apesar da vasta literatura sobre p53 em outros tipos de câncer, apenas 5 trabalhos compararam a expressão imuno-histoquímica dessa proteína entre QA e CEL. Os estudos mostram que a expressão de p53 em CEL aumenta em relação à expressão observada em QA (44,43). É curioso, nesse sentido, pensar que há um aumento na expressão durante a transformação maligna e, ao mesmo tempo, o p53 regula negativamente marcadores de células-tronco tumorais. No entanto, é importante lembrar que o anticorpo usado na imuno-histoquímica identifica tanto a forma nativa como a forma mutada da proteína. Assim, muitos dos núcleos positivos representam marcação do proteína não-funcional, que não tem a mesma função biológica da forma nativa e que, portanto, não interferiria na expressão dos marcadores de células-tronco. A falta de correlação de p53 com os outros

marcadores, ou mesmo desses marcadores entre si, pode ser justificada pela heterogeneidade da marcação de cada anticorpo nos grupos observados.

QA e CEL se originam do vermelhão do lábio, uma região intermediária que não é mucosa oral nem pele. Dificilmente essa região será submetida a uma remoção cirúrgica sem a presença de uma lesão. Por isso, tivemos dificuldade na seleção de nossa amostra de casos-controle, pois queríamos utilizar apenas aqueles casos que tivessem epitélio de vermelhão do lábio, e não mucosa oral como a maior parte dos trabalhos faz. Assim, consideramos que, apesar de apenas 4 casos de LN, a rigidez na escolha da lesão controle é um ponto forte e um diferencial do nosso trabalho, visto que a maior parte dos estudos com QA e CEL usam mucosa oral como controle.

Esse foi o primeiro estudo a avaliar a expressão de conhecidos marcadores de células-tronco tumorais em lesões malignas e potencialmente malignas de lábio, ambas causadas pela exposição crônica à radiação ultravioleta. Entre os marcadores estudados, o p75NTR apresentou diferença em sua expressão com o aumento no grau de displasia epitelial. É importante estudar a expressão desses marcadores nesses tipos de lesões, pois elas são diferentes das lesões malignas e potencialmente malignas originadas da cavidade oral e da pele. Também, nosso estudo é importante pois contribui para entendermos como esses marcadores são expressos e estão relacionados com o processo de fotocarcinogênese do lábio.

7 CONCLUSÕES

- Os marcadores de células-tronco tumorais estão presentes em lesões potencialmente malignas e malignas de lábio, porém suas expressões não variaram entre QA e CEL;
- Todos os casos de LN, QA e CEL foram positivos para o marcador CD44. O padrão de marcação é praticamente invariável entre os grupos de displasia e comparando QA e CEL. Quase todos os casos demonstraram marcação preservada;
- Nenhum caso de LN foi positivo para ALDH1. Mais da metade dos casos de QA e CEL apresentaram positividade para esse marcador. Geralmente, ALDH1 demonstra marcação citoplasmática em poucas células tanto em QA como em CEL, com poucos casos fugindo à essa regra. Não houve diferença estatística na expressão desse marcador entre os graus de displasia e entre QA e CEL;
- O p75NTR teve marcação membranosa/citoplasmática em LN e QA em camada basal e parabasal, às vezes envolvendo células da camada espinhosa. No CEL, a expressão era principalmente citoplasmática. Houve diferença na expressão de p75NTR entre os grupos de displasia, mas não foi observada diferença na expressão entre QA e CEL.
- p53 teve marcação nuclear, com todos os casos positivos de LN e QA e quase todos de CEL, positivos para o marcador. Não houve diferença na expressão de p53 entre os graus de displasia epitelial e entre QA e CEL;
- Não houve correlação na expressão dos marcadores de células-tronco tumorais entre si;
- Não houve correlação entre a expressão da proteína p53 com a expressão dos marcadores CD44, ALDH1 e p75NTR.

