

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA BUCAL

**ESTUDO DOS RECEPTORES DE RETINOL E DO PROCESSO DE
EMT EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO
E SUA RELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO**

Rúbia da Rocha Vieira

Porto Alegre

2017

RÚBIA DA ROCHA VIEIRA

**ESTUDO DOS RECEPTORES DE RETINOL E DO PROCESSO DE
EMT EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO
E SUA RELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Odontologia, área de concentração em Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Titular Dr. Pantelis Varvaki Rados

Linha de Pesquisa: Câncer bucal

Faculdade de Odontologia

Dezembro de 2017

CIP - Catalogação na Publicação

Vieira, Rúbia da Rocha

Estudo dos receptores de retinol e do processo de EMT em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e sua relação com o prognóstico / Rúbia da Rocha

Vieira. -- 2017.

68 f.

Orientador: Pantelis Varvaki Rados.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. 2. ALDH1. 3. EMT. 4. Receptores retinoides. 5. Prognóstico. I. Rados, Pantelis Varvaki, orient. II. Título.

*“E as coisas acontecem, simplesmente.
Leio hoje, linhas já escritas no livro da vida.
Não temo a próxima página, não fujo à peleia,
Não desisto sem tentar, muitas e muitas vezes.
Desafios são os degraus para a sabedoria,
Para a experiência, para a vida plena e livre.
O novo não me acovarda, e o antigo me sustenta.
O futuro é a oportunidade que a vida
nos dá de recomeçar ou tentar de novo amanhã.
Mas o hoje, já nos foi dado ontem, então, tem
que valer a pena. E a vida segue, ao seu tempo.
Sábia e mágica. Que os ciclos se completem,
Que o que não agrega, se perca pelo caminho,
Que o bem germine e multiplique sempre...”*

(Tachira Coelho)

DEDICATÓRIA

Ao meus amados pais **Domingos e Lair**, dedico mais esta conquista. Obrigada por terem me escolhido como filha e por todo amor incondicional. Vocês são a minha fortaleza, são anjos que Deus colocou na minha vida e com toda a certeza digo que se pude voar mais alto e atingir meus maiores objetivos foi porque tive em vocês a força, o incentivo, o amor e a amizade incondicional, mas principalmente, a inspiração e o exemplo. Obrigada por sonharem este sonho comigo... esta vitória é nossa!

Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida, por iluminar e abençoar o meu caminho mesmo quando tudo parece incerto, por me guiar e me dar força para superar com sabedoria todos obstáculos impostos pela vida.

Ao meu noivo **Mariano**, por todo amor, carinho, amizade, confiança e apoio. Agradeço pela compreensão das minhas muitas ausências, nestes anos em que buscava trilhar meu caminho! Obrigada por ter você na minha vida!

À minha **família de Esteio e de Júlio de Castilhos**, que mesmo a distância sempre se fizeram presentes me incentivando na busca deste sonho. O apoio de vocês foi fundamental, obrigada!

Ao **Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho**, por ser um excelente profissional e pesquisador e um admirável ser humano. Obrigada pela oportunidade de ser sua orientada e por despertar ainda mais em mim o amor pela patologia, pela pesquisa e docência. Agradeço de todo coração ao senhor, meu orientador, chefe e pai patológico por todo carinho, pela amizade construída ao longo destes anos, pelo incentivo constante e confiança em mim depositada, pela paciência, compreensão e imenso conhecimento transmitido. Foi mais do que uma honra ser sua orientada, tem para sempre a minha eterna gratidão, admiração e amizade!

Meu agradecimento e homenagem carinhosa ao **Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados**, o qual me acolheu e me honrou com sua orientação na conclusão deste trabalho. Agradeço por todos os ensinamentos a mim transmitidos e pela confiança depositada. Tem para sempre meu carinho e gratidão!

A Prof^a. Laura (Laurinha), a qual não tenho palavras para agradecer por todo apoio, incentivo e pelo auxílio na confecção deste trabalho. Obrigada pelos momentos partilhados e por ter podido contar contigo!

Aos estimados **professores da Patologia bucal e da Histologia bucal** da Universidade Federal do Rio Grandedo Sul, por serem exemplos de seres humanos e pelo brilhantismo e dedicação como profissionais. Agradeço pela maneira acolhedora em que sempre me receberam, pelas palavras de incentivo e pelos valiosos ensinamentos.

As professoras **Manoela Martins, Paula Bohrer e Ana Luísa Carvalho**, por gentilmente terem aceito o convite para participar da banca examinadora deste trabalho. É uma honra partilhar deste momento tão especial em minha vida com profissionais que eu tenho muito carinho e admiração.

As minhas amigas queridas, **Taiane Berguemeier, Caroline Klabunde e Maria Cristina Binz**, grandes presentes que a patologia me trouxe! Agradeço por toda força, incentivo e por poder contar com a amizade de vocês em todos os momentos. Vocês tornaram a minha caminhada mais fácil de ser trilhada.

As alunas de iniciação científica **Francine Osmarini e Camila Ferri**, as quais eu tive a honra de conviver durante estes anos. Obrigada pela amizade, cumplicidade e por me ajudarem a tornar este sonho possível.

A todos os colegas de pós-graduação da área de Patologia bucal, pelo convívio, amizade construída, pela constante aprendizagem e troca de experiências.

As “Endogirls” e aos professores da especialização de Endodontia da Universidade Federal do Rio Grandedo Sul, pela torcida e por todo apoio e incentivo que sempre recebi.

A Alessandra, a Chris e ao Pedro, por todo auxílio que me prestaram, pela convivência e pelo respeito que sempre tiveram comigo.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, na pessoa da diretora **Prof^a. Dr^a. Susana Maria Werner Samuel** e da Vice-Diretora **Prof^a. Dr^a. Deise Ponzoni**, pelo belíssimo trabalho que conduzem e pela oportunidade da realização do curso de Doutorado em Patologia bucal.

Ao Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, **Prof. Dr. Cassiano Kuchenbecker Rosing**, pela competência e por buscar constantemente a melhoria do nosso programa de pós-graduação.

Aos **funcionários da Seção de pós-graduação** da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela presteza com que sempre me atenderam.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela atenção e presteza que sempre atenderam minhas solicitações.

Ao Hospital de clínicas de Porto Alegre, por todo suporte para realização desta pesquisa. Agradeço a Unidade de Patologia Experimental do HCPA, em especial, a **Emily Pilar**, o **Michael Andrade** e ao **Felipe Rachi**, pelo acolhimento, auxílio e pelos momentos partilhados, fica aqui o meu profundo agradecimento.

Aos pacientes envolvidos nesta pesquisa, pela participação. A vocês, o meu eterno respeito e gratidão.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES), pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pelo auxílio financeiro o qual viabilizou a realização desta pesquisa.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADH:** Álcool desidrogenase
- ALDH1:** Aldeído desidrogenase isoforma 1
- AR:** Ácido retinoico
- cDNA:** DNA (Ácido desoxirribonucleico) complementar
- CECP:** Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
- CT:** Centro do tumor
- CTTs:** Células tronco tumorais
- EA:** Epitélio não neoplásico adjacente ao tumor
- E-CAD:** E-caderina
- EMT:** Transição epitélio-mesenquimal
- FOUFRGS:** Faculdade de odontologia da UFRGS
- HCPA:** Hospital de clínicas de Porto Alegre
- MET:** Transição mesênquima-epitelial
- N-CAD:** N-caderina
- NPBO:** Núcleo de pesquisa básica em odontologia
- RAR α :** Receptor do ácido retinóico isoforma alfa
- RAR β :** Receptor do ácido retinóico isoforma beta
- RNAm:** RNA (Ácido ribonucleico) mensageiro
- RXR α :** Receptor do retinoide X isoforma alfa
- RXR β :** Receptor do retinoide X isoforma beta
- UFRGS:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul
- UPE:** Unidade de patologia experimental
- VIM:** Vimentina
- ZI:** Zona de invasão

RESUMO

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) é um problema de saúde pública que apresenta alta taxa de mortalidade, frequentemente relacionado à presença de recorrências locais e metástases. A descoberta de um pequeno subconjunto de células tumorais com características semelhantes às células-tronco, conhecidas como células-tronco tumorais (CTTs), tem sido relatadas como as principais responsáveis pelo início, progressão e recidiva do CECP. O processo de metástase nestas neoplasias é bastante complexo e envolve o desprendimento de células epiteliais tumorais do local de aparecimento primário devido à subexpressão ou superexpressão de algumas proteínas específicas nestas células, caracterizando um processo conhecido como transição epitélio-mesenquimal (EMT). A compreensão dos mecanismos envolvidos no processo de EMT têm sido investigados para o desenvolvimento de terapias específicas. O ácido retinoico (AR) vem sendo empregado em diversas terapias devido a sua capacidade de controlar a proliferação e promover diferenciação celular, entretanto, anormalidades na expressão ou função de seus receptores são relatadas em muitos tipos de células do câncer. Este estudo tem por objetivo correlacionar a expressão de marcadores do processo de EMT, marcador de célula tronco tumoral (ALDH1) e receptores do ácido retinoico e de retinoide X (isoformas α e β) em amostras teciduais provenientes de portadores de CECP primários, além, de correlacionar os resultados obtidos com os parâmetros clínicos, características histopatológicas e prognóstico destes pacientes em um período de acompanhamento de 7 anos.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular, ALDH1, receptores retinoides, transição epitélio-mesenquimal, prognóstico.

ABSTRACT

The head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) is a public health problem that presents high mortality rates in relation to the presence of local recurrences and metastases. A finding of a small subset of tumor cells with stem like-cells characteristics, known as cancer stem cells (CTTs), has been reported as being primarily responsible for the onset, progression and recurrence of CECP. The metastasis process in these neoplasms is quite complex and involves the tumor epithelial cells detachment from the primary site of appearance due to underexpression or overexpression of some specific proteins in these cells, characterizing the epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. An understanding of the mechanisms involved in the EMT process has been investigated for the development of specific therapies. Retinoic acid (AR) has been used in several therapies because its ability to control the proliferation and promote cell differentiation, however, abnormalities in the expression and function of its receptors are reported in many types of cancer cells. The aim of this study was to correlate the expression EMT process markers, tumor stem cell marker (ALDH1), retinoic acid and retinoic acid X receptors (α and β isoforms) in tissue samples from primary CECP, in addition, to correlate the results with the clinical parameters, histopathological and prognostic characteristics of these patients in a 7 years follow-up.

Key words: Squamous cell carcinoma, ALDH1, retinoid receptors, epithelial-mesenchymal transition, prognosis.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	13
ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS.....	15
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
OBJETIVO GERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
ARTIGO CIENTÍFICO 1.....	30
ARTIGO CIENTÍFICO 2.....	51
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	67

INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) constitui-se de uma neoplasia maligna que apresenta elevada incidência, mortalidade e que vêm apresentando uma discreta redução nas taxas de sobrevida nos últimos anos. Muitos são os esforços acerca do desenvolvimento de novas terapias para o CECP e embora essa etapa seja de suma importância, ainda é necessário um melhor entendimento dos diferentes processos envolvidos na carcinogênese e na progressão do tumor.

Evidências vêm sugerindo que um pequeno subconjunto de células tumorais com características semelhantes às células-tronco, conhecidas como células-tronco tumorais (CTTs), possam ser responsáveis pelo início e pela progressão dos tumores, sendo a enzima aldeído desidrogenase 1 (ALDH1) um dos principais marcadores destas células. Entretanto, se sabe que além da existência das CTTs, muitas são as alterações celulares envolvidas para que uma célula adquira um potencial maligno e consiga invadir e se disseminar pelo organismo.

O processo conhecido como transição epitélio-mesênquimal (EMT) tem sido considerado crucial para o desenvolvimento de metástases em CECP. Durante este processo, ocorre a perda ou diminuição da morfologia epitelial das células neoplásicas e aquisição de características mesenquimais, entre elas, propriedades migratórias. A subexpressão de proteínas de junção aderentes é o fator mais importante para tornar a célula epitelial neoplásica, capaz de invadir o conjuntivo subjacente, e disseminar-se através dos vasos sanguíneos e linfáticos.

Assim como a presença de marcadores do processo de EMT, a superexpressão de ALDH1 tem sido associada a tumores com pior prognóstico. Além disto, a ALDH1 sintetiza o ácido retinoico (AR), um importante metabólito do retinol, que ao se ligar a receptores específicos, é capaz de controlar a diferenciação e proliferação celular. Na literatura, a superexpressão desses receptores tem sido associada a melhores taxas de sobrevida para os portadores de vários tipos de neoplasias malignas, inclusive em CECP.

Um melhor entendimento sobre os diferentes processos envolvidos na progressão do tumor e a sua correlação com a evolução do paciente possibilitará, a definição de marcadores específicos para prever prognóstico, bem como, o desenvolvimento de novas terapias-alvo menos agressivas e mais eficientes, elevando os índices de sobrevivência para portadores de CECP.

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

O carcinoma espinocelular (CEC) é amplamente reconhecido como o tipo mais comum de câncer de cabeça e pescoço e considerado um problema de saúde pública (BARNES et al., 2005). Apesar da grande quantidade de pesquisas e avanços científicos, o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP), implica em taxas de incidência, mortalidade e morbidade bastante significativas (JADHAV & GUPTA, 2013). A taxa de sobrevida para portadores desta doença é de cerca de 50% em cinco anos (LIU et al., 2010), sendo que esta, apresentou discreta redução nas últimas décadas (BELLO et al., 2011) devido a alta prevalência de recorrências locais e o surgimento de novos tumores primários (FABRICIUS et al., 2011).

Evidências recentes sugerem que um pequeno subconjunto de células tumorais com características semelhantes às células-tronco e que possuem capacidade migratórias invasivas, (OLIVEIRA et al., 2011; BHAIJEE et al., 2012) conhecidas como células-tronco tumorais (CTTs), possam ser as principais responsáveis pelo início e progressão do tumor em CECP (REYA et al., 2001; KRISHNAMURTHY & NÖR, 2012; HILDEBRAND et al., 2014).

As implicações das CTTs têm atraído cada vez mais atenção dos pesquisadores, incluindo sua detecção precoce e seu prognóstico em CECP. As CTTs podem ser identificadas, principalmente, por meio da evidenciação da molécula de adesão de superfície CD44 e da enzima aldeído desidrogenase isoforma 1 (ALDH1) (JOSHUA et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

A relação entre a expressão de CD44, sobrevida e prognóstico para portadores de CECP ainda não está bem definida na literatura. Enquanto alguns estudos revelam que a imunomarcagem positiva para CD44 implica em pior prognóstico para CECP (KOKKO et al., 2011), outros, demonstram que a subexpressão de CD44 está relacionada a uma menor sobrevida para estes pacientes (CARINCI et al., 2002).

Estudo prévio realizado avaliou a expressão de CD44 e ALDH1 em diferentes áreas do tumor (centro, zona de invasão e epitélio adjacente ao tumor) de CECPs e

correlacionou os resultados com os parâmetros clínicos destes tumores. A imunomarcção do CD44 revelou-se heterogênea entre os tumores e não apresentou relação com prognóstico, em contrapartida, a imunomarcção com ALDH1 mostrou relação direta com tamanho, presença e metástase regional e estadiamento clínico, sugerindo que a imunomarcção positiva para ALDH1 pode identificar tumores de comportamento agressivo (HILDEBRAND et al., 2014).

Aldeído desidrogenase isoforma 1 (ALDH1)

A ALDH1 é uma enzima citosólica responsável pela oxidação de aldeídos intracelulares em ácidos carboxílicos (DUESTER et al., 2008), constituindo a isoforma mais predominante da família da enzima aldeído desidrogenase (MA & ALLAN, 2011).

Por atuar nos estágios iniciais de diferenciação celular esta enzima foi associada como marcador de células que exibem propriedades de auto-renovação em processos patológicos ou fisiológicos (SAYED et al., 2011), no entanto, a evidência da presença de ALDH1 em células indiferenciadas ocorreu em células-tronco hematopoiéticas e por este motivo pôde ser associada como um possível marcador de células-tronco mesenquimais (CLAY et al., 2010; KRISHNAMURTHY et al., 2010).

Estudos têm mostrado, que ALDH1 corresponde a um marcador de CTTs em diferentes tipos de tumores (GINESTIER et al., 2007; MA et al., 2008; JIANG et al., 2009; HUANG et al., 2009; ZHOU et al., 2015), inclusive em CECP, (CHEN et al., 2009) e que a superexpressão desta enzima está associada a piores prognósticos e menor sobrevida para estes pacientes (GINESTIER et al., 2007; DENG et al., 2010; YU et al., 2011; LIANG & SHI, 2012; HILDEBRAND et al., 2014).

Apesar das evidências, a correlação entre ALDH1, características clínico-patológicas de CECP e seus valores prognósticos ainda geram muita discussão. Enquanto alguns pesquisadores não encontraram correlação entre a expressão de ALDH1 e a taxa de sobrevivência em CECP (HUANG et al., 2014), outros relataram que a expressão ALDH1 foi preditiva para a redução de sobrevida destes pacientes (QIAN et al., 2014), incluindo uma meta-análise, que revelou que a expressão de

ALDH1 foi altamente correlacionada com a diferenciação do tumor, metástase linfonodal, redução da sobrevida global e da sobrevida livre de tumor (ZHOU et al., 2014).

Além do fato do ALDH1 estar sendo possivelmente associado à agressividade do tumor, ele exerce também uma função fundamental na síntese do ácido retinoico (AR), um metabólito do retinol muito importante devido a sua capacidade de diferenciação e controle do crescimento celular (SOPRANO et al., 2002).

Os retinoides e o ácido retinoico

Os retinoides são moléculas de sinalização que possuem um importante papel no crescimento, diferenciação e morte celular. O termo retinoides refere-se ao retinol, seus metabólitos e análogos sintéticos que possuem estrutura similar (IOM, 2001).

O retinol é um álcool primário, polietilênico e lipossolúvel, que apresenta grande capacidade reativa (COWARD, 1927). Possui duas formas metabolicamente ativas dentre elas uma em especial, o ácido retinoico (IOM, 2001).

O ácido retinoico (AR) possui a função de promover a diferenciação de vários tipos celulares (MARCUS & COULSTON, 2000), além de regular a taxa de crescimento celular por causar o bloqueio da fase G1 do ciclo celular, aumentando a proporção de células nas fases G0/G1 e o decréscimo de células na fase S (MONGAN & GUDAS, 2007).

A síntese do AR ocorre por meio da oxidação reversível do retinol na forma de retinaldeído por meio da enzima álcool desidrogenase. Após, o retinaldeído formado é irreversivelmente oxidado na forma de ácido retinoico por meio da ação de ALDH1 (MA & ALLAN, 2011). No entanto, a ação do AR é obtida mediante a ligação com seus receptores retinoides específicos: o receptor do ácido retinoico (RAR) e o receptor de retinoide X (RXR), ambos com três isoformas alfa [α], beta [β] e gama [γ] (SWIFT et al., 2006).

Cada receptor retinoide atua como fator de transcrição ligante-ativado na forma de homodímeros ou heterodímeros, ligando-se a elementos responsivos do ácido retinoico, presentes nas regiões promotoras dos genes alvo (SWIFT et al., 2006). Cada subtipo apresenta sequências distintas e um padrão de expressão

diferenciado durante o desenvolvimento embrionário daquele em tecidos adultos (DE THE, 1996).

Dentre os subtipos de RAR a isoforma α é expressa mais comumente, enquanto, as isoformas β e γ possuem um padrão de expressão mais restrito, em contrapartida, a isoforma β possui um padrão mais amplo de expressão, enquanto, que a α e γ possuem uma expressão mais restrita em receptores do tipo RXR (ROSS et al., 2000).

Devido ao fato do AR estar relacionado ao controle da proliferação e desenvolvimento celular e de se ligar a receptores nucleares que regulam a transcrição, houve um considerável interesse em estudar o efeito deste metabólito sobre a carcinogênese (GÜZEY et al., 1998; LAM et al, 2001).

Efeitos benéficos do AR sobre importantes determinantes do comportamento metastático em carcinomas foliculares de tireoide foram identificados, dentre eles, o aumento da organização da E-caderina ao longo da membrana celular, diminuição da degradação da matriz extracelular e um aumento da ligação à matriz extracelular (HAVEKES et al., 2000).

Anos mais tarde, foi demonstrado que diferenças na expressão dos receptores RAR e RXR poderiam ser empregadas para o diagnóstico em neoplasias da tireoide, devido ao aumento da expressão citoplasmática de RAR α , RAR γ , RXR β e redução da expressão nuclear de RAR β , RAR γ e RXR α em amostras de carcinoma comparado ao tecido saudável (HOFTIJZER et al., 2009).

Anormalidades na expressão ou na função dos receptores retinoides, especialmente a supressão da expressão de RAR β , têm sido relatadas em muitos tipos de células do câncer, incluindo células de CECF (XU & LOTAN, 1999; YOUSSEF et al., 2004). Acredita-se que estas alterações podem estar envolvidas na resistência dos tumores aos efeitos dos retinoides (HU et al., 1991).

Recentemente, estudo inédito provou a importância clínica da expressão dos receptores retinoides e sua relação com a sobrevida de portadores de adenocarcinoma ductal de pâncreas (ADP), pois, encontrou-se uma subexpressão de receptores retinoides (RAR α , RAR β , RXR α e RXR β) em ADP comparada às amostras de pâncreas saudável, no entanto superexpressão de RAR α e RXR β associava-se a melhores taxas de sobrevivência para estes pacientes (BLEUL et al., 2015).

Outro aspecto importante, encontrado ainda no estudo realizado por BLEUL et al., (2015), foi que esta mesma expressão reduzida de receptores retinoides em ADP, correlacionava-se também, com a expressão de alguns marcadores do processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT).

Transição epitélio-mesenquimal (EMT)

O processo de metástase no câncer bucal envolve o desprendimento de células tumorais, regulação da motilidade celular e invasão, e a proliferação e evasão através do sistema linfático ou dos vasos sanguíneos (NOGUTI et al., 2012). Isto ocorre devido à redução da adesão intercelular de células tumorais à medida que progridem para a malignidade devido a subexpressão de E-caderina (proteína transmembrana importante na ligação inter-celular) e superexpressão de proteínas como a vimentina e a N-caderina, as quais interferem com a polaridade celular. Esta transição morfológica, conhecida como transição epitélio-mesenquimal (EMT) desempenha um papel muito importante nas metástases tumorais, pois, acarreta em alterações moleculares que interferem com o comportamento dessas células (HIRSHBERG et al., 2008; SAKAMOTO et al., 2012).

Usualmente, as características de células que sofrem EMT é a subexpressão de marcadores epiteliais como a E-caderina e a aquisição simultânea de marcadores mesenquimais como a Vimentina e N-caderina, resultando em aumento da mobilidade, invasibilidade e potencial metastático (MILSOM et al., 2008; KALLURI & WEINBERG, 2009; KRISANAPRAKORNIKIT & IAMAROON, 2012).

Estas características podem ser comprovadas pelo estudo realizado por ZHANG et al., (2014), os quais observaram que as células tumorais que se aproximavam dos vasos sanguíneos exibiam características de EMT (baixa expressão de E-caderina e alta expressão de Vimentina), em contrapartida, as células tumorais que se encontravam no lúmen dos vasos apresentavam características de transição mesenquimal-epitelial (MET), ou seja, superexpressão de E-caderina e subexpressão de Vimentina sugerindo que uma vez que as células epiteliais já tenham invadido através do tecido conjuntivo, elas rapidamente voltam ao seu fenótipo epitelial de origem.

As mesmas características do processo de EMT também foram encontradas no estudo realizado por GASPAROTTO et al., (2011), os quais avaliaram o papel da expressão de genes relacionados com o processo de EMT em amostras de CECP e amostras de mucosa saudável. Eles observaram que os níveis de RNAm da N-caderina e da Vimentina estavam significativamente aumentados nas amostras tumorais comparado as amostras de mucosa saudável, o oposto ocorria com a E-caderina, a qual apresentava tendência de redução nas amostras tumorais em relação ao tecido normal.

Sabe-se que subexpressão de E-caderina é um fator muito importante no processo de EMT, pois parece estar correlacionada com a progressão do tumor (ZHANG et al., 2012). Levando em consideração esta hipótese, PECTASIDES et al., (2014), estudaram o papel de alguns marcadores do processo de EMT, dentre estes a E-caderina, no prognóstico de pacientes com CECP. Como resultados, a alta expressão de E-caderina relacionou-se a 5 anos de sobrevida livre a mais e maior sobrevida global comparada as amostras com baixa expressão de E-caderina.

Este trabalho visa testar a hipótese de que a subexpressão dos receptores retinoides bem como a superexpressão de ALDH1 e dos marcadores do processo de EMT, implicam em um pior prognóstico para portadores de CECP.

Observou-se na literatura, que a maioria dos trabalhos avaliam amostras tumorais completas, sem atentar para o papel desempenhado pelo tecido conjuntivo e pelo microambiente tumoral.

A utilização de amostras previamente microdissectadas a laser, evitam estas possíveis interferências, levando a resultados mais confiáveis, e ao entendimento mais fiel sobre os diferentes processos envolvidos na progressão do tumor bem como das variações sobre seu desfecho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization. Classification of tumors. Pathology and genetics head and neck. Lyon: IARC Press, 2005, p.430.

Bello IO, Vered M, Dayan D, Dobriyan A, Yahalom R, Alanen K, Nieminen P, Kantola S, Läärä E, Salo T. Cancer-associated fibroblasts, a parameter of the tumor microenvironment, overcomes carcinoma-associated parameters in the prognosis of patients with mobile tongue cancer. *Oral Oncol* 2011;47:33-8.

Bhajjee F, Pepper DJ, Pitman KT, Bell D. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: a review of current knowledge and future applications. *Head Neck* 2012; 34:894–9.

Bleul T, Rühl R, Bulashevskaya S, Karakhanova S, Werner J, Bazhin AV. Reduced retinoids and retinoid receptors' expression in pancreatic cancer: A link to patient survival. *Mol Carcinog* 2015; 54:870-9.

Carinci F, Stabellini G, Calvitti M, Pelucchi S, Targa L, Farina A, Pezzetti F, Pastore A. CD44 as prognostic factor in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Craniofac Surg* 2002;13(1):85-9.

Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH, Chen DT, Tai LK, Yung MC, Chang SC, Ku HH, Chiou SH, Lo WL. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2009;385(3):307-13.

Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, Wicha MS, Prince ME. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck* 2010;32(9):1195-201.

Coward KH. Influence of light and heat on formation of vitamin A in plant tissues. *J Biol Chem* 1927;72: 781-99.

de The H. Altered retinoic acid receptors. *Faseb J* 1996;10:955-60.

Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q, Li C, Wang LP, Roby KF, Orsulic S, Connolly DC, Zhang Y, Montone K, Bützow R, Coukos G, Zhang L. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *PLoS One* 2010;5(4):e10277.

Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis. *Cell* 2008;134(6):921-31.

Fabricius EM, Kruse-Boitschenko U, Schneeweiss U, Wildner GP, Hoffmeister B, Raguse JD. Model examination of chemoprevention with retinoids in squamous cell carcinomas of the head and neck region and suitable biomarkers for chemoprevention. *Int J Oncol* 2011; 39(5):1083-97.

Gasparotto D, Polesel J, Marzotto A, Colladel R, Piccinin S, Modena P, Grizzo A, Sulfaro S, Serraino D, Barzan L, Doglioni C, Maestro R. Overexpression of TWIST2 correlates with poor prognosis in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Oncotarget* 2011; 2(12):1165-75.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 2007;1(5):555-67.

Güzey M, Demirpençe E, Criss W, De Luca HF. Effects of retinoic acid (all-trans and 9-cis) on tumor progression in small-cell lung carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;242:369-75.

Havekes B, Schröder van der Elst JP, van der Pluijm G, Goslings BM, Romijn JA, Smit JW. Beneficial effects of retinoic acid on extracellular matrix degradation and attachment behaviour in follicular thyroid carcinoma cell lines. *J Endocrinol* 2000;167:229-38.

Hildebrand LC, Carvalho AL, Lauxen IS, Nör JE, Cerski CTS, Sant'Ana Filho M. Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2014;43(7):499-506.

Hirshberg A, Shnaiderman-Shapiro A, Kaplan I and Berger R: Metastatic tumours to the oral cavity – pathogenesis and analysis of 673 cases. *Oral Oncol* 2008;44:743-52.

Hoftijzer HC, Liu YY, Morreau H, van Wezel T, Pereira AM, Corssmit EP, Romijn JA, Smit JW. Retinoic acid receptor and retinoid X receptor subtype expression for the differential diagnosis of thyroid neoplasms. *Eur J Endocrinol* 2009;160(4):631-8.

Hu L, Crowe DL, Rheinwald JG, Chambon P, Gudas LJ. Abnormal expression of retinoic acid receptors and keratin 19 by human oral and epidermal squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1991;51:3972–3981.

Huang CF, Xu XR, Wu TF, Sun ZJ, Zhang WF. Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. *J Oral Pathol Med* 2014;43(7):492-8.

Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, Boman BM. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 2009;69(8):3382-9.

IOM (Institute of Medicine). Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. 2001.

Jadhav KB, Gupta N. Clinicopathological Prognostic Implicators of Oral Squamous Cell Carcinoma: Need to Understand and Revise. *N Am J Med Sci* 2013;5(12):671-79.

Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd NW, Deepak J, Xing L, Wang H, Liu Z, Su Y, Stass SA, Katz RL. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res*. 2009;7(3):330-8.

Joshua B, Kaplan MJ, Doweck I, Pai R, Weissman IL, Prince ME, et al. Frequency of cells expressing CD44, a head and neck cancer stem cell marker: correlation with tumor aggressiveness. *Head Neck* 2012;34(1):42-9.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009;119:1420-28.

Kokko LL, Hurme S, Maula SM, Alanen K, Grénman R, Kinnunen I, Ventelä S. Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011;47(6):510-6.

Krisanaprakornkit S, Iamaroon A. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *ISRN Oncol* 2012; 681469.

Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, Wicha MS, Nör JE. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res* 2010;70(23):9969-78.

Krishnamurthy S, Nör JE. Head and neck cancer stem cells. *J Dent Res* 2012;91:334–40.

Lam PK, To EWH, Chan ESY, Liew CT, Lung IWH, King WK. In vitro inhibition of head and neck cancer-cell growth by human recombinant interferon α and 13-cis retinoic acid. *Br J Biomed Sci* 2001;58:226-9.

Liang D, Shi Y. Aldehyde dehydrogenase-1 is a specific marker for stem cells in human lung adenocarcinoma. *Med Oncol* 2012; 29(2):633-9.

Liu W, Wang YF, Zhou HW, Shi P, Zhou ZT, Tang GY. Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients. *BMC Cancer* 2010; 10:685.

Ma I, Allan AL. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev* 2011;7(2):292-306.

Ma S, Chan KW, Lee TK, Tang KH, Wo JY, Zheng BJ, Guan XY. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. *Mol Cancer Res* 2008;6(7):1146-53.

Marcus R, Coulston AM. Fat-soluble vitamins: vitamins A, K and E. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, editors. *Goodman and Gilman's the pharmacologic basis of therapeutics*. 10th edition. New York: Mc Graw Hill, 2000, p.1773-92.

Milsom CC, Yu JL, Mackman N, Micallef J, Anderson GM, et al. Tissue Factor Regulation by Epidermal Growth Factor Receptor and Epithelial-to-Mesenchymal Transitions: Effect on Tumor Initiation and Angiogenesis. *Cancer Res* 2008;68:10068–76.

Mongan NP, Gudas LJ. Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. *Differentiation* 2007;75:853–70.

Noguti J, De Moura CF, De Jesus GP, Da Silva VH, Hossaka TA, Oshima CT, Ribeiro DA. Metastasis from Oral Cancer: An Overview *Cancer Genomics Proteomics* 2012;9(5):329-35.

Oliveira LR, Oliveira-Costa JP, Araujo IM, Soave DF, Zanetti JS, Soares FA. Cancer stem cell immunophenotypes in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011;40:135-42.

Pectasides E, Rampias T, Sasaki C, Perisanidis C, Kouloulis V, Burtneess B, Zaramboukas T, Rimm D, Fountzilias G, Psyrri A. Markers of Epithelial to

Mesenchymal Transition in Association with Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). *Plos One* 2014;9(4):e94273.

Qian X, Wagner S, Ma C, Coordes A, Gekeler J, Klussmann JP, Hummel M, Kaufmann AM, Albers AE. Prognostic significance of ALDH1A1-positive cancer stem cells in patients with locally advanced, metastasized head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014;140(7):1151-8.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001;414:105–11.

Ross SA, McCaffery PJ, Drager UC, De Luca LM. Retinoids in embryonal development. *Physiol Rev* 2000;80(3):1021-54.

Sakamoto K, Imanishi Y, Tomita T, Shimoda M, Kameyama K, Shibata K, Sakai N, Ozawa H, Shigetomi S, Fujii R, Fujii M, Ogawa K. Overexpression of SIP1 and downregulation of E-cadherin predict delayed neck metastasis in stage I/II oral tongue squamous cell carcinoma after partial glossectomy. *Ann Surg Oncol* 2012;19:612-9.