REFERÊNCIAS¹

1. Dalerba P, Cho RW, Clarke MF. Cancer stem cells: models and concepts. *Annu Rev Med.* 2007 Feb;58(1):267–84.
2. Valent P, Bonnet D, De Maria R, Lapidot T, Copland M, Melo J V, et al. Cancer stem cell definitions and terminology: the devil is in the details. *Nat Rev Cancer.* 2012 Nov;12(11):767–75.
3. Shackleton M. Normal stem cells and cancer stem cells: Similar and different. *Semin Cancer Biol.* 2010 Apr;20(2):85–92.
4. Vinogradov S, Wei X. Cancer stem cells and drug resistance: the potential of nanomedicine. *Nanomedicine.* 2012 Apr;7(4):597–615.
5. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res.* 2005 Dec;65(23):10946–51.
6. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2003 Apr;100(7):3983–8.
7. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, Squire JA, Bayani J, Hide T, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature.* 2004 Nov;432(7015):396–401.
8. 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 Nov;1(5):555–67.
9. Murillo-Sauca O, Chung MK, Shin JH, Karamboulas C, Kwok S, Jung YH, et al. CD271 is a functional and targetable marker of tumor-initiating cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2014 Aug;5(16):6854–66.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

10. Zhang Q, Shi S, Yen Y, Brown J, Ta JQ, Le AD. A subpopulation of CD133+ cancer stem-like cells characterized in human oral squamous cell carcinoma confer resistance to chemotherapy. *Cancer Lett.* 2010 Mar;289(2):151–60.
11. Schoenhals M, Kassambara A, De Vos J, Hose D, Moreaux J, Klein B. Embryonic stem cell markers expression in cancers. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 May;383(2):157–62.
12. 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 US A.* 2007 Jan;104(3):973–8.
13. Dallaglio K, Petrachi T, Marconi A, Truzzi F, Lotti R, Saltari A, et al. Isolation and characterization of squamous cell carcinoma-derived stem-like cells: role in tumor formation. *Int J Mol Sci.* 2013 Sep;14(10):19540–55.
14. Zhou C, Sun B. The prognostic role of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in head and neck squamous cell carcinomas: A meta-analysis. *Oral Oncol.* 2014 Dec;50(12):1144–8.
15. Armstrong BK, Kricker A. The epidemiology of UV induced skin cancer. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2001 Oct;63(1–3):8–18.
16. Kozma B, Eide MJ. Photocarcinogenesis: An epidemiologic perspective on ultraviolet light and skin cancer. *Dermatol Clin.* 2014 Jul;32(3):301–13.
17. Battie C, Jitsukawa S, Bernerd F, Del Bino S, Marionnet C, Verschoore M. New insights in photoaging, UVA induced damage and skin types. *Exp Dermatol.* 2014 Oct;23 Suppl 1:S7-12.
18. Lisby S, Gniadecki R, Wulf HC. UV-induced DNA damage in human keratinocytes: quantitation and correlation with long-term survival. *Exp Dermatol.* 2005 May;14(5):349–55.
19. Black HS, DeGrujil FR, Forbes PD, Cleaver JE, Ananthaswamy HN, DeFabo EC, et al. Photocarcinogenesis: an overview. *J Photochem Photobiol B Biol.* 1997 Aug;40(1):29–47.

20. Melnikova VO, Ananthaswamy HN. Cellular and molecular events leading to the development of skin cancer. *Mutat Res.* 2005 Apr;571(1–2):91–106.
21. Kress S, Sutter C, Strickland PT, Mukhtar H, Schweizer J, Schwarz M. Carcinogen-specific mutational pattern in the p53 gene in ultraviolet B radiation-induced squamous cell carcinomas of mouse skin. *Cancer Res.* 1992 Nov;52(22):6400–3.
22. Bolshakov S, Walker CM, Strom SS, Carcinomas SC, Selvan MS, Clayman GL, et al. p53 mutations in human aggressive and nonaggressive basal and squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2003 Jan;9(1):228–34.
23. Jonason AS, Kunala S, Price GJ, Restifo RJ, Spinelli HM, Persing JA, et al. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Nov;93(24):14025–9.
24. Nelson MA, Einspahr JG, Alberts DS, Balfour CA, Wymer JA, Welch KL, et al. Analysis of the p53 gene in human precancerous actinic keratosis lesions and squamous cell cancers. *Cancer Lett.* 1994 Sep;85(1):23–9.
25. Mouret S, Baudouin C, Charveron M, Favier A, Cadet J, Douki T. Cyclobutane pyrimidine dimers are predominant DNA lesions in whole human skin exposed to UVA radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Sep;103(37):13765–70.
26. De Gruijl FR, Van Kranen HJ, Mullenders LHF. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol B Biol.* 2001 Oct;63(1–3):19–27.
27. Vieira RAMAR, Minicucci EM, Marques MEA, Marques SA. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. *An Bras Dermatol.* 2012 Jan-Feb;87(1):105–14.
28. Lopes MLDS, Silva Júnior FL, Lima KC, Oliveira PT, Silveira EJD. Clinicopathological profile and management of 161 cases of actinic cheilitis. *An Bras Dermatol.* 2015 Jul-Aug;90(4):347–50.
29. Neville BW, et al. *Patologia: Oral & Maxilofacial.* 3a ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 2009.