Sayed SI, Dwivedi RC, Katna R, Garg A, Pathak KA, Nutting CM, Rhys-Evans P, Harrington KJ, Kazi R. Implications of understanding cancer stem cell (CSC) biology in head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol* 2011;47(4):237-43

Soprano KJ, Soprano DR. Retinoic acid receptors and cancer. *J Nutr* 2002;132(12):3809S-3813S.

Swift ME, Wallden B, Wayner EA, Swisshelm K. Truncated RAR beta isoform enhances proliferation and retinoid resistance. *J Cell Physiol* 2006; 209(3):718-25.

Xu X, Lotan R. Aberrant expression and function of nuclear retinoid receptors in cancer. In: H. Nau, and W. S. Blaner (eds.), *The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action. Handbook of Experimental Pharmacology, Vol. 139*, pp. 323–343. Berlin: Springer Verlag, 1999.

Youssef EM, Lotan D, Issa JP, Wakasa K, Fan YH, Mao L, Hassan K, Feng L, Lee JJ, Lippman SM, Hong WK, Lotan R. Hypermethylation of the retinoic acid receptor-beta(2) gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004; 10(5):1733-42.

Yu C, Yao Z, Dai J, Zhang H, Escara-Wilke J, Zhang X, Keller ET. ALDH activity indicates increased tumorigenic cells, but not cancer stem cells, in prostate cancer cell lines. *In Vivo* 2011;25(1):69-76.

Zhang Z, Dong Z, Lauxen IS, Filho MS, Nör JE. Endothelial Cell-Secreted EGF Induces Epithelial to Mesenchymal Transition and Endows Head and Neck Cancer Cells with Stem-like Phenotype. *Cancer Res* 2014;74(10):2869-81.

Zhang Z, Filho MS, Nör JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol* 2012;48:1-9.

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; 50(12):1144-8.

Zhou F, Mu YD, Liang J, Liu ZX, Zhou D, Ning WL, Li YZ, Ding D, Zhang JF. Aldehyde dehydrogenase 1: a specific cancer stem cell marker for human colorectal carcinoma. *Mol Med Rep* 2015;11(5):3894-9.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Avaliar a imunexpressão de E-CAD, N-CAD, VIM e ALDH1 bem como a expressão gênica destes mesmos marcadores, receptores do ácido retinoico (RAR α , RAR β) e receptores do retinoide X (RXR α , RXR β) em diferentes áreas de CECPs primários e epitélio não neoplásico adjacente a estes tumores, correlacionando os resultados obtidos com os parâmetros clínicos, características histopatológicas e evolução (favorável ou desfavorável) destes pacientes em um período de acompanhamento de 7 anos.

Objetivos específicos

- Avaliar a imunexpressão de E-caderina, N-caderina, Vimentina e ALDH1 no centro do tumor, zona de invasão e epitélio não neoplásico adjacente ao tumor em amostras de CECPs primários e correlacionar os resultados obtidos com os parâmetros clínicos, características histopatológicas e evolução (favorável ou desfavorável) destes pacientes em um período de acompanhamento de 7 anos.
- Avaliar a expressão gênica de E-caderina, N-caderina, Vimentina e ALDH1 em ilhas tumorais de CECPs primários e epitélio não neoplásico adjacente ao tumor, isolados a partir da técnica de microdissecção a laser, correlacionando os resultados obtidos com os achados imunoistoquímicos, amostras de mucosa normal, parâmetros clínicos, características histopatológicas e evolução (favorável ou desfavorável) destes pacientes em um período de acompanhamento de 7 anos.

- Avaliar a expressão gênica de receptores do ácido retinoico ($RAR\alpha$, $RAR\beta$), receptores de retinoide X ($RXR\alpha$, $RXR\beta$) e ALDH1 em ilhas tumorais de CECPs primários e epitélio não neoplásico adjacente ao tumor, isolados a partir da técnica de microdissecção a laser, correlacionando os resultados obtidos com os achados encontrados em mucosa normal, parâmetros clínicos, características histopatológicas e evolução (favorável ou desfavorável) destes pacientes em um período de acompanhamento de 7 anos.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico "*Cancer Research*" (Qualis Odontologia A1 – Ano Base 2016, fator de impacto 9.122).

EXPRESSÃO DE ALDH1 E DE MARCADORES DE EMT EM CECP: RELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO APÓS SETE ANOS DE ACOMPANHAMENTO

RESUMO

Este trabalho visou avaliar a expressão de ALDH1 e marcadores do processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT) em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP), correlacionando com os parâmetros clínicos, histopatológicos e evolução dos pacientes em um período de 7 anos. 17 CECPs primários e o tecido epitelial não neoplásico adjacente (EA) foram submetidos a técnica de microdissecção a laser e PCR em tempo real para avaliação da expressão gênica de ALDH1, E-caderina (E-CAD), N-caderina (N-CAD), Vimentina (VIM). Foi realizada a técnica de imunistoquímica para as mesmas proteínas, avaliando o centro do tumor, zona de invasão e EA. Quanto ao ALDH1, foi atribuído o escore 1 (<5%) e escore 2 ($\geq 5\%$) de células imunopositivas; para as demais proteínas atribuiu-se escore 1 (0-50%) e escore 2 (51-100%). A alta imunomarcagem de ALDH1 associou-se a um pior prognóstico para os portadores de CECP. Quanto ao processo de EMT, não foi possível prever prognóstico para os parâmetros utilizados. A análise da expressão gênica pós microdissecção a laser, permitiu uma análise mais completa e específica das células epiteliais neoplásicas, demonstrando que mesmo havendo produção de RNAm muitas vezes o mecanismo de tradução para a forma de proteína não ocorre. Com este estudo, concluímos que a alta expressão de ALDH1 está associada a um pior prognóstico para os portadores de CECP, entretanto, o processo de EMT devido a sua intensa variabilidade inerente das proteínas envolvidas neste mecanismo, necessita de mais estudos que permitam comprovar

seu valor prognóstico utilizando-se a associação entre a imunomarcacão e expressão gênica.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular, cabeça e pescoço, ALDH1, transição epitélio-mesenquimal, prognóstico.

INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) corresponde ao sexto tipo de câncer mais frequentemente encontrado no mundo, sendo mais do que 90% destes tumores do tipo espinocelular (1). Apesar dos diversos estudos sobre a carcinogênese e da tentativa de melhorar a qualidade de vida destes pacientes, a taxa de sobrevivência ainda permanece baixa nas últimas décadas, em torno de 50% em cinco anos. (2, 3). Isto, se atribui principalmente devido as recorrências e ao surgimento de novos tumores primários (4).

Evidências sugerem que uma pequena população de células, denominadas células-tronco tumorais (CTTs), desempenham um papel importante na recorrência de tumores e metástases em CECP (5, 6). A enzima ALDH1 tem sido utilizada como marcador de CTTs, sendo que sua alta expressão associa-se a tumores com maior capacidade de invasão, metástases e pior prognóstico (7).

Previamente foi estudada a expressão de ALDH1 em CECP avaliando as seguintes áreas: centro do tumor (CT), zona de invasão (ZI) e epitélio adjacente não neoplásico ao tumor (EA) e concluiu-se que a ALDH1 foi capaz de identificar tumores com o comportamento clínico mais agressivos (8). No entanto, torna-se necessário um melhor entendimento de outros processos envolvidos na carcinogênese e na progressão do tumor, visando compreender os mecanismos utilizados pelas células para disseminar e invadir sítios mais distantes (9, 10, 11).

Durante o processo de metástase, as células tumorais estacionárias provenientes do epitélio tornam-se migratórias e invasivas. Um evento chave envolvido neste processo é a transição epitélio-mesenquimal (EMT) (12). Células em EMT deixam de exibir características epiteliais e adquirem um fenótipo mesenquimal (expressão de VIM e/ou N-CAD), resultando em aumento da mobilidade, invasibilidade e potencial metastático (13, 14, 15). Uma vez que as células epiteliais

já tenham invadido os tecidos adjacentes, elas retornam ao seu fenótipo epitelial de origem, caracterizando um o processo inverso, conhecido como transição mesenquimal-epitelial (MET) (11, 16).

Os mecanismos de EMT e MET são eventos dinâmicos, podendo determinar estados intermediários latentes ou ativos do tumor e possibilitando inúmeros ciclos de invasões e metástases (17, 18) – Figura 1. Em um estado conhecido como EMT transicional ou híbrido, as células não necessariamente precisam adquirir características mesenquimais. Já a fase inicial de EMT, pode envolver apenas uma diminuição das características epiteliais, mesmo quando apresentam características mesenquimais. Estas heterogeneidades, podem refletir em diferentes comportamentos biológicos durante a migração e invasão tumoral (19, 20).

Levando em consideração a inexistência de estudos que avaliam o processo de EMT em diferentes áreas do CECP e em EA, o objetivo deste trabalho foi avaliar a imunopressão de E-CAD, N-CAD, VIM e ALDH1 em CT, ZI e EA e expressão gênica (CT e EA) de amostras de CECPs primários e correlacionar os resultados obtidos com os parâmetros clínicos, características histopatológicas e evolução destes pacientes em um período de acompanhamento de 7 anos.

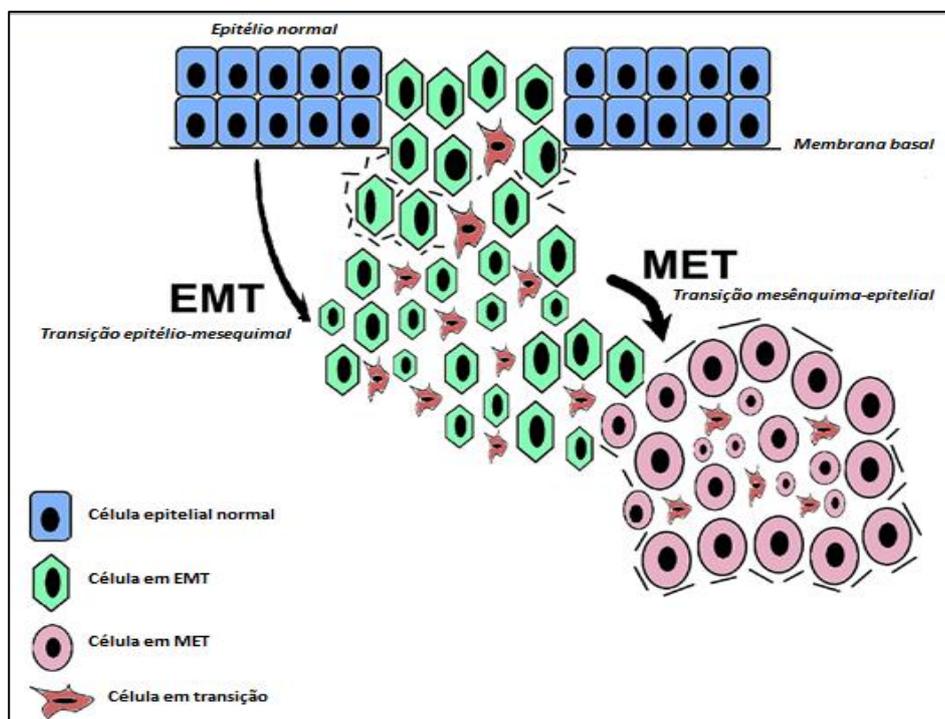


Figura 1- Processos envolvidos na invasão e disseminação do CECP. Transição epitélio-mesênquimal (EMT), fase de transição e transição mesênquima-epitelial (MET).

METODOLOGIA

- Descrição da amostra

Para realização deste estudo foi utilizada amostra composta por 17 blocos de parafina e 34 tecidos frescos (17 ZIs e 17 EAs) de pacientes portadores de CECPs primários, sem tratamento prévio, atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre –HCPA em 2009 e 2010 (CAAE:46562115.3.0000.5347). A fim de comparação foram incluídas quatro amostras de mucosa normal humanas provenientes de retalhos cirúrgicos para extração de terceiros molares inclusos (CAAE: 26759114.9.0000.5327).

- Características clínicas e histopatológicas dos tumores

Os dados referentes à localização e estadiamento do tumor foram obtidos nos prontuários do HCPA. A graduação histopatológica foi realizada por dois patologistas previamente calibrados, de acordo com os critérios de BRYNE et al., (1992) (21).

Os pacientes incluídos neste estudo foram subdivididos em dois grupos conforme o desfecho após 7 anos (Grupo 1: vivos e sem recidiva do tumor; Grupo 2: óbito pelo tumor, recidiva ou metástase).

- Microdissecção a laser

Em um criostato foram realizados cortes de 22 micrometros de espessura de cada amostra, os quais foram transferidos para uma lâmina PALM® MembraneSlides (Zeiss®, DEU) previamente esterilizada e brevemente aquecida, deixando-os secar a -20°C durante 2-3 minutos. A cada troca de amostra foi realizada a limpeza do criostato e a troca da navalha e de todos instrumentais. Em seguida realizou-se a incubação da lâmina em etanol 70%, durante 2 minutos. Posteriormente prosseguiu-se com a coloração em acetato de cresil violeta 1% (Sigma-Aldrich®, EUA) por 30 segundos, e lavagem com etanol 70% e 100%. As lâminas foram mantidas imersas em etanol 100% até o momento de corte, após, foi realizada secagem em temperatura ambiente durante 1-2 minutos. A técnica de microdissecção foi realizada com o microdissector a laser “PALM Microbeam IP Z” (Zeiss®, DEU) seguindo as instruções do fabricante.

- Análise de expressão gênica

A extração de RNA e posterior síntese do cDNA das áreas previamente dissecadas foi realizada com auxílio dos Kits RNeasy Micro kit (Qiagen[®], EUA), e SuperScript[®] VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen[®], EUA) respectivamente, seguindo as instruções do fabricante. Após, as amostras de cDNA obtidas foram submetidas à análise por PCR em tempo real para análise de expressão gênica dos marcadores do processo de EMT e ALDH1.

Para a análise de expressão gênica foram utilizados os primers TaqMan[®] para E-CAD (Hs01023894_m1), N-CAD (Hs00983056_m1), VIM (Hs00185584_m1) e para ALDH1 (Hs00946916_m1) - Life Technologies[®], EUA. Todas as reações foram realizadas em triplicatas e normalizadas para GAPDH (Hs99999905_m1) e β -actina (Hs99999903_m1) - Life Technologies[®], EUA. Como controle positivo foi utilizada uma amostra previamente testada e como controle negativo foi utilizado o mesmo mix para reação de RT-PCR, porém, não contendo cDNA. Por fim, as reações foram levadas ao termociclador Step One Plus[®] (Life Technologies[®], EUA) para análise de expressão gênica de cada marcador.

- Imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica foi desenvolvida de acordo com o quadro 1. Todas as reações foram acompanhadas de controles positivos e como controle negativo foi realizado a supressão do anticorpo primário.

Quadro 1: Marca comercial, diluição, tipo de recuperação antigênica e tempo de incubação e controle positivo para cada anticorpo avaliado

<i>Anticorpo</i>	<i>Marca/Clone</i>	<i>Diluição</i>	<i>Recuperação antigênica</i>	<i>Tempo incubação</i>	<i>Controle positivo</i>
E-caderina*	Cell Signaling [®] Clone 24E10 (coelho)	1:200	Panela de pressão (115°C – 3'30")	Overnight (4°C)	Tecido epitelial
N-caderina*	Abcam [®] Clone AB18203 (coelho)	1:300	Panela de pressão (115°C – 3'30")	Overnight (4°C)	Tecido nervoso
Vimentina*	Dako [®] Clone V9 (rato)	1:100	Panela de pressão (110°C – 3')	Overnight (4°C)	Schwanoma
ALDH1*	BD Biosciences [®] Clone 44 (camundongo)	1:50	Panela de pressão (110°C – 3')	Overnight (4°C)	Glândula salivar

*Sistema de detecção: Envision dual link; (Dako[®], Carpinteria, USA); Revelações: Diaminobenzidina (Dako[®], Carpinteria, USA); Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer

- Quantificação da imunohistoquímica e reprodutibilidade

A expressão imunohistoquímica para cada marcador foi avaliada nas diferentes zonas de interesse, por dois avaliadores previamente calibrados, utilizando microscopia de luz em um aumento final de 400X. Foram consideradas imunomarcagem positiva para E-CAD (membrana), N-CAD (citoplasma e núcleo) e VIM (membrana), as células que apresentarem a coloração marrom, independentemente da intensidade da marcação, atribuindo-se o escore 1 (0-50% de células imunopositivas) e escore 2 (51-100% de células imunopositivas).

Quanto a ALDH1, foram consideradas positivas as células que apresentavam imunomarcagem em citoplasma, atribuindo-se escore 1 (<5% de células imunopositivas) e escore 2 (\geq 5% de células imunopositivas) (8). A reprodutibilidade foi confirmada no decorrer do estudo, onde a cada 10 lâminas avaliadas uma era sorteada para re-avaliação após um período de 7 dias (Kappa >0,7) – Figura 2.

- Análise do processo de EMT em amostras tumorais e classificação do EA

As amostras tumorais foram classificadas em EMT (baixa expressão de E-CAD, e alta expressão de N-CAD e/ou VIM), MET (alta expressão de E-CAD, e baixa expressão de N-CAD e/ou VIM) ou fase híbrida (tumores que não se enquadravam nos critérios de EMT ou MET). Para o EA utilizou-se uma definição qualitativa - normal (alta expressão de E-CAD, e baixa expressão de N-CAD e VIM) ou alterado (quando esta imunomarcagem apresentava padrões distintos).

- Análise estatística

Foram utilizados os testes do Qui-quadrado de Pearson e teste exato de Fisher para verificar a associação entre a expressão imunohistoquímica e as demais variáveis. As análises de expressão gênica e sua relação com as variáveis de estudo, foram comparados pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, através do software SPSS versão 21 (IBM Corporation, EUA).

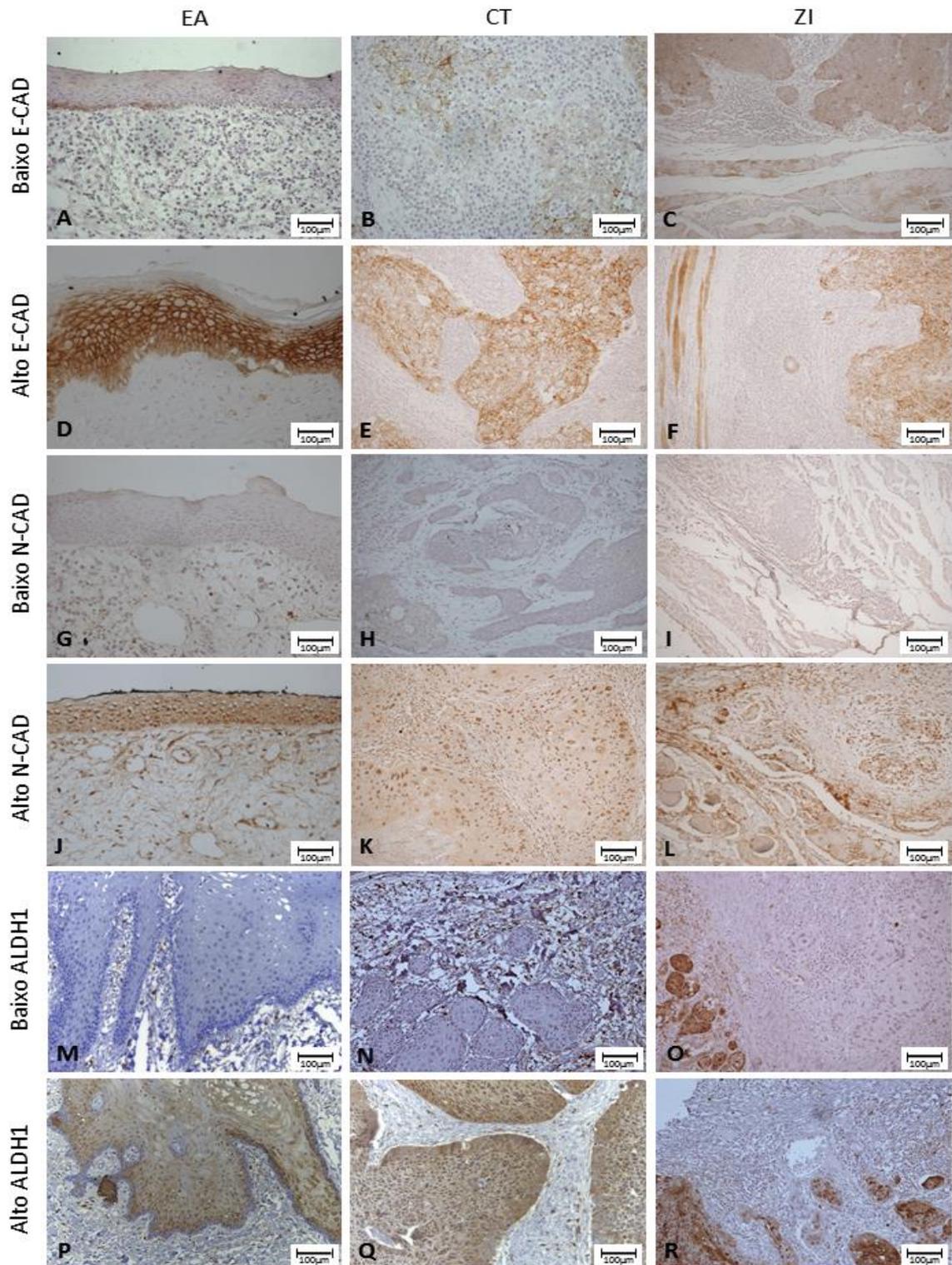


Figura 2: Expressão imunistoquímica dos diferentes marcadores em cada zona de interesse. **A:** baixa expressão de E-CAD no EA; **B:** baixa expressão de E-CAD no CT; **C:** baixa expressão de E-CAD na ZI; **D:** alta expressão de E-CAD no EA; **E:** alta expressão de E-CAD no CT; **F:** alta expressão de E-CAD na ZI; **G:** baixa expressão de N-CAD no EA; **H:** baixa expressão de N-CAD no CT; **I:** baixa expressão de N-CAD na ZI; **J:** alta expressão de N-CAD no EA; **K:** alta expressão de N-CAD no CT; **L:** alta expressão de N-CAD na ZI; **M:** baixa expressão de ALDH1 no EA; **N:** baixa expressão de ALDH1 no CT; **O:** baixa expressão de ALDH1 na ZI; **P:** alta expressão de ALDH1 no EA; **Q:** alta expressão de ALDH1 no CT; **R:** alta expressão de ALDH1 na ZI. Aumento original de 200x. FONTE: Patologia bucal/FOUFRGS.

RESULTADOS

A média de idade dos pacientes foi de 53,3 anos (39 a 70) no Grupo 1 e 60,2 anos (48 a 72) no Grupo 2. A maioria dos indivíduos eram homens (Grupo 1: 85,7% e Grupo 2: 100%) e cor da pele branca (Grupo 1: 57,1% e Grupo 2: 90%). Entretanto, em relação ao consumo de bebidas alcóolicas e tabaco a maioria era etilista e tabagista (57,1%) no Grupo 1 e ex-etilistas (60%) e ex-tabagistas (80%) no Grupo 2. Observou-se ainda, que a maioria dos indivíduos do Grupo 1 possuíam tumores de tamanhos T1 e T2 (85,7%) com ausência de metástase regional (71,4%) e localizados na cavidade bucal (57,1%). No Grupo 2, houve prevalência de tumores de maior tamanho (T3 e T4) com presença de metástase regional e localizados na cavidade bucal (ambos com taxa de 60% respectivamente) - Tabela 1.

Análises de expressão gênica

Encontramos níveis “borderline” de significância ($p=0,05$), quanto a superexpressão de ALDH1 no EA e subexpressão desta em amostras tumorais, quando comparadas a mucosa normal (Figura 3).

Nas amostras tumorais a superexpressão de ALDH1 foi relacionada com a presença de metástase regional, e sua subexpressão com ausência de linfonodos positivos ($p=0,021$) – Tabela 2.

Outra tendência ocorreu em relação a E-CAD em amostras tumorais ($p=0,051$), sendo que sua superexpressão associava-se a uma evolução favorável e sua subexpressão a uma evolução desfavorável (Tabela 2). Observou-se também, que a expressão relativa de E-CAD foi maior no tumor e menor no EA quando comparadas à mucosa normal, embora esta relação não tenha sido significativa (Figura 3).

Em relação à expressão relativa de N-CAD, observou-se que esta se encontra subexpressa em amostras de tumor e superexpressa no EA quando comparadas à mucosa normal, no entanto, não houve relação estatisticamente significativa (Figura 3).

Foi encontrada relação estatisticamente significativa quanto a expressão relativa de VIM ($p=0,004$), entre as amostras de tumor (proteína superexpressa) e EA (subexpressa) - Figura 3.

Análises imunoistoquímicas

Durante o processamento da técnica de imunoistoquímica, 3 amostras tiveram de ser excluídas, permanecendo a amostragem final com 14 indivíduos.

- Expressão de ALDH1 na ZI, CT e EA

A subexpressão de ALDH1 associou-se a um desfecho favorável e a sobre-expressão desta com a evolução desfavorável tanto em ZI ($p=0,023$) como no CT ($p=0,031$). Observou-se também que a subexpressão de ALDH1 em ZI foi associada a ausência de metástase regional e a sobre-expressão desta com a presença de metástase regional ($p=0,031$).

A imunomarcagem de ALDH1 no EA em ambos grupos não mostrou diferenças significativas, ao contrário, apresentou comportamento semelhante.

Não houve relação estatisticamente significativa entre as demais variáveis estudadas e a imunoexpressão de ALDH 1 em ZI, CT e EA (Tabela 3) .

- Expressão de E-CAD em ZI, CT e EA

A subexpressão de E-CAD no CT associou-se a uma evolução favorável e sua sobre-expressão a um desfecho desfavorável ($p=0,031$).

Não houve relação estatisticamente significativa entre as demais variáveis estudadas e a imunoexpressão de E-CAD em ZI, CT e EA (Tabela 3).

- Expressão de N-CAD em ZI, CT e EA

Não houve relação estatisticamente significativa entre o desfecho e as variáveis estudadas quanto a imunoexpressão de N-CAD em ZI, CT e EA (Tabela 3).

- Expressão de VIM em ZI, CT e EA

Em relação a VIM, observou-se um percentual de 100% do escore 1 nas três zonas estudadas de ambos os grupos. Por se tratar de uma variável constante não foi realizada análise estatística.

EMT, fase de transição e MET na ZI e CT

Na ZI uma amostra se encontrava em EMT, dez na fase híbrida e três no processo de MET. Mesmo não ocorrendo diferença estatisticamente significativa entre estas variáveis (EMT/Transição/MET) e o desfecho, foi possível verificar associação significativa entre a baixa expressão de E-CAD e a fase híbrida assim como a alta expressão desta proteína com o processo de MET ($p=0,011$). Adicionalmente, observamos associação entre tumores moderadamente diferenciados e a fase híbrida e entre os indiferenciados e MET ($p=0,003$) -Tabela 4

No CT uma amostra se encontrava em EMT, oito estavam na fase híbrida e cinco no processo de MET. Foi encontrada associação entre a evolução favorável e fase híbrida, bem como o desfecho desfavorável e o processo de MET ($p=0,048$). Outra associação significativa se deu em relação a expressão de E-CAD que quando subexpressa associa-se a fase híbrida e quando sobre-expressa se relaciona com MET ($p=0,003$) -Tabela 4.

Análise do EA

No EA a superexpressão de E-CAD associou-se ao epitélio normal e sua subexpressão à epitélios com alteração ($p=0,027$).

Não houve resultados significativos entre o desfecho e as demais variáveis estudadas em relação ao EA – Tabela 5.

Tabela 1. Perfil sociodemográfico e comportamental dos pacientes e características clínicas e histopatológicas dos tumores no Grupo 1 e 2

VARIÁVEIS	GRUPO 1 n=7 (%)	GRUPO 2 n=10 (%)	p VALOR
SEXO			
FEMININO	1 (14,3)	0 (0,00)	0,412
MASCULINO	6 (85,7)	10 (100)	
ORIGEM ÉTNICA			
BRANCO	4 (57,1)	9 (90,0)	0,250
NÃO BRANCO	3 (42,9)	1 (10,0)	
TABACO			
TABAGISTA	4 (57,1)	2 (20,0)	0,162
EX TABAGISTA	3 (42,9)	8 (80,0)	
ÁLCOOL			
RARAMENTE BEBE	2 (28,6)	1 (10,0)	0,234
ETILISTA	4 (57,1)	3 (30,0)	
EX ETILISTA	1 (14,3)	6 (60,0)	
TAMANHO DO TUMOR			
T1 e T2	6 (85,7)	4 (40,0)	0,134
T3 e T4	1 (14,3)	6 (60,0)	
METÁSTASE REGIONAL			
PRESENÇA	2 (28,6)	6 (60,0)	0,335
AUSÊNCIA	5 (71,4)	4 (40,0)	
GRADUAÇÃO DO TUMOR			
DIFERENCIADO	0 (0,00)	2 (20,0)	0,606
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	2 (28,6)	2 (20,0)	
INDIFERENCIADO	5 (71,4)	6 (60,0)	
LOCALIZAÇÃO DO TUMOR			
CAVIDADE BUCAL	4 (57,1)	6 (60,0)	>0,999
REGIÃO DE PESCOÇO	3 (42,9)	4 (40,0)	

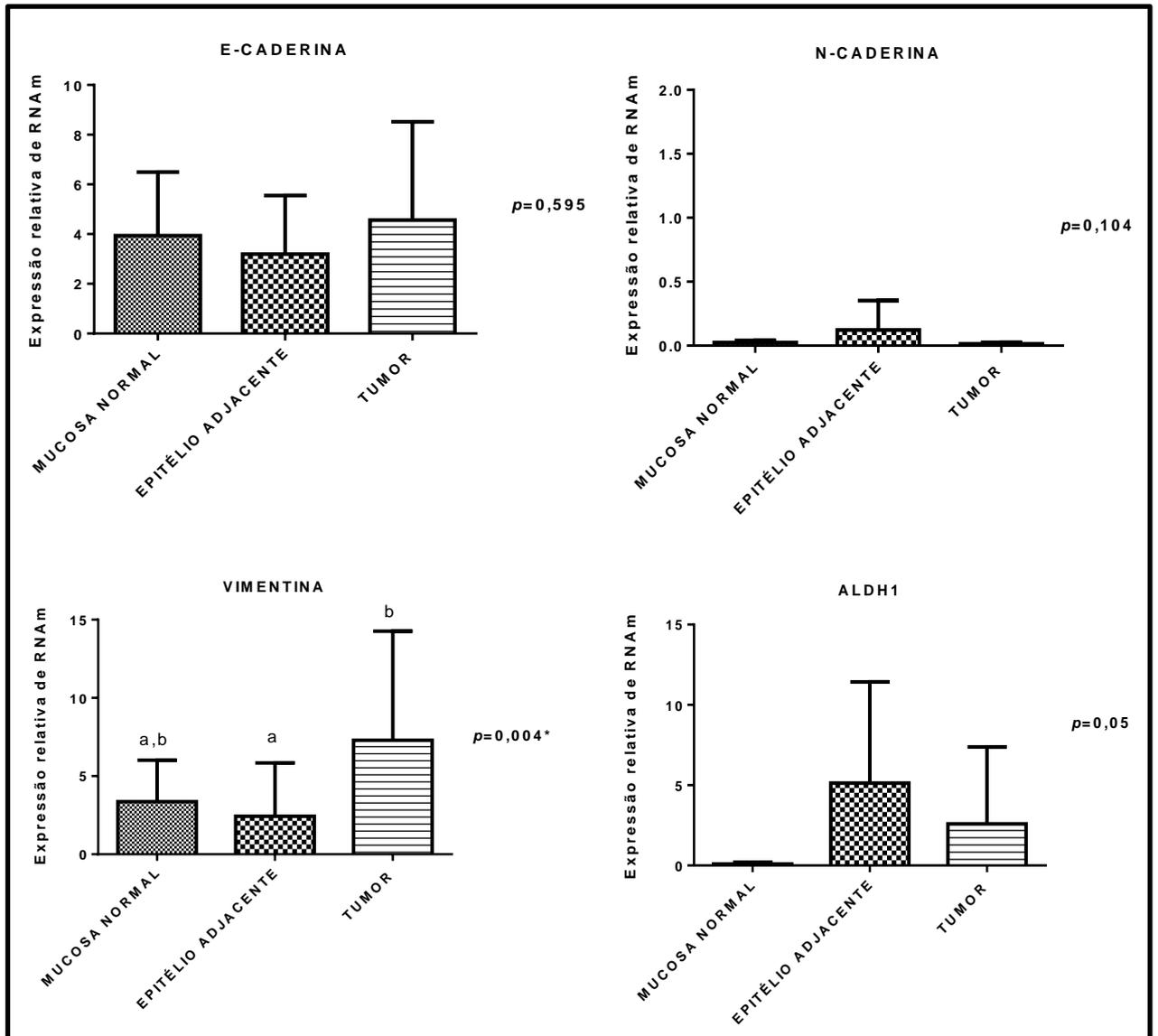
Teste do Qui-quadrado de Pearson e Teste exato de Fisher (nível de significância de p<0,05)