30. 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 Mar;37(3):127–33.
31. 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 Nov;42(10):987–93.
32. Shah AY, Doherty SD, Rosen T. Actinic cheilitis: A treatment review. *Int J Dermatol*. 2010 Nov;49(11):1225–34.
33. Batista AC, Costa NL, Oton-Leite AF, Mendonça EF, Alencar R de CG, Silva TA. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Mar;109(3):74–9.
34. Hasson O. Squamous Cell Carcinoma of the Lower Lip. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Jun;66(6):1259–62.
35. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2015.
36. Souza LR, Fonseca-Fonseca T, Oliveira-Santos CC, Corrêa GTB, Santos FBG, Cardoso CM, et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: Epidemiological study and clinicopathological associations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Sep;16(6):757–62.
37. Nasser N, Filho NN, Lehmkuhl RL. Squamous cell cancer – 31-year epidemiological study in a city of south Brazil. 2015 Jan-Feb;90(1):21–6.
38. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4–5):309–16.
39. Biasoli ÉR, Valente VB, Mantovan B, Collado FU, Neto SC, Sundfeld MLMM, et al. Lip cancer: A clinicopathological study and treatment outcomes in a 25-year experience. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016 Jul;74(7):1360-7.
40. Benjamin CL, Ananthaswamy HN. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Nov;224(3):241–8.

41. Daya-Grosjean L, Sarasin A. The role of UV induced lesions in skin carcinogenesis: An overview of oncogene and tumor suppressor gene modifications in xeroderma pigmentosum skin tumors. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2005 Apr;571(1–2):43–56.
42. Pfeifer GP. p53 mutational spectra and the role of methylated CpG sequences. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen*. 2000 May;450(1–2):155–66.
43. Lopes MLDS, de Oliveira DHIP, Sarmiento DJS, Queiroz LMG, Miguel MCC, da Silveira ÉJD. Correlation between cell cycle proteins and hMSH2 in actinic cheilitis and lip cancer. *Arch Dermatol Res*. 2016 Apr;308(3):165–71.
44. Souza LR, Fonseca-Silva T, Pereira CS, Santos EP, Lima LC, Carvalho HA, et al. Immunohistochemical analysis of p53, APE1, hMSH2 and ERCC1 proteins in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2011 Feb;58(3):352–60.
45. Neto Pimentel DR, Michalany N, Alchorne M, Abreu M, Borra RC, Weckx L. Actinic cheilitis: Histopathology and p53. *J Cutan Pathol*. 2006 Aug;33(8):539–44.
46. de Rosa I, Staibano S, Lo Muzio L, Delfino M, Lucariello A, Coppola A, et al. Potentially malignant and malignant lesions of the lip. Role of silver staining nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen, p53, and c-myc in differentiation and prognosis. *J Oral Pathol Med*. 1999 Jul;28(6):252–8.
47. Correa GTB, Bernardes VF, de Sousa SF, Diniz MG, Salles JMP, Souza RP, et al. Lip cancer and pre-cancerous lesions harbor TP53 mutations, exhibit allelic loss at 9p, 9q, and 17p, but no BRAFV600E mutations. *Tumor Biol*. 2015 Nov;36(11):9059–66.
48. Shackleton M, Quintana E, Fearon ER, Morrison SJ. Heterogeneity in cancer: Cancer Stem cells versus clonal evolution. *Cell*. 2009 Sep;138(5):822–9.
49. 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 Feb;367(6464):645–8.

50. Zhang S, Balch C, Chan MW, Lai H-C, Matei D, Schilder JM, et al. Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res.* 2008 Jun;68(11):4311–20.
51. Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, et al. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* 2008 Mar;15(3):504–14.
52. Rassouli FB, Matin MM, Saeinasab M. Cancer stem cells in human digestive tract malignancies. *Tumor Biol.* 2016 Jan;37(1):7–21.
53. Mannelli G, Gallo O. Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. *Cancer Treat Rev.* 2012 Aug;38(5):515–39.
54. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007 Nov;23:675–99.
55. Medema JP. Cancer stem cells: The challenges ahead. *Nat Cell Biol.* 2013 Apr;15(4):338–44.
56. Fukusumi T, Ishii H, Konno M, Yasui T, Nakahara S, Takenaka Y, et al. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2014 Jul;111(3):506–14.
57. Vidal SJ, Rodriguez-Bravo V, Galsky M, Cordon-Cardo C, Domingo-Domenech J. Targeting cancer stem cells to suppress acquired chemotherapy resistance. *Oncogene.* 2014 Sep;33(36):4451–63.
58. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976 Oct;194(4260):23–8.
59. Chen L, Shen R, Ye Y, Pu XA, Liu X, Duan W, et al. Precancerous stem cells have the potential for both benign and malignant differentiation. *PLoS One.* 2007 Mar;2(3):e293.
60. Gao JX. Cancer stem cells: the lessons from pre-cancerous stem cells. *J Cell Mol Med.* 2008 Jan-Feb;12(1):67–96.

61. Shahriyari L, Komarova NL. Symmetric vs. asymmetric stem cell divisions: an adaptation against cancer? *PLoS One*. 2013 Oct;8(10):e76195.
62. Owens DM, Watt FM. Contribution of stem cells and differentiated cells to epidermal tumours. *Nat Rev Cancer*. 2003 Jun;3(6):444–51.
63. Papagerakis S, Pannone G, Zhenga L, About I, Taqi N, Nguyen NPT, et al. Oral epithelial stem cells – implications in normal development and cancer metastasis. *Exp Cell Res*. 2014 Jul;325(2):111–29.
64. Jones KB, Klein OD. Oral epithelial stem cells in tissue maintenance and disease: the first steps in a long journey. *Int J Oral Sci*. 2013 Sep;5(3):121–9.
65. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for Making Human Tumor Cells. *N Engl J Med*. 2002 Nov;347(20):1593–603.
66. Pardoll R, Clarke MF, Morrison SJ. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat Rev Cancer*. 2003 Dec;3(12):895–902.
67. Ma I, Allan AL. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev Reports*. 2011 Jun;7(2):292–306.
68. Ponta H, Sherman L, Herrlich P. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2003 Jan;4(1):33–45.
69. Yan Y, Zuo X, Wei D. Concise review: emerging role of CD44 in cancer stem cells: A promising biomarker and therapeutic target. *Stem Cells Transl Med*. 2015 Sep;4(9):1033–43.
70. Oliveira DT, Odell EW. Expression of CD44 variant exons by normal oral epithelia. *Oral Oncol*. 1997 Jul;33(4):260–2.
71. Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol*. 1998 Aug;51(4):191–200.
72. Bourguignon LYW. Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Semin Cancer Biol*. 2008 Aug;18(4):251–9.