Tabela 2. Relação entre as variáveis estudadas e a expressão relativa de RNAm de cada marcador nas amostras de tumor e de epitélio adjacente

VARIÁVEIS	ALDH1 Mediana (25-75)		E-CADERINA Mediana (25-75)		N-CADERINA Mediana (25-75)		VIMENTINA Mediana (25-75)	
	EVOLUÇÃO							
	TUMOR	EA	TUMOR	EA	TUMOR	EA	TUMOR	EA
FAVORÁVEL	0,04 (0,02-7,29)	2,46 (0,39-13,25)	3,80 (2,82-12,27)	1,36 (1,16-3,93)	0,00 (0,00-0,02)	0,04 (0,02-0,61)	7,65 (3,41-3,51)	0,57 (0,33-2,16)
DESFAVORÁVEL	0,23 (0,08-3,36)	4,05 (0,20-8,26)	2,15 (1,62-4,74)	2,79 (1,35-4,23)	0,02 (0,01-0,02)	0,02 (0,01-0,10)	3,37 (2,40-11,19)	1,23 (0,37-4,93)
P	0,299	0,874	0,051	0,315	0,107	0,396	0,558	0,097
TAMANHO DO TUMOR								
	TUMOR	EA	TUMOR	EA	TUMOR	EA	TUMOR	EA
T1 e T2	0,05 (0,03-3,36)	2,77 (0,47-10,25)	2,97 (1,91-8,56)	2,60 (1,78-3,42)	0,01 (0,00-0,03)	0,03 (0,01-0,34)	7,15 (2,89-9,96)	1,03 (0,42-2,83)
T3 e T4	0,23 (0,01-3,78)	0,86 (0,07-9,27)	3,70 (1,74-4,30)	2,36 (1,31-4,45)	0,01 (0,00-0,03)	0,02 (0,01-0,08)	3,81 (2,32-10,87)	0,98 (0,97-2,52)
P	0,230	0,5848	0,6430	0,8217	0,7984	0,6010	0,6430	0,8011
METÁSTASE REGIONAL								
	TUMOR	EA	TUMOR	EA	TUMOR	EA	TUMOR	EA
AUSÊNCIA	0,05 (0,03-2,52)	2,46 (0,47-5,65)	3,13 (2,35-9,16)	2,60 (1,78-5,00)	0,03 (0,00-0,03)	0,03 (0,01-0,34)	7,65 (2,84-10,19)	0,99 (0,39-2,92)
PRESENÇA	1,89 (0,12-7,99)	5,05 (0,07-15,77)	3,07 (1,44-5,65)	0,36 (1,30-4,01)	0,01 (0,01-0,02)	0,02 (0,01-0,08)	5,23 (2,35-10,88)	1,02 (0,97-2,26)
P	0,021*	0,711	0,501	0,874	0,661	0,465	0,773	0,773
GRADUAÇÃO DO TUMOR								
	TUMOR	EA	TUMOR	EA	TUMOR	EA	TUMOR	EA
DIFERENCIADO	1,74 (0,12- -)	2,21 (0,37- -)	3,42 (0,81- -)	2,03 (1,69- -)	0,01 (0,01-0,01)	0,03 (0,03-0,03)	3,70 (0,61- -)	1,59 (0,66- -)
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	0,06 (0,02- -)	0,71 (0,43-5,65)	3,26 (2,19-10,13)	2,43 (1,36-8,13)	0,03 (0,03- -)	0,03 (0,00- -)	6,46 (3,05-10,53)	1,87 (0,26-3,60)
INDIFERENCIADO	0,16 (0,04-4,83)	3,91 (0,05-13,88)	3,13 (1,74-6,10)	2,69 (1,73-4,12)	0,01 (0,00-0,02)	0,03 (0,01-0,28)	6,65 (2,42-11,31)	0,98 (0,57-2,16)
P	0,663 ^a	0,744 ^a	0,816 ^a	0,729 ^a	0,206 ^a	0,875 ^a	0,563 ^a	0,846 ^a

Teste U Mann-Whitney. ^aTeste de Kruskal-Wallis. (*) Relação estatisticamente significativa destacada em negrito ($p < 0,05$)

Figura 3. Expressão relativa de RNAm de cada marcador nas diferentes amostras analisadas



RNAm= RNA mensageiro. Teste de Kruskal-Wallis (*) relação estatisticamente significantiva ($p < 0,05$).

Tabela 3. Associação entre a imunexpressão de ALDH1, E-CAD e N-CAD nas diferentes zonas do tumor e EA em relação às variáveis estudadas

VARIÁVEIS		ALDH1		E-CADERINA		N-CADERINA	
ZONA DE INVASÃO		Escore 1 n(%)	Escore 2 n (%)	Escore 1 n (%)	Escore 2 n (%)	Escore 1 n (%)	Escore 2 n (%)
Grupo/evolução	1- Favorável	4 (80,0)	1 (11,1)	4 (40,0)	1 (25,0)	5 (41,7)	0 (0,00)
	2- Desfavorável	1 (20,0)	8 (88,9)	6 (60,0)	3 (75,0)	7 (58,3)	2 (100)
		$p=0,023^*$		$p<0,999$		$p=0,505$	
Tamanho	T1 e T2	4 (80,0)	4 (44,4)	5 (50,0)	1 (25,0)	7 (58,3)	1 (50,0)
	T3 e T4	1 (20,0)	5 (55,6)	5 (50,0)	3 (75,0)	5 (41,7)	1 (50,0)
		$p=0,301$		$p=0,580$		$p<0,999$	
Metástase regional	Ausência	5 (100)	3 (33,3)	5 (50,0)	3 (75,0)	8 (66,7)	0 (0,00)
	Presença	0 (0,00)	6 (66,7)	5 (50,0)	1 (25,0)	4 (33,3)	2 (100)
		$p=0,031^*$		$p=0,580$		$p=0,165$	
Gradação	Diferenciado	0 (0,00)	2 (22,2)	2 (20,0)	0 (0,00)	1 (08,3)	1 (50,0)
	Moderadamente	3 (60,0)	1 (11,1)	1 (10,0)	3 (75,0)	4 (33,3)	0 (0,00)
	Indiferenciado	2 (40,0)	6 (66,7)	7 (70,0)	1 (25,0)	7 (58,3)	1 (50,0)
		$p=0,225$		$p=0,107$		$p=0,341$	
CENTRO DO TUMOR							
Grupo/evolução	1- Favorável	5 (62,5)	0 (0,00)	5 (62,5)	0 (0,00)	5 (41,7)	0 (0,00)
	2- Desfavorável	3 (37,5)	6 (100)	3 (37,5)	6 (100)	7 (58,3)	2 (100)
		$p=0,031^*$		$p=0,031^*$		$p=0,505$	
Tamanho	T1 e T2	4 (50,0)	4 (66,7)	4 (50,0)	4 (66,7)	7 (58,3)	1 (50,0)
	T3 e T4	4 (50,0)	2 (33,3)	4 (50,0)	2 (33,3)	5 (41,7)	1 (50,0)
		$p=0,627$		$p=0,627$		$p<0,999$	
Metástase regional	Ausência	5 (62,5)	3 (50,0)	4 (50,0)	4 (66,7)	8 (66,7)	0 (0,00)
	Presença	3 (37,5)	3 (50,0)	4 (50,0)	2 (33,3)	4 (33,3)	2 (100)
		$p<0,999$		$p=0,627$		$p=0,165$	
Gradação	Diferenciado	1 (12,5)	1 (16,7)	1 (12,5)	1 (16,7)	1 (08,3)	1 (50,0)
	Moderadamente	3 (37,5)	1 (16,7)	2 (25,0)	2 (33,3)	4 (33,3)	0 (0,00)
	Indiferenciado	4 (50,0)	4 (66,7)	5 (62,5)	3 (50,0)	7 (58,3)	1 (50,0)
		$p=0,770$		$p<0,999$		$p=0,341$	
EPITÉLIO ADJACENTE							
Grupo/evolução	1- Favorável	2 (40,0)	3 (33,3)	2 (66,7)	3 (27,3)	4 (33,3)	1 (50,0)
	2- Desfavorável	3 (60,0)	6 (66,7)	1 (33,3)	8 (72,7)	8 (66,7)	1 (50,0)
		$p<0,999$		$p=0,505$		$p<0,999$	
Tamanho	T1 e T2	3 (60,0)	5 (55,6)	1 (33,3)	7 (63,6)	7 (58,3)	1 (50,0)
	T3 e T4	2 (40,0)	4 (44,4)	2 (66,7)	4 (36,4)	5 (41,7)	1 (50,0)
		$p<0,999$		$p=0,538$		$p<0,999$	
Metastase regional	Ausência	2 (40,0)	6 (66,7)	2 (66,7)	6 (54,5)	7 (58,3)	1 (50,0)
	Presença	3 (60,0)	3 (33,3)	1 (33,3)	5 (45,5)	5 (41,7)	1 (50,0)
		$p=0,580$		$p<0,999$		$p<0,999$	
Gradação	Diferenciado	2 (40,0)	0 (0,00)	0 (0,00)	2 (18,2)	2 (16,7)	0 (0,00)
	Moderadamente	0 (0,00)	4 (44,4)	1 (33,3)	3 (27,3)	3 (25,0)	1 (50,0)
	Indiferenciado	3 (60,0)	5 (55,6)	2 (66,7)	6 (54,5)	7 (58,3)	1 (50,0)
		$p=0,087$		$p<0,999$		$p<0,999$	

Teste do Qui-quadrado de Pearson e Teste exato de Fisher (nível de significância de $p<0,05$). *Resultados estatisticamente significativos destacados em negrito.

Tabela 4. Associação do processo de EMT, fase híbrida e MET na ZI em relação as diferentes variáveis de estudo

ZONA DE INVASÃO		EMT n=1 (%)	HÍBRIDA n=10 (%)	MET n=3 (%)	p VALOR
GRUPO/EVOLUÇÃO	1- Favorável	0 (0,00)	4 (40,0)	1 (33,3)	<0,999
	2- Desfavorável	1 (100)	6 (60,0)	2 (66,7)	
TAMANHO	T1 e T2	0 (0,00)	6 (60,0)	2 (66,7)	0,747
	T3 e T4	1 (100)	4 (40,0)	1 (33,3)	
METASTASE REGIONAL	Ausência	0 (0,00)	5 (50,0)	3 (100)	0,206
	Presença	1 (100)	5 (50,0)	0 (0,00)	
GRADUAÇÃO	Diferenciado	1 (100)	1 (10,0)	0 (0,00)	0,003*
	Moderadamente diferenciado	0 (0,00)	1 (10,0)	3 (100)	
	Indiferenciado	0 (0,00)	8 (80,0)	0 (0,00)	
EXPRESSÃO E-CAD	Escore 1	1 (100)	9 (90,0)	0 (0,00)	0,011*
	Escore 2	0 (0,00)	1 (10,0)	3 (100)	
EXPRESSÃO N-CAD	Escore 1	0 (0,00)	9 (90,0)	3 (100)	0,178
	Escore 2	1 (100)	1 (10,0)	0 (0,00)	
CENTRO DO TUMOR		EMT n=1 (%)	TRANSIÇÃO n=8 (%)	MET n=5 (%)	p VALOR
GRUPO/EVOLUÇÃO	1- Favorável	0 (0,00)	5 (62,5)	0 (0,00)	0,048*
	2- Desfavorável	1 (100)	3 (37,5)	5 (100)	
TAMANHO	T1 e T2	0 (0,00)	5 (62,5)	3 (60,0)	0,769
	T3 e T4	1 (100)	3 (37,5)	2 (40,0)	
METASTASE REGIONAL	Ausência	0 (0,00)	4 (50,0)	4 (80,0)	0,399
	Presença	1 (100)	4 (50,0)	1 (20,0)	
GRADUAÇÃO	Diferenciado	1 (100)	0 (0,00)	1 (20,0)	0,156
	Moderadamente diferenciado	0 (0,00)	2 (25,0)	2 (40,0)	
	Indiferenciado	0 (0,00)	6 (75,0)	2 (40,0)	
EXPRESSÃO E-CAD	Escore 1	1 (100)	7 (87,5)	0 (0,00)	0,003*
	Escore 2	0 (0,00)	1 (12,5)	5 (100)	
EXPRESSÃO N-CAD	Escore 1	0 (0,00)	7 (87,5)	5 (100)	0,146
	Escore 2	1 (100)	1 (12,5)	0 (0,00)	

Teste do Qui-quadrado de Pearson e Teste exato de Fisher (nível de significância de $p < 0,05$). *Resultados estatisticamente significativos destacados em negrito.

Tabela 5. Avaliação do EA em relação as diferentes variáveis de estudo

EPITÉLIO ADJACENTE		NORMAL n=9 (%)	ALTERADO n=5 (%)	p VALOR
GRUPO/EVOLUÇÃO	1- Favorável	2 (22,2)	3 (60,0)	0,266
	2- Desfavorável	7 (77,8)	2 (40,0)	
TAMANHO	T1 e T2	6 (66,7)	2 (40,0)	0,580
	T3 e T4	3 (33,3)	3 (60,0)	
METASTASE REGIONAL	Ausência	5 (55,6)	3 (60,0)	<0,999
	Presença	4 (44,4)	2 (40,0)	
GRADUAÇÃO	Diferenciado	2 (22,2)	0 (0,00)	0,771
	Moderadamente diferenciado	2 (22,2)	2 (40,0)	
	Indiferenciado	5 (55,6)	3 (60,0)	
E-CADERINA	Escore 1	0 (0,00)	3 (60,0)	0,027*
	Escore 2	9 (100)	2 (40,0)	
N-CADERINA	Escore 1	9 (100)	3 (60,0)	0,110
	Escore 2	0 (0,00)	2 (40,0)	

Teste do Qui-quadrado de Pearson e Teste exato de Fisher (nível de significância de $p < 0,05$). *Resultado estatisticamente significativo destacado em negrito.

DISCUSSÃO

A maioria dos estudos na literatura, avaliam a expressão de ALDH1 e o processo de EMT em amostras completas, sem levar em consideração que a presença do estroma e do microambiente tumoral podem influenciar a análise (22, 23, 24).

Segundo nosso conhecimento, este é o primeiro estudo em tumores sólidos que avaliou a expressão gênica de ALDH1 e do processo de EMT em diferentes zonas do CECP e EA, isolando o tecido epitelial do conjuntivo por meio da técnica de microdissecção a laser. Além disso, o presente estudo comparou os resultados da expressão gênica com a imunomarcacão das proteínas estudadas.

Em nosso estudo, foi observado que tanto no EA quanto no tumor a expressão gênica de ALDH1 foi significativamente maior do que no tecido epitelial da mucosa normal. Entretanto, esta expressão foi maior no EA do que no tumor, sugerindo o papel desta enzima no campo de cancerização e eventualmente nas fases iniciais do processo de carcinogênese do CECP (25). Além disso, a superexpressão gênica de ALDH1 foi relacionada com a presença de metástase regional, resultado semelhante ao encontrado com a técnica de imunohistoquímica. A presença de ALDH1 em células neoplásicas com maior capacidade de invasão já foi descrita na literatura (26-28). Da mesma forma, Qian et al., (2014) (29) relataram a expressão de ALDH1 no tumor primário e na metástase regional, os autores ainda sugerem a relação entre a expressão desta proteína e o processo de EMT, uma vez que observaram a co-expressão de ALDH1 e Twist1 em algumas amostras tumorais.

Em relação a E-CAD no EA, observou-se baixa expressão gênica e alta imunomarcacão, sugerindo que no tecido epitelial não neoplásico há presença suficiente da proteína E-CAD nas regiões de adesão celular, não sendo necessária maior expressão gênica. Situação contrária foi encontrada no tumor, no qual houve uma alta expressão gênica e baixa imunomarcacão proteica. Este comportamento no tumor sugere maior produção do RNAm para E-CAD, entretanto esta proteína não necessariamente é sintetizada pelas células neoplásicas. Os resultados encontrados com a expressão gênica e imunomarcacão de VIM no tumor e EA foram semelhantes à E-CAD, em que a intensa produção do RNAm, não necessariamente significa que há produção da proteína (30). Estes achados

sugerem que o estudo da expressão gênica através da microdissecção a laser pode auxiliar na compreensão de mecanismos envolvidos na carcinogênese e progressão tumoral utilizando-se material humano.