73. Wu Y, Li Z, Zhang C, Yu K, Teng Z, Zheng G, et al. CD44 family proteins in gastric cancer : a meta-analysis and narrative review. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Mar;8(3):3595–606.
74. Lin J, Ding D. The prognostic role of the cancer stem cell marker CD44 in ovarian cancer: a meta-analysis. *Cancer Cell Int*. 2017 Jan;17(1):8.
75. Jiang H, Zhao W, Shao W. Prognostic value of CD44 and CD44v6 expression in patients with non-small cell lung cancer: meta-analysis. *Tumor Biol*. 2014 Aug;35(8):7383–9.
76. Chai L, Liu H, Zhang Z, Wang F, Wang Q, Zhou S, et al. CD44 expression is predictive of poor prognosis in pharyngolaryngeal cancer: systematic review and meta-analysis. *Tohoku J Exp Med*. 2014;232(1):9–19.
77. Chen J, Zhou J, Lu J, Xiong H, Shi X, Gong L. Significance of CD44 expression in head and neck cancer: a systemic review and meta-analysis. *BMC Cancer*. 2014 Jan;14(1):15.
78. Takaishi S, Okumura T, Tu S, Wang SSW, Shibata W, Vigneshwaran R, et al. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells*. 2009 May;27(5):1006–20.
79. Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, et al. CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res*. 2008 Nov;14(21):6751–60.
80. Tomita H, Tanaka K, Hisamatsu K, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer stem cells. *Oncotarget*. 2016 Mar;7(10):11018–32.
81. Kato H, Izumi K, Saito T, Ohnuki H, Terada M, Kawano Y, et al. Distinct expression patterns and roles of aldehyde dehydrogenases in normal oral mucosa keratinocytes: differential inhibitory effects of a pharmacological inhibitor and RNAi-mediated knockdown on cellular phenotype and epithelial morphology. *Histochem Cell Biol*. 2013 Jun;139(6):847–62.
82. de Moraes FPP, Lourenço SV, Ianez RCF, de Sousa EA, Silva MM da C, Damascena AS, et al. Expression of stem cell markers in oral cavity and oropharynx squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2017 Jan;123(1):113–22.

83. Liu S-Y, Zheng P-S. High aldehyde dehydrogenase activity identifies cancer stem cells in human cervical cancer. *Oncotarget*. 2013 Dec;4(12):2462–75.
84. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2009 Mar;7(3):330–8.
85. Larzabal L, El-Nikhely N, Redrado M, Seeger W, Savai R, Calvo A. Differential effects of drugs targeting cancer stem cell (CSC) and non-CSC populations on lung primary tumors and metastasis. *PLoS One*. 2013 Nov;8(11):e79798.
86. Raha D, Wilson TR, Peng J, Peterson D, Yue P, Evangelista M, et al. The cancer stem cell marker Aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation. *Cancer Res*. 2014 Jul;74(13):3579–90.
87. Liu S, Liu C, Min X, Ji Y, Wang N, Liu D, et al. Prognostic value of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase in ovarian cancer: A meta-analysis. Kato M, editor. *PLoS One*. 2013 Nov;8(11):e81050.
88. Chen J, Xia Q, Jiang B, Chang W, Yuan W, Ma Z, et al. Prognostic value of cancer stem cell marker ALDH1 expression in colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. 2015 Dec;10(12):1–15.
89. Wei D, Peng J-J, Gao H, Zhang T, Tan Y, Hu Y-H. ALDH1 expression and the prognosis of lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Hear Lung Circ*. 2015 Aug;24(8):780–8.
90. Underwood CK, Coulson EJ. The p75 neurotrophin receptor. *Int J Biochem Cell Biol*. 2008 Jun;40(9):1664–8.
91. Tomellini E, Lagadec C, Polakowska R, Le Bourhis X. Role of p75 neurotrophin receptor in stem cell biology: more than just a marker. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Mar;71(13):2467–81.
92. Hempstead BL. The many faces of p75NTR. *Curr Opin Neurobiol*. 2002 Jun;12(3):260–7.

93. Álvarez-Viejo M, Menéndez-Menéndez Y, Otero-Hernández J. CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. *World J Stem Cells*. 2015 Mar;7(2):470–6.
94. Okumura T, Shimada Y, Imamura M, Yasumoto S. Neurotrophin receptor p75NTR characterizes human esophageal keratinocyte stem cells in vitro. *Oncogene*. 2003 Jun;22(26):4017–26.
95. Nakamura T, Endo K, Kinoshita S. Identification of human oral keratinocyte stem/progenitor cells by neurotrophin receptor p75 and the role of neurotrophin/p75 signaling. *Stem Cells*. 2007 Mar;25(3):628–38.
96. Hayashi K, Storesund T, Schreurs O, Khuu C, Husvik C, Karatsaidis A, et al. Nerve growth factor β /pro-nerve growth factor and their receptors in normal human oral mucosa. *Eur J Oral Sci*. 2007 Oct;115(5):344–54.
97. Kiyosue T, Kawano S, Matsubara R, Goto Y, Hirano M, Jinno T, et al. Immunohistochemical location of the p75 neurotrophin receptor (p75NTR) in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2013 Feb;18(1):154–63.
98. Truzzi F, Marconi A, Atzei P, Panza MC, Lotti R, Dallaglio K, et al. P75 neurotrophin receptor mediates apoptosis in transit-amplifying cells and its overexpression restores cell death in psoriatic keratinocytes. *Cell Death Differ*. 2011 Jun;18(6):948–58.
99. Sølrand TM, Brusevold IJ, Koppang HS, Schenck K, Bryne M. Nerve growth factor receptor (p75NTR) and pattern of invasion predict poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2008 Jul;53(1):62–72.
100. Fujiwara K, Ohuchida K, Mizumoto K, Shindo K, Eguchi D, Kozono S, et al. CD271+ subpopulation of pancreatic stellate cells correlates with prognosis of pancreatic cancer and is regulated by interaction with cancer cells. *PLoS One*. 2012 Dec;7(12):e52682.
101. 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 Apr;47(4):237–43.

102. 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 Jul;45(7):633–9.
103. Kaseb HO, Fohrer-Ting H, Lewis DW, Lagasse E, Gollin SM. Identification, expansion and characterization of cancer cells with stem cell properties from head and neck squamous cell carcinomas. *Exp Cell Res.* 2016 Oct;348(1):75–86.
104. Chen Y-C, Chen Y-W, Hsu H-S, Tseng L-M, Huang P-I, Lu K-H, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Jul;385(3):307–13.
105. 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 Sep;32(9):1195–201.
106. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, et al. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res.* 2010 Dec;70(23):9969–78.
107. Seino S, Shigeishi H, Hashikata M, Higashikawa K, Tobiume K, Uetsuki R, et al. CD44(high) /ALDH1(high) head and neck squamous cell carcinoma cells exhibit mesenchymal characteristics and GSK3 β -dependent cancer stem cell properties. *J Oral Pathol Med.* 2016 Mar;45(3):180–8.
108. Chen C, Chiou S, Huang C, Jan C, Lin S, Tsai M, et al. Distinct population of highly malignant cells in a head and neck squamous cell carcinoma cell line established by xenograft model. *J Biomed Sci.* 2009 Nov;16:100.
109. Hill RP, Perris R. “Destemming” cancer stem cells. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Oct;99(19):1435–40.
110. Biddle A, Liang X, Gammon L, Fazil B, Harper LJ, Emich H, et al. Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res.* 2011 Aug;71(15):5317–26.

111. Oh SY, 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*. 2013 Jan;49(1):272–80.
112. Patel GK, Yee CL, Terunuma A, Telford WG, Voong N, Yuspa SH, et al. Identification and characterization of tumor-initiating cells in human primary cutaneous squamous cell carcinoma. *J Invest Dermatol*. 2012 Feb;132(2):401–9.
113. Biddle A, Gammon L, Fazil B, Mackenzie IC. CD44 staining of cancer stem-like cells is influenced by down-regulation of CD44 variant isoforms and up-regulation of the standard CD44 isoform in the population of cells that have undergone epithelial-to-mesenchymal transition. *PLoS One*. 2013 Feb;8(2):e57314.
114. Adhikary G, Grun D, Kerr C, Balasubramanian S, Rorke EA, Vemuri M, et al. Identification of a population of epidermal squamous cell carcinoma cells with enhanced potential for tumor formation. *PLoS One*. 2013 Dec;8(12):e84324.
115. Patel S, Rawal R. Role of miRNA dynamics and cytokine profile in governing CD44v6/Nanog/PTEN axis in oral cancer: modulating the master regulators. *Tumor Biol*. 2016 Nov;37(11):14565–75.
116. Modur V, Joshi P, Nie D, Robbins KT, Khan AU, Rao K. CD24 expression may play a role as a predictive indicator and a modulator of cisplatin treatment response in head and neck squamous cellular carcinoma. *PLoS One*. 2016 Jun;11(6):1–21.
117. Mack B, Gires O. CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *PLoS One*. 2008 Oct;3(10):e3360.
118. Godge P, Poonja L. 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 May-Jun;22(3):493.
119. Karvinen S, Kosma VM, Tammi MI, Tammi R. Hyaluronan, CD44 and versican in epidermal keratinocyte tumours. *Br J Dermatol*. 2003 Jan;148(1):86–94.