A alta imunexpressão de ALDH1, independentemente da zona tumoral avaliada, apresentou associação com o desfecho desfavorável, sugerindo o uso deste marcador como um possível indicador de prognóstico para pacientes portadores de CECP (25, 31). Além disso, a alta imunexpressão de ALDH1 na ZI foi associada com a presença de metástase regional, achados que corroboram com a literatura (8, 32).

O processo de EMT nos tumores é dinâmico, levando à necessidade de avaliar seus estágios intermediários de forma individual (33). No presente estudo, avaliamos a associação dos casos classificados como perfil EMT, híbrido e MET com as diferentes variáveis.

A baixa imunexpressão de E-CAD na ZI associou-se à evolução desfavorável dos pacientes, independentemente das variáveis clínicas e histopatológicas avaliadas. Associação significativa foi observada entre a imunexpressão desta molécula de adesão e as fases híbrida e MET, reafirmando os achados da literatura em que o processo de EMT possui papel significativo na invasão tumoral (13, 17, 34). Além disso, na ZI a fase MET foi relacionada com os tumores indiferenciados, sugerindo que, apesar das células apresentarem morfologia indiferenciada, elas ainda possuem um potencial para retornar ao perfil epitelial e estabelecer uma nova área de estabelecimento tumoral (35).

A alta imunomarcagem de E-CAD no CT foi relacionada com a fase MET do processo de EMT, bem como a sua baixa imunexpressão com a fase híbrida, evidenciando que, dependendo da fase do processo de EMT em que a célula neoplásica se encontra, pode haver ganho ou perda das características epiteliais (33). Além disso, dentro da população tumoral há uma hierarquia celular, em que as células neoplásicas encontram-se em estágios distintos de proliferação e diferenciação, podendo influenciar na avaliação do processo de EMT pela imunomarcagem das proteínas envolvidas (21). Entretanto, no presente estudo, a alta imunexpressão de E-CAD no CT foi associada ao desfecho desfavorável dos pacientes, resultado semelhante ao encontrado em tumores de mama (36). Além disso, observou-se relação significativa entre a fase MET e o desfecho desfavorável

dos pacientes, sugerindo que esta fase pode ter maior relação para avaliar o prognóstico dos pacientes com CECP.

Quanto a imunoexpressão de N-CAD e VIM nas amostras tumorais, observou-se baixa marcação independentemente da região avaliada e do desfecho, o que sugere que estes marcadores não possuem relevância para avaliação de prognóstico, na amostra estudada.

O perfil demográfico dos indivíduos participantes e as características clínicas dos tumores apresentaram concordância com os diferentes estudos consultados (37, 38). Além disso, grande parte da amostra estava exposta aos hábitos considerados de risco para o desenvolvimento do CECP (39).

Em relação a localização do tumor, pode-se perceber que pelo fato de não haverem diferenças estatisticamente significativas tanto os tumores de cabeça e pescoço como os de cavidade bucal, comportaram-se de forma semelhante quando consideradas as variáveis deste estudo.

De acordo com os resultados encontrados, foi possível observar que a alta expressão de ALDH1 se relaciona à um pior prognóstico para os portadores de CECP. Entretanto, a mesma conclusão não pôde ser realizada com a avaliação do processo de EMT, devido a uma intensa variabilidade inerente às proteínas indicadoras deste processo, sugerindo a necessidade de mais estudos que permitam comprovar seu valor prognóstico. A técnica de microdissecção a laser permitiu a avaliação da expressão gênica das moléculas de interesse nas células epiteliais, dado este que quando comparado com a imunoexpressão da proteína no tecido, leva a uma melhor compreensão do comportamento biológico do CECP.

REFERÊNCIAS

1. Zhi X, Lamperska K, Golusinski P, Schork NJ, Luczewski L, Kolenda T, et al. Gene expression analysis of head and neck squamous cell carcinoma survival and recurrence. *Oncotarget* 2015;6:547-55.
2. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45:309-16.

3. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011; 61(2):69-90.
4. Bello IO, Vered M, Dayan D, Dobriyan A, Yahalom R, Alanen K, et al. Cancer-associated fibroblasts, a parameter of the tumor microenvironment, overcomes carcinoma-associated parameters in the prognosis of patients with mobile tongue cancer. *Oral Oncol* 2011;47:33-8.
5. Bhaijee F, Pepper DJ, Pitman KT, Bell D. Cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma: a review of current knowledge and future applications. *Head Neck* 2012;34:894–9.
6. Reid PA, Wilson P, Li Y, Marcu LG, Bezak E. Current understanding of cancer stem cells: Review of their radiobiology and role in head and neck cancers. *Head Neck* 2017; 39:1920-32.
7. 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;70:9969-78.
8. Hildebrand LC, Carvalho AL, Lauxen IS, Nör JE, Cerski CTS, Sant’Ana Filho M. Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2014;43:499-506.
9. Noguti J, De Moura CF, De Jesus GP, Da Silva VH, Hossaka TA, Oshima CT, et al. Metastasis from Oral Cancer: An Overview *Cancer Genomics Proteomics* 2012;9:329-35.
10. Zhang Z, Filho MS, Nör JE. The biology of head and neck cancer stem cells. *Oral Oncol* 2012; 48:1-9.
11. Zhang Z, Dong Z, Lauxen IS, Filho MS, Nör JE. Endothelial Cell-Secreted EGF Induces Epithelial to Mesenchymal Transition and Endows Head and Neck Cancer Cells with Stem-like Phenotype. *Cancer Res* 2014;74:2869-81.
12. Thiery JP, Aclouque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871–90.
13. Krisanaprakornkit S, Iamaroon A. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *ISRN Oncol* 2012;681469.
14. Marcucci F, Stassi G, de Maria R. Epithelial-mesenchymal transition: A new target in anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:311–25.

15. Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol Oncol* 2017;11:28-39
16. Thierauf J, Veit JA, Hess J. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in the Pathogenesis and Therapy of Head and Neck Cancer. *Cancers (Basel)* 2017.
17. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119:1420-28.
18. Książkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. *Pathobiology* 2012;79:195-208.
19. Huang RY, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Sci* 2012; 125:4417-22.
20. Grigore AD, Jolly MK, Jia D, Farach-Carson MC, Levine H. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med* 2016;5:E51.
21. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992;166:375-81.
22. Chaw SY, Majeed AA, Dalley AJ, Chan A, Stein S, Farah CS. Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. *Oral Oncol* 2012; 48:997-1006.
23. Nozato, Kaneko S, Nakagawara A, Komuro H. Epithelial-mesenchymal transition-related gene expression as a new prognostic marker for neuroblastoma. *Int J Oncol* 2013; 42:134-40.
24. Bleul T, Rühl R, Bulashevskaya S, Karakhanova S, Werner J, Bazhin AV. Reduced retinoids and retinoid receptors' expression in pancreatic cancer: A link to patient survival. *Mol Carcinog* 2015; 54:870-9.
25. Leinung M, Ernst B, Döring C, Wagenblast J, Tahtali A, Diensthuber M, et al. Expression of ALDH1A1 and CD44 in primary head and neck squamous cell carcinoma and their value for carcinogenesis, tumor progression and cancer stem cell identification. *Oncol Lett* 2015;10:2289-94.
26. 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;71:5317–26.

27. Bao B, Azmi AS, Ali S, Ahmad A, Li Y, Banerjee S, et al. The biological kinship of hypoxia with CSC and EMT and their relationship with deregulated expression of miRNAs and tumor aggressiveness. *Biochim Biophys Acta* 2012;1826:272–96.
28. Yang WH, Lan HY, Huang CH, Tai SK, Tzeng CH, Kao SY, et al. RAC1 activation mediates Twist1-induced cancer cell migration. *Nat Cell Biol* 2012;14:366-74.
29. Qian X, Wagner S, Ma C, Coordes A, Gekeler J, Klussmann JP, et al. Prognostic significance of ALDH1A1-positive cancer stem cells in patients with locally advanced, metastasized head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2014;140:1151-58.
30. Valencia-Sanchez MA, Liu J, Hannon GJ, Parker R. Control of translation and mRNA degradation by miRNAs and siRNAs. *Genes Dev* 2006;20:515-24.
31. 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; 50:1144-8.
32. Michifuri Y, Hirohashi Y, Torigoe T, Miyazaki A, Kobayashi J, Sasaki T, et al. High expression of ALDH1 and SOX2 diffuse staining pattern of oral squamous cell carcinomas correlates to lymph node metastasis. *Pathol Int* 2012; 62:684–9.
33. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell* 2016;166:21-45.
34. Jie XX, Zhang XY, Xu CJ. Epithelial-to-mesenchymal transition, circulating tumor cells and cancer metastasis: Mechanisms and clinical applications. *Oncotarget* 2017; 8:81558-71.
35. Kang Y, Pantel K. Tumor cell dissemination: emerging biological insights from animal models and cancer patients. *Cancer Cell* 2013;23:573-81.
36. Tan DS, Potts HW, Leong AC, Gillett CE, Skilton D, Harris WH, et al. The biological and prognostic significance of cell polarity and E-cadherin in grade I infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J Pathol* 1999;189:20-7.
37. Durazzo MD, de Araujo CE, Brandão Neto JS, Potenza AS, Costa P, Takeda F, et al. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: increasing incidence in women,

predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastases. Clinics 2005; 60:293-8.

38. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. Lancet 2008; 371(9625):1695-709.

39. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. Nat Rev Cancer 2011;11:9–22.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico “*Oral oncology*” (Qualis Odontologia A1 – Ano Base 2016, fator de impacto 4.794).

AVALIAÇÃO DOS RECEPTORES RETINOIDES EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO E SUA RELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO

RESUMO

Este estudo tem por objetivo avaliar a expressão gênica de ALDH1, receptores do ácido retinóico (RAR) e receptores do retinoide X (RXR), isoformas alfa (α) e beta (β), em amostras tumorais de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) e epitélio normal adjacente ao tumor (EA) previamente microdissectadas, comparando os resultados encontrados com as características clínicas, histopatológicas e evolução dos pacientes após 7 anos de acompanhamento. Observou-se que a alta expressão de RXR α e de RXR β associou-se a uma evolução favorável, bem como a sua subexpressão, à um pior desfecho. A superexpressão de RXR α se relacionou a tumores de tamanho entre T1 e T2 e com ausência de metástases regionais, o contrário também foi observado. A superexpressão de ALDH1 no tumor relacionava-se a presença de metástase regional e sua subexpressão a ausência de metástase regional. Não foram encontrados resultados significativos entre as demais variáveis estudadas em relação expressão gênica de ALDH1 e dos receptores analisados nas amostras de tumor e EA. Este estudo reitera a importância da superexpressão de RAR β , RXR α e RXR β para um prognóstico favorável e aumento na sobrevida de portadores CECP. Estes resultados sugerem que futuramente estudos mais detalhados sobre os mecanismos de funcionamento destes receptores, juntamente com a enzima ALDH1, poderão ser

utilizados para prever prognóstico em CECP além de permitirem terapias alvo que sejam menos agressivas, porém, mais eficazes para os portadores de CECP.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular, ácido retinoico, receptores, prognóstico.

INTRODUÇÃO

O retinol é um álcool primário de grande capacidade reativa e que possui duas formas metabolicamente ativas, dentre elas o ácido retinóico (AR) [1], o qual apresenta importante função durante o desenvolvimento embrionário de vertebrados, além de realizar a diferenciação de vários tipos de células e regular a taxa de crescimento destas por causar um bloqueio da fase G1 do ciclo celular [2].

A síntese do AR ocorre através da ação de enzimas da família aldeído desidrogenase, sendo que sua principal isoforma (ALDH1) apresenta também um importante papel na carcinogênese e na progressão do tumor, podendo estar associada à tumores mais agressivos, piores taxas de sobrevida e maiores chances de recidiva [3-5]. Sabe-se, no entanto, que a ação do AR não ocorre apenas com sua síntese, mas através da ligação com receptores retinóides específicos: os receptores de ácido retinoico (RAR) e receptores do retinoide X (RXR), ambos com isoformas alfa [α], beta [β] e gama [γ], atuando na forma de homodímeros ou heterodímeros e ligando-se a elementos responsivos do ácido retinoico presentes nas regiões promotoras dos genes alvo [6,7] (Figura 1).

Devido ao fato do AR estar relacionado ao controle da proliferação e desenvolvimento celular e de se ligar a receptores nucleares que regulam a transcrição, houve interesse em estudar o efeito deste metabólito sobre a carcinogênese [8,9]. Efeitos benéficos do AR sobre importantes determinantes do comportamento metastático de carcinomas foliculares de tireoide, bem como diferenças na expressão dos receptores RAR e RXR indicam informações importantes para o diagnóstico desta neoplasia [10,11].

Anormalidades na expressão ou na função dos receptores retinóides, especialmente a supressão da expressão de RAR β , têm sido relatadas em muitos tipos de células do câncer, incluindo células de CECP [12,13], sendo que muitas destas alterações poderiam estar envolvidas na resistência dos tumores aos efeitos

terapêuticos dos retinoides [14].

Estudo realizado por BLEUL et al., (2015) [15], demonstrou a importância da expressão dos receptores retinoides em relação a sobrevida de portadores de adenocarcinoma ductal de pâncreas (ADP). Neste estudo, foi observado que os receptores retinoides RAR α , RAR β , RXR α e RXR β encontravam-se subexpressos em ADP quando comparados a amostras de pâncreas saudável, e que a superexpressão de RAR α e RXR β associou-se à melhores taxas de sobrevivência para estes pacientes.

Em CECP estudos foram conduzidos em termos de tratamento e quimioprevenção com retinoides, utilizando para isto linhagens celulares, modelos xenográficos em ratos nude e pacientes [16-18]. O potencial de inibição do crescimento de linhas celulares de CECP in vitro bem como prevenção do estabelecimento do tumor "in vivo" foi descrita no estudo realizado por Zacheis em 1999 [17].

Este estudo teve por objetivo avaliar a expressão de receptores do ácido retinoico (RAR α , RAR β), receptores de retinoide X (RXR α , RXR β) e marcador de célula tronco tumoral (ALDH1) em amostras de ilhas tumorais de CECPs primário e epitélio adjacente ao tumor, isolados a partir da técnica de microdissecção de captura a laser, por meio de PCR em tempo real; Além, de correlacionar os resultados obtidos com os parâmetros clínicos, características histopatológicas e evolução (favorável ou desfavorável) destes pacientes em um período de acompanhamento de 7anos.

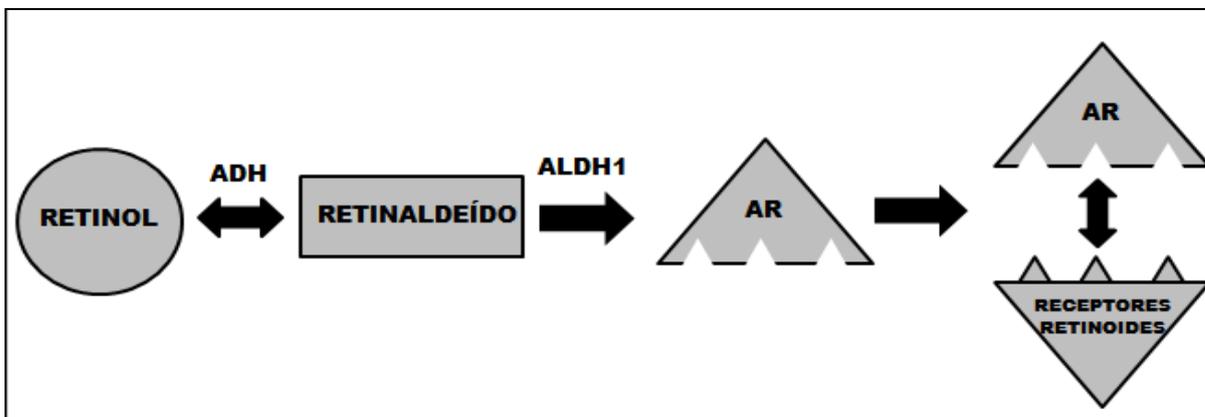


Figura 1- Síntese do ácido retinoico e ação deste através da ligação com receptores específicos. O Retinol é oxidado de maneira reversível pela enzima álcool desidrogenase (ADH) em retinaldeído. O retinaldeído é oxidado irreversivelmente em ácido retinoico (AR), através da enzima aldeído desidrogenase 1 (ALDH1). O AR pode ligar-se aos receptores retinoides resultando em expressão gênica e diferenciação celular.