120. Arciniegas E, Carrillo LM, Rojas H, Ramírez R, Reyes O, Ortega F. Mucin1 expression in focal epidermal dysplasia of actinic keratosis. 2015 Oct;3(17):1–9.
121. Kaseb HO, Fohrer-Ting H, Lewis DW, Lagasse E, Gollin SM. Identification, expansion and characterization of cancer cells with stem cell properties from head and neck squamous cell carcinomas. *Exp Cell Res*. 2016 Oct;348(1):75–86.
122. Wang S, Wong G, Heer A. CD44 variant isoforms in head and neck squamous cell carcinoma progression. *Laryngoscope*. 2009 Aug;119(8):1518–30.
123. Olsson E, Honeth G, Bendahl P-O, Saal LH, Gruvberger-Saal S, Ringnér M, et al. CD44 isoforms are heterogeneously expressed in breast cancer and correlate with tumor subtypes and cancer stem cell markers. *BMC Cancer*. 2011 Sep;11(1):418.
124. 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 Nov;1(5):555–67.
125. Ishida M, Okabe H. Aldehyde dehydrogenase 1 expression in basal cell carcinoma, actinic keratosis and Bowen's disease. *Mol Clin Oncol*. 2013 Jul;1(4):621–4.
126. Abdulmajeed A a, Dalley AJ, Farah CS. Putative cancer stem cell marker expression in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J oral Pathol Med*. 2013 Nov;42(10):755–60.
127. Habiba U, Hida K, Kitamura T, Matsuda AY, Higashino F, Ito YM, et al. ALDH1 and podoplanin expression patterns predict the risk of malignant transformation in oral leukoplakia. *Oncol Lett*. 2017 Jan;13(1):321–8.
128. Feng J-Q, Xu Z-Y, Shi L-J, Wu L, Liu W, Zhou Z-T. Expression of cancer stem cell markers ALDH1 and Bmi1 in oral erythroplakia and the risk of oral cancer. *J Oral Pathol Med*. 2013 Feb;42(2):148–53.
129. 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*. 2012 Feb;132(4):868–74.

130. Imai T, Tamai K, Oizumi S, Oyama K, Yamaguchi K, Sato I, et al. CD271 defines a stem cell-like population in hypopharyngeal cancer. *PLoS One*. 2013 Apr;8(4):e62002.
131. Li S, Yue D, Chen X, Wang L, Li J, Ping Y, et al. Epigenetic regulation of CD271, a potential cancer stem cell marker associated with chemoresistance and metastatic capacity. *Oncol Rep*. 2015 Jan;33(1):425–32.
132. Tong D, Sun J, Huang P, Li M, Zhang F. p75 neurotrophin receptor: A potential surface marker of tongue squamous cell carcinoma stem cells. *Mol Med Rep*. 2017 May;15(5):2521–9.
133. Yamaguchi T, Okumura T, Hirano K, Watanabe T, Nagata T, Shimada Y, et al. p75 neurotrophin receptor expression is a characteristic of the mitotically quiescent cancer stem cell population present in esophageal squamous Cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2016 May;48(5):1943–54.
134. Poleszczuk J, Hahnfeldt P, Enderling H. Evolution and phenotypic selection of cancer stem cells. *PLoS Comput Biol*. 2015 Mar;11(3):1–14.
135. Li X, Shen Y, Di B, Li J, Geng J, Lu X, et al. Biological and clinical significance of p75NTR expression in laryngeal squamous epithelia and laryngocarcinoma. *Acta Otolaryngol*. 2012 Mar;132(3):314–24.
136. Parkhurst CN, Zampieri N, Chao M V. Nuclear localization of the p75 neurotrophin receptor intracellular domain. *J Biol Chem*. 2010 Feb;285(8):5361–8.
137. Kanning KC, Hudson M, Amieux PS, Wiley JC, Bothwell M, Schecterson LC. Proteolytic processing of the p75 neurotrophin receptor and two homologs generates C-terminal fragments with signaling capability. *J Neurosci*. 2003 Jul;23(13):5425–36.
138. Park EK, Lee JC, Park JW, Bang SY, Yi SA, Kim BK, et al. Transcriptional repression of cancer stem cell marker CD133 by tumor suppressor p53. *Cell Death Dis*. 2015 Nov;6(11):e1964.
139. Jerry DJ, Tao L, Yan H. Regulation of cancer stem cells by p53. *Breast Cancer Res*. 2008 Aug;10(4):304.