METODOLOGIA

- Descrição da amostra

Para a realização deste estudo foram utilizadas 17 amostras tumorais humanas e 17 amostras de epitélios normais adjacentes a estes mesmos tumores, obtidos a fresco e conservados em nitrogênio líquido. Todos os casos empregados neste estudo são de CECPs primários, sem tratamento prévio, atendidos no Hospital de Clínicas de Porto Alegre nos anos de 2009 e 2010 (CAAE:46562115.3.0000.5347). Com o intuito de comparação foram incluídas quatro amostras de mucosa normal humana oriundas de material de descarte (retalhos cirúrgicos da extração de terceiros molares) coletados no período de 2014-2015 pelo Serviço de Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial da Policlínica Militar de Porto Alegre (CAAE: 26759114.9.0000.5327).

- Parâmetros clínicos dos pacientes e características clínicas e histopatológicas dos tumores

Os parâmetros clínicos de cada paciente, incluindo sexo, idade, origem étnica, exposição a fatores de risco, bem como os dados referentes à localização do tumor, tamanho, presença de metástases regionais ou a distância foram coletadas nos prontuários. A graduação histológica foi realizada por dois patologistas previamente calibrados seguindo com os critérios de BRYNE et al., (1992) [19].

Os pacientes incluídos neste estudo foram classificados em dois grupos conforme a evolução após 7 anos, pertencendo ao Grupo 1 os pacientes vivos e sem recidiva do tumor e no Grupo 2 indivíduos que apresentaram recidiva/metástase ou óbito devido ao tumor.

- Microdissecção a laser

Em um criostato foram realizados cortes de 22 micrometros de cada amostra os quais foram transferidos para uma lâmina PALM® MembraneSlides (Zeiss®, DEU) previamente esterilizada e brevemente aquecida, deixando-os secar a -20°C durante 2-3 minutos. A cada troca de amostra foi realizada a limpeza do criostato e a

troca da navalha e de todos instrumentais. Foi realizada a incubação da lâmina em etanol 70%, durante 2-3 minutos, coloração com acetato de cresil violeta 1% (Sigma-Aldrich[®], EUA) por 20 segundos, banhos em etanol 70% e absoluto respectivamente. Foi realizada a incubação de cada lâmina em etanol absoluto até o procedimento de microdissecção.

A técnica de microdissecção foi realizada com o microdissector a laser “PALM Microbeam IP Z” (Zeiss[®], DEU) seguindo as instruções do fabricante. Uma lâmina de cada vez foi acoplada ao microscópio e sobre ela é posicionado a tampa de um microtubo estéril de polipropileno contendo solução tampão para extração de RNA. Foi realizada a demarcação das áreas a serem microdissectadas: ilhas tumorais (nas amostras tumorais) e tecido epitelial (nas amostras de EA) e posteriormente os cortes. Para cada área microdissectada, foi utilizado um novo microtubo. – Figura 2.

- Extração do RNA e síntese do cDNA

As extração de RNA das áreas previamente dissecadas foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do RNeasy Micro kit (Qiagen[®], EUA). Após, procedeu-se a síntese do cDNA, seguindo as orientações do fabricante do SuperScript[®] VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen[®], EUA). As amostras obtidas foram submetidas à análise por PCR em tempo real para análise de expressão gênica dos receptores retinoides RAR e RXR (isoformas α e β) e enzima ALDH1.

- PCR em tempo real

Para análise da expressão gênica dos receptores retinoides, foram utilizados os primers TaqMan[®], para RAR α (Hs00940446_m1), RAR β (Hs00977140_m1), RXR α (Hs01067640_m1), RXR β (Hs00232774_m1) e ALDH1 (Hs00946916_m1). Todas as reações foram realizadas em triplicatas e normalizadas para GAPDH (Hs99999905_m1) e β -actina (Hs99999903_m1). Como controle positivo foi utilizado uma amostra previamente testada e como o controle negativo foi utilizado o mesmo mix para reação de RT-PCR, entretanto, não contendo cDNA. Todos os reagentes e primers utilizados neste estudo foram da Life Technologies[®], EUA.

As reações foram levadas ao termociclador Step One Plus[®] (Life Technologies[®], EUA) para análise de expressão gênica de cada marcador.

- Análise estatística

Foram utilizados os testes do Qui-quadrado de Pearson e teste exato de Fisher para verificar a associação entre as variáveis qualitativas. As análises de expressão gênica e sua relação com as variáveis de estudo, foram comparados pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, através do software SPSS versão 21 (IBM Corporation, EUA).

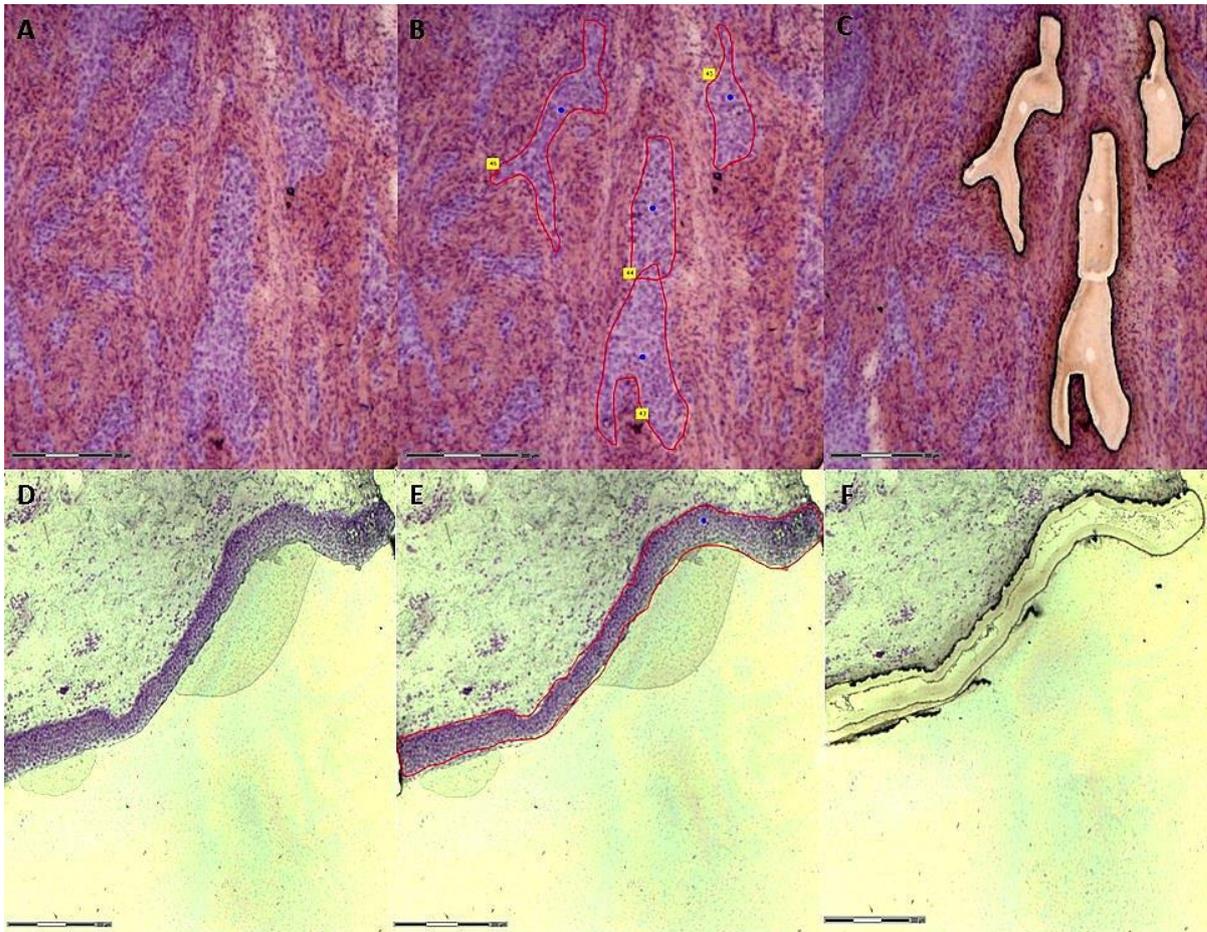


Figura 2- Microdissecção a laser do tumor e do EA após coloração com acetato de cresyl violeta a 1%. **A:** Amostra tumoral íntegra; **B:** Seleção e delimitação das ilhas tumorais a serem microdissectadas; **C:** Amostra tumoral microdissectada e coletada; **D:** Amostra de EA íntegra; **E:** Delimitação do EA a ser microdissectado; **F:** amostra de EA microdissectada e coletada.

RESULTADOS

A média de idade dos pacientes do Grupo 1 foi de 53,3 anos (39 a 70 anos) e 60,2 anos (48 a 72 anos) no Grupo 2. Houve prevalência pelo sexo masculino (85,7% - 100%), pela origem étnica branca (57,1% - 90%) nos grupos 1 e 2 respectivamente. Quanto ao perfil comportamental, a maioria dos pacientes no Grupo 1 eram tabagistas e etilistas (57,1%) e no Grupo 2 80% dos indivíduos eram ex-tabagistas e 60% ex-etilistas. (Tabela 1).

Em relação as características clínicas e histopatológicas dos tumores observou-se no Grupo 1 a prevalência por tumores indiferenciados (71,4%), de tamanhos menores "T1 e T2" (85,7%), com ausência de metástase regional (71,4%) e com localização na cavidade bucal (57,1%). Em contrapartida, no Grupo 2, 60% dos indivíduos apresentaram tumores indiferenciados, de tamanho maiores "T3 e T4", com presença de metástase regional e localizados na cavidade bucal. (Tabela 2).

Foi encontrada relação estatisticamente significativa entre a expressão relativa do receptores do retinoide X (α e β) e a evolução dos pacientes nas amostras tumorais ($p=0,019$), sendo que a alta expressão de RXR α e de RXR β associou-se a uma evolução favorável, bem como a sua subexpressão, à um pior desfecho (Tabela 3).

Além do desfecho, a expressão relativa de RXR α também foi associada ao tamanho do tumor ($p=0,005$) e a presença ou não de metástase regional ($p=0,001$). Quando o RXR α encontrava-se superexpresso no tumor este se apresentava com um tamanho menor (T1 e T2) e com ausência de metástases regionais, o contrário ocorria quando este receptor estava subexpresso (Tabela 3).

Observou-se também que a superexpressão de ALDH1 no tumor relacionava-se a presença de metástase regional e sua subexpressão a ausência de metástase regional ($p=0,021$) - Tabela 3.

Não foi encontrada relação estatisticamente significativa entre as demais variáveis estudadas em relação expressão gênica de ALDH1 e dos receptores analisados nas amostras de tumor e EA (Tabela 3).

Foi encontrado níveis “borderline” de significância ($p=0,05$) quanto a expressão relativa de RAR β , o qual foi menor no tumor quando comparado ao EA e superexpresso em mucosa normal (Figura 3).

Não foram encontradas relações estatisticamente significativas quanto a expressão relativa de RAR α , RXR α e RXR β quando compararmos amostras de tumor, EA e mucosa normal. Porém, foi observado que a expressão de RAR β decresce gradualmente da mucosa normal para o EA e deste, para o tumor (Figura 3).

Outra tendência também foi encontrada quanto a ALDH1 ($p=0,05$) a qual apresentou-se superexpressa no EA em relação ao tumor e subexpressa em mucosa normal (Figura 3).

Tabela 1. Perfil sociodemográfico e comportamental dos pacientes do Grupo 1 e 2

VARIÁVEIS	GRUPO 1 n=7 (%)	GRUPO 2 n=10 (%)	p VALOR
SEXO			
FEMININO	1 (14,3)	0 (0,00)	0,412
MASCULINO	6 (85,7)	10 (100)	
ORIGEM ÉTNICA			
BRANCO	4 (57,1)	9 (90,0)	0,250
NÃO BRANCO	3 (42,9)	1 (10,0)	
TABACO			
TABAGISTA	4 (57,1)	2 (20,0)	0,162
EX TABAGISTA	3 (42,9)	8 (80,0)	
ÁLCOOL			
RARAMENTE BEBE	2 (28,6)	1 (10,0)	0,234
ETILISTA	4 (57,1)	3 (30,0)	
EX ETILISTA	1 (14,3)	6 (60,0)	

Teste do Qui-quadrado de Pearson e Teste exato de Fisher (nível de significância de $p<0,05$).

Tabela 2. Características clínicas e histopatológicas dos tumores nos Grupos 1 e 2

VARIÁVEIS	GRUPO 1 n=7 (%)	GRUPO 2 n=10 (%)	p valor
TAMANHO DO TUMOR			
T1 e T2	6 (85,7)	4 (40)	0,134
T3 e T4	1 (14,3)	6 (60)	
METÁSTASE REGIONAL			
PRESENÇA	2 (28,6)	6 (60)	0,335
AUSÊNCIA	5 (71,4)	4 (40)	
GRADUAÇÃO DO TUMOR			
DIFERENCIADO	0 (0)	2 (20)	0,606
POUCO DIFERENCIADO	2 (28,6)	2 (20)	
INDIFERENCIADO	5 (71,4)	6 (60)	
LOCALIZAÇÃO DO TUMOR			
CAVIDADE ORAL	4 (57,1)	6 (60)	>0,999
REGIÃO DO PESCOÇO	3 (42,9)	4 (40)	

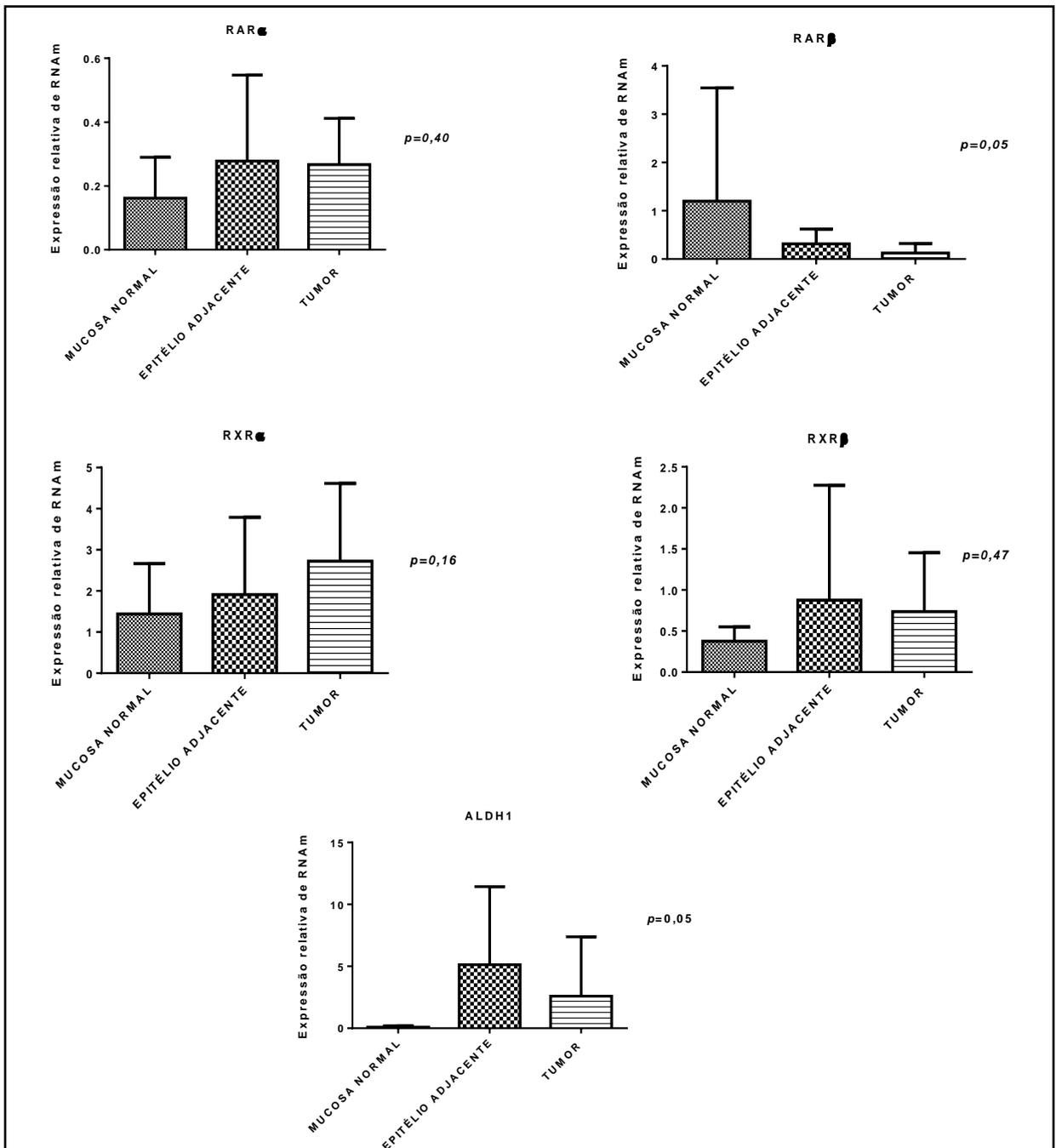
Teste do Qui-quadrado de Pearson e Teste exato de Fisher (nível de significância de $p<0,05$).