140. Aloni-Grinstein R, Shetzer Y, Kaufman T, Rotter V. p53: The barrier to cancer stem cell formation. *FEBS Lett.* 2014 Aug;588(16):2580–9.
141. Godar S, Ince TA, Bell GW, Feldser D, Donaher JL, Bergh J, et al. Growth-inhibitory and tumor- suppressive functions of p53 depend on its repression of CD44 expression. *Cell.* 2008 Jul;134(1):62–73.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

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

Título da Pesquisa: Avaliação imuno-histoquímica de marcadores de células-tronco na fotocarcinogênese de lábio

Pesquisador: Marília Trierveiler Martins

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 64231817.5.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.946.954

Apresentação do Projeto:

A longa exposição e a falta de proteção dos tecidos do corpo à radiação UV podem trazer efeitos deletérios ao organismo, levando ao aparecimento de lesões malignas e potencialmente malignas na pele e lábios, em um processo denominado de fotocarcinogênese. No vermelhão do lábio, a queilite actínica é a lesão potencialmente maligna que se desenvolve em virtude do excesso de exposição à radiação UV. Em certo número de casos, a queilite actínica pode evoluir para o carcinoma epidermoide de lábio. O processo de carcinogênese é complexo e engloba múltiplos eventos. Nesse cenário, a hipótese das células-tronco tumorais vem ganhando maior destaque como uma explicação alternativa ao método estocástico de tumorigênese. A identificação dessa população de células especiais tem sido realizada em diversos tipos de tumores, inclusive no câncer de cabeça e pescoço. O objetivo deste trabalho é analisar o padrão de expressão imuno-histoquímica dos conhecidos marcadores de células-tronco tumorais CD44, ALDH1, SOX-2 e p75 em casos de queilite actínica com diferentes graus de displasia epitelial e no carcinoma epidermoide de lábio. Para relacionar com a agressividade da lesão também serão feitas reações para a proteína p53, um marcador bem estabelecido de agressividade nos carcinomas de boca. Para comparação dos resultados, serão estudados cortes contendo epitélio do vermelhão do lábio sem alterações neoplásicas. A partir de material de arquivo, serão estudados 45 casos de queilite.

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

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.946.954

actínica, 20 casos de carcinoma epidermoide de lábio e 10 casos de outras lesões com fragmento de epitélio de vermelhão do lábio com aspectos de normalidade.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste trabalho é analisar o padrão de expressão imuno-histoquímica dos conhecidos marcadores de células-tronco tumorais CD44, ALDH1, SOX-2 e p75 em casos de queilite actínica com diferentes graus de displasia epitelial e no carcinoma epidermoide de lábio. Para relacionar com a agressividade da lesão também serão feitas reações para a proteína p53, um marcador bem estabelecido de agressividade nos carcinomas de boca. Para comparação dos resultados, serão estudados cortes contendo epitélio do vermelhão do lábio sem alterações neoplásicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos mínimos. Não apresenta benefícios diretos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto com robusto embasamento teórico e metodológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta todos os termos de forma adequada.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_855932.pdf	31/01/2017 13:53:50		Aceito
Outros	Acervo.pdf	31/01/2017 13:53:02	Marília Trierveiler Martins	Aceito

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

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.946.954

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	31/01/2017 13:51:45	Marília Trierveiler Martins	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	31/01/2017 13:51:26	Marília Trierveiler Martins	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	31/01/2017 13:51:17	Marília Trierveiler Martins	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 03 de Março de 2017

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: oepfo@usp.br