Tabela 3. Relação entre as variáveis estudadas e a expressão relativa de RNAm de cada marcador nas amostras de tumor e de epitélio adjacente

VARIÁVEIS	RAR α Mediana (25-75)		RAR β Mediana (25-75)		RXR α Mediana (25-75)		RXR β Mediana (25-75)		ALDH1 Mediana (25-75)	
	TUMOR	EA	TUMOR	EA	TUMOR	EA	TUMOR	EA	TUMOR	EA
EVOLUÇÃO										
FAVORÁVEL	0,30 (0,18-0,44)	0,14 (0,07-0,47)	0,04 (0,01-0,34)	0,29 (0,08-0,81)	4,09 (2,08-5,28)	1,22 (0,68-1,82)	0,71 (0,63-1,11)	0,24 (0,15-0,42)	0,04 (0,02-7,29)	2,46 (0,39-13,25)
DESFAVORÁVEL	0,18 (0,13-0,39)	0,18 (0,10-0,33)	0,03 (0,01-0,13)	0,10 (0,05-0,46)	1,76 (1,06-2,46)	1,66 (1,17-2,65)	0,30 (0,21-0,63)	0,43 (0,12-2,04)	0,23 (0,08-3,36)	4,05 (0,20-8,26)
P	0,283	0,791	0,874	0,317	0,019*	0,435	0,019*	0,283	0,299	0,874
TAMANHO DO TUMOR										
T1 e T2	0,25 (0,18-0,40)	0,18 (0,09-0,42)	0,04 (0,11-0,07)	0,31 (0,09-0,79)	2,86 (2,36-4,87)	1,60 (0,63-1,90)	0,58 (0,30-1,06)	0,29 (0,18-0,43)	0,05 (0,03-3,36)	2,77 (0,47-10,25)
T3 e T4	0,16 (0,12-0,41)	0,13 (0,07-0,41)	0,03 (0,01-0,50)	0,07 (0,04-0,07)	1,37 (0,10-2,11)	1,66 (0,68-2,81)	0,40 (0,27-0,98)	0,51 (0,12-1,42)	0,23 (0,01-3,78)	0,86 (0,07-9,27)
P	0,516	0,805	0,745	0,136	0,005*	0,531	0,578	0,730	0,230	0,585
METÁSTASE REGIONAL										
AUSENCIA	0,23 (0,19-0,39)	0,18 (0,09-0,61)	0,02 (0,01-0,04)	0,28 (0,07-0,46)	3,04 (2,47-5,01)	1,66 (0,96-2,45)	0,64 (0,33-1,05)	0,28 (0,17-0,38)	0,05 (0,03-2,52)	2,46 (0,47-5,65)
PRESENCIA	0,17 (0,12-0,47)	0,13 (0,07-0,41)	0,11 (0,01-0,46)	0,20 (0,04-0,76)	1,33 (1,02-1,91)	1,50 (0,65-2,39)	0,36 (0,27-0,94)	0,49 (0,13-1,39)	1,89 (0,12-7,99)	5,05 (0,07-15,77)
P	0,630	0,634	0,141	>0,999	0,001*	0,501	0,441	0,441	0,021*	0,711
GRADUAÇÃO DO TUMOR										
DIFERENCIADO	0,21 (0,13- -)	0,19 (0,07- -)	0,03 (0,03-0,03)	0,07 (0,07-0,07)	1,78 (0,94- -)	2,17 (1,53- -)	0,39 (0,27- -)	0,82 (0,35- -)	1,74 (0,12- -)	2,21 (0,37- -)
POUCO DIFERENCIADO	0,34 (0,22-0,42)	0,16 (0,09-0,74)	0,03 (0,01-0,08)	0,09 (0,05- -)	3,27 (2,22-7,10)	1,74 (0,73-6,83)	0,71 (0,16-2,46)	0,19 (0,10-2,97)	0,06 (0,02- -)	0,71 (0,43-5,65)
INDIFERENCIADO	0,18 (0,12-0,41)	0,16 (0,10-0,43)	0,04 (0,01-0,34)	0,29 (0,07-0,75)	2,08 (1,30-3,10)	1,34 (0,68-2,11)	0,63 (0,27-1,04)	0,30 (0,13-0,51)	0,16 (0,04-4,83)	3,91 (0,05-13,88)
P	0,491 ^a	0,796 ^a	0,923 ^a	0,521 ^a	0,259 ^a	0,501 ^a	0,744 ^a	0,552 ^a	0,663 ^a	0,744 ^a

Teste U Mann-Whitney. ^aTeste de Kruskal-Wallis. (*) Relação estatisticamente significativa destacada em negrito ($p < 0,05$)

Figura 3. Expressão relativa de RNAm de cada marcador nas diferentes amostras analisadas



RNAm= RNA mensageiro. Teste de Kruskal-Wallis (nível de significância de $p < 0,05$).

DISCUSSÃO

A maioria dos trabalhos em oncologia avaliam amostras tumorais completas, sem se atentar que a simples presença do tecido conjuntivo e do microambiente do tumor podem afetar no resultado final. Segundo nosso conhecimento este é o primeiro estudo que visa avaliar a expressão gênica de ALDH1, receptores do ácido retinóico e receptores do retinoide X em amostras tumorais previamente microdissectadas e EA, evitando assim interferências do estroma e do microambiente tumoral, além de comparar os resultados encontrados com as características clínicas e histopatológicas e evolução destes pacientes após 7 anos de acompanhamento, período de sobrevida maior do que o relatado pela literatura.

A alta expressão de RXR α e RXR β associou-se a uma evolução favorável dos pacientes, e a subexpressão destes receptores à um desfecho desfavorável, achados que corroboram com a literatura [11,15]. Além disso, estes resultados salientam a importância da presença desses receptores na cessação do ciclo celular na fase G1 bem como na diferenciação celular [20], que nos tumores malignos reflete em maior sobrevida dos pacientes.

A superexpressão de RXR α foi relacionada com tumores de tamanho entre T1 e T2 e ausência de metástases regionais, o que possivelmente implicou em um desfecho favorável [21,22].

Foi encontrado uma tendência quanto a expressão relativa de RAR β , a qual mostrou que a expressão deste receptor vai decrescendo gradualmente da mucosa normal para o EA e deste, para o tumor, sugerindo que a diminuição de RAR β poderia estar relacionada com o processo de carcinogênese, e que a expressão deste receptores poderia agir como um fator protetivo para o desenvolvimento de CECP.

A superexpressão de ALDH1 associava-se a tumores com metástase regional e sua subexpressão com ausência desta. Na literatura esta bem estabelecido que a presença de metástase regional contribui para um pior desfecho para os portadores de CECP, bem como quanto a maior expressão de ALDH1 com um pior prognóstico [4,23].

A enzima ALDH1 está relacionada com a presença de células neoplásicas que apresentam características semelhantes às células tronco tumorais, indicando

tumores com comportamento biológico mais agressivo [4,26]. Ainda sobre ALDH1, observou-se uma tendência em relação a alta expressão de ALDH1 no EA em relação ao tumor. Essa superexpressão no EA sugere a existência de alterações neste EA comprovado pela baixa expressão em mucosa normal. Foi demonstrado pela literatura que a ALDH1 não é expressa em mucosa oral normal [24,25], portanto, nossos resultados concordam com o conceito de campo de cancerização proposto por Slaughter et al., (1953) [26] em que no epitélio adjacente ao tumor, mesmo não apresentando alterações morfológicas, já existem modificações moleculares.

No tumor a expressão relativa de ALDH1 foi menor que a do EA, isto pode ter ocorrido devido ao “*feedback*” desta enzima na síntese do ácido retinoico, pois, quanto maior a produção de ALDH1, mais AR esta sendo sintetizado, podendo este realizar sua função somente se houver ligação com os receptores retinoides [3].

Em relação aos achados epidemiológicos e o perfil comportamental dos indivíduos, estes corroboram com a literatura, pois, observou-se predominância pela origem étnica branca, média de idade dos indivíduos no momento do diagnóstico entre a quinta e sexta décadas da vida em pacientes que são ou foram por algum tempo tabagistas e etilistas [27,28].

Este estudo reitera a relação entre a superexpressão dos receptores retinoides RAR β , RXR α e RXR β e o prognóstico do CECP, sugerindo que sua presença indica melhores taxas de sobrevida para os pacientes. Nossos achados sugerem que estes receptores, juntamente com a enzima ALDH1, poderão ser utilizados para prever prognóstico em CECP, podendo no futuro serem empregados na criação de terapias alvo que sejam menos agressivas e mais específicas para os pacientes portadores de CECP.

REFERÊNCIAS

1. IOM (Institute of Medicine). Dietary reference intakes for vitamin A, vitamin K, arsenic, boron, chromium, copper, iodine, iron, manganese, molybdenum, nickel, silicon, vanadium, and zinc. 2001.
2. Mongan NP, Gudas LJ. Diverse actions of retinoid receptors in cancer prevention and treatment. *Differentiation* 2007;75:853–70.

3. Ma I, Allan AL. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev* 2011; 7(2):292-306.
4. Hildebrand LC, Carvalho AL, Lauxen IS, Nör JE, Cerski CTS, Sant'Ana Filho M. Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2014; 43(7):499-506.
5. Leinung M, Ernst B, Döring C, et al. Expression of ALDH1A1 and CD44 in primary head and neck squamous cell carcinoma and their value for carcinogenesis, tumor progression and cancer stem cell identification. *Oncology Letters* 2015;10(4):2289-94.
6. Swift ME, Wallden B, Wayner EA, Swisshelm K. Truncated RAR beta isoform enhances proliferation and retinoid resistance. *J Cell Physiol* 2006; 209(3):718-25.
7. Simões-Costa MS, Azambuja AP, Xavier-Neto J. The search for non-chordate retinoic acid signaling: lessons from chordates. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 2008;310(1):54-72.
8. Güzey M, Demirpençe E, Criss W, DeLuca HF. Effects of retinoic acid (all-trans and 9-cis) on tumor progression in small-cell lung carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 242:369-75.
9. Lam PK, To EWH, Chan ESY, Liew CT, Lung IWH, King WK. In vitro inhibition of head and neck cancer-cell growth by human recombinant interferon a and 13-cis retinoic acid. *Br J Biomed Sci* 2001;58:226-9.
10. Havekes B, Schröder van der Elst JP, van der Pluijm G, Goslings BM, Romijn JA, Smit JW. Beneficial effects of retinoic acid on extracellular matrix degradation and attachment behaviour in follicular thyroid carcinoma cell lines. *J Endocrinol* 2000;167:229-38.
11. Hoftijzer HC, Liu YY, Morreau H, et al. Retinoic acid receptor and retinoid X receptor subtype expression for the differential diagnosis of thyroid neoplasms. *Eur J Endocrinol* 2009;160(4):631-8.
12. Xu X, Lotan R. Aberrant expression and function of nuclear retinoid receptors in cancer. In: H. Nau, and W. S. Blaner (eds.), *The Biochemical and Molecular Basis of Vitamin A and Retinoid Action. Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 139, pp. 323–343. Berlin: Springer Verlag, 1999.

13. Youssef EM, Lotan D, Issa JP, et al. Hypermethylation of the retinoic acid receptor-beta(2) gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 2004;10(5):1733-42.
14. Hu L, Crowe DL, Rheinwald JG, Chambon P, Gudas LJ. Abnormal expression of retinoic acid receptors and keratin 19 by human oral and epidermal squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Res* 1991; 51:3972-81.
15. Bleul T, Rühl R, Bulashevskaya S, Karakhanova S, Werner J, Bazhin AV. Reduced retinoids and retinoid receptors' expression in pancreatic cancer: A link to patient survival. *Mol Carcinog* 2015;54(9):870-9.
16. Hong WK, Endicott J, Itri LM, et al. Prevention of second primary tumors with isotretinoin in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N. Engl. J. Med* 1990;323:795-801.
17. Zacheis D, Dhar A, Lu S, et al. Heteroarotinoids inhibit head and neck cancer cell lines in vitro and in vivo through both RAR and RXR retinoic acid receptors. *J Med Chem* 1999;42(21):4434-45.
18. Lee JJ, Wu X, Hildebrandt MA, et al. Global assessment of genetic variation influencing response to retinoid chemoprevention in head and neck cancer patients. *Cancer Prev Res (Phila)* 2011;4(2):185-93.
19. Bryne M, Koppang H, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992;166:375–81.
20. Spinella MJ, Freemantle SJ, Sekula D, Chang JH, Christie AJ, Dmitrovsky E. Retinoic acid promotes ubiquitination and proteolysis of cyclin D1 during induced tumor cell differentiation. *J Biol Chem* 1999; 274:22013–8.
21. Sugerman PB, Savage NW. Current concepts in oral cancer. *Aust Dent J* 1999;44:147-156.
22. Kantola S, Parikka M, Jokinen K, et al. Prognostic factors in tongue cancer – relative importance of demographic, clinical and histopathological factors. *Br J Cancer* 2000;83:614-619.
23. Leinung M, Ernst B, Döring C, et al. Expression of ALDH1A1 and CD44 in primary head and neck squamous cell carcinoma and their value for carcinogenesis, tumor progression and cancer stem cell identification. *Oncol Lett* 2015;10(4):2289-94.

24. Hedberg JJ, Grafström RC, Vondracek M, Sarang Z, Wärngård L, Höög JO. Micro-array chip analysis of carbonyl-metabolising enzymes in normal, immortalised and malignant human oral keratinocytes. *Cell Mol Life Sci* 2001;58:1719-26.
25. Kato H, Izumi K, Saito T, 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, 139:847-62.
26. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953;6:963-8.
27. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. Head and neck cancer. *Lancet*. 2008; 371(9625):1695-709.
28. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;11:9–22.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O CECP constitui-se de uma neoplasia maligna relativamente comum e que ainda implica em altas taxas de mortalidade devido a presença de recorrências locais, surgimento de segundos tumores primários e metástases. Infelizmente, nas últimas décadas as taxas de sobrevida sofreram apenas uma discreta redução, permanecendo em torno de 5 anos.

Muitos estudos têm sido conduzidos para modificar este panorama, entretanto, sabe-se que a melhor forma de evitar a doença é através da prevenção, abstendo-se de fatores de risco para o desenvolvimento do CECP, como o hábito tabágico e o etilismo.

Apesar de todos os esforços e avanços científicos no campo de oncologia da cabeça e pescoço, ainda é necessário um melhor entendimento dos diferentes processos envolvidos na carcinogênese e na progressão tumoral. Muitos são os fatores envolvidos no mecanismo de invasão e metástase do CECP, no entanto, é difícil isolar cada fator impedindo a ocorrência de interferências nas análises e resultando em achados mais fidedignos.

A técnica de microdissecção a laser permite a coleta de células individuais ou de um pequeno conjunto de células para análise molecular posterior. Esta tecnologia foi de grande valia para atender a finalidade deste estudo, pois somente assim foi possível isolarmos apenas o tecido epitelial, sem que o tecido conjuntivo ou o microambiente tumoral influenciasse em nossos resultados, tornando este um estudo inédito na literatura.

Em ambos artigos foi ressaltado que a alta expressão de ALDH1 estava relacionada à um pior prognóstico para os portadores de CECP. Esta relação já havia sido descrita por inúmeros trabalhos na literatura, concluindo-se que esta enzima pode ser utilizada para prever prognóstico.

No artigo 1, objetivamos avaliar o processo de EMT e sua relação com o prognóstico de portadores de CECP ao longo de 7 anos de acompanhamento.

Embora este estudo tenha nos levado a uma melhor compreensão do comportamento biológico do CECP, a variabilidade de proteínas envolvidas neste mecanismo e expressas nas células neoplásicas, bem como a dinamicidade deste processo, não nos permitiram por meio deste estudo comprovar seu valor prognóstico. Sugerimos que novos estudos utilizando a associação entre a técnicas de imunohistoquímica e análises de expressão gênica possam ampliar a compreensão obtida até aqui.

O artigo 2 abordou a relação entre a expressão de receptores retinoides e o prognóstico em CECP. Nossos resultados demonstraram que a superexpressão dos receptores RAR β , RXR α e RXR β associaram-se a melhores taxas de sobrevida para os pacientes. Deste modo, tanto estes receptores retinoides como a enzima ALDH1, poderão ser utilizados como marcadores para predizer prognóstico em CECP além de permitirem terapias alvo que sejam menos agressivas e mais eficazes para os portadores de CECP.