

LAURA DE CAMPOS HILDEBRAND

**PERFIL SÓCIO DEMOGRÁFICO DOS PACIENTES E
AVALIAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE CD44 E ALDH1 EM
CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO –
CENTRO DO TUMOR E ZONA DE INVASÃO.**

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 Doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Faculdade de Odontologia

Agosto de 2011

“O segredo é não correr atrás das
borboletas... É cuidar do jardim para
que elas venham até você.”

Mario Quintana

DEDICATÓRIA

José Luís,
por ser meu companheiro em muitos
momentos importantes e desafios.

“Amar uma pessoa significa querer
envelhecer com ela.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais **Maria Elisabeth** e **Raul** pelo amor, dedicação e incentivo constante durante toda a minha vida.

À minha irmã **Luizila** e seu marido **Fernando** pela alegria com a chegada da minha primeira sobrinha, a **Bibiana**.

Aos meus sogros **Zilda** e **Celso** pelo apoio durante estes anos de estudo.

À minha família, **avós, tios e primos** por serem sempre meu porto seguro e a base da minha educação, estabilidade e principalmente, felicidade.

Ao meu professor orientador **Manoel Sant'Ana Filho**, pelo qual tenho grande respeito e admiração, por ter idealizado este trabalho, mas principalmente agradeço pela amizade e compreensão ao longo dos anos na Patologia.

À **Isabel Lauxen** pelo auxílio na realização de todas as etapas deste trabalho e por sua amizade; por estar sempre disposta a ajudar na solução das dúvidas e dificuldades. Muito obrigada por tudo!

Aos demais professores da Patologia Bucal, Estomatologia e Biologia dos Tecidos (**Pantelis, Márcia, Vinícius, Manoela, Marco Antônio, Maria Cristina, Anna Cristina e Marcelo**) pelo exemplo de conduta profissional e pessoal.

À Equipe do Laboratório de Patologia Bucal (**Isabel, Alessandra e Chris**) Prof J. J. Barbachan pelo auxílio na realização deste e outros trabalhos de pesquisa ao longo dos anos de doutorado.

À **equipe do Angiogenesis Research Laboratory** da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan, sob coordenação do **Prof. Jacques Nör** pela oportunidade de realizar parte desta pesquisa na sua faculdade.

À minha colega desde os tempos do estágio no HCPA, **Ana Luísa** pelo companheirismo em todos os momentos, científicos ou pessoais.

Aos demais colegas do Pós-Graduação, em especial aos colegas da Patologia Bucal (**Fernanda, Francinne, Adriana, Paula, Ana Carolina, Artur**) pelo apoio e companheirismo.

À **equipe de Cirurgia de Cabeça e Pescoço** do Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por ter abertos as portas do seu ambulatório e bloco cirúrgico para a realização desta pesquisa.

À equipe de **Patologia** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo auxílio na coleta do material.

Aos **pacientes** que concordaram em participar da pesquisa e compreenderam a nossa necessidade de estudar o comportamento desta neoplasia.

À secretária do PPG-ODO **Adriana** pela ajuda nos assuntos burocráticos.

À **equipe da Biblioteca Malvina Vianna Rosa** da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo auxílio na busca por referências bibliográficas.

À **Faculdade de Odontologia** da Universidade Federal do Rio Grande do Sul por ter me acolhido na graduação e na pós-graduação, sendo a minha segunda casa desde 1997.

À **CAPES** que tornou possível a realização deste curso de Pós-Graduação.

SUMÁRIO

Introdução	07
Antecedentes e Justificativa	08
Referências Bibliográficas	15
Objetivos	22
Artigo Científico 1	23
Artigo Científico 2	36
Considerações Finais	52
Referências Bibliográficas	55

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) é a sexta neoplasia maligna mais comum e apresenta uma baixa taxa de sobrevida dos pacientes em cinco anos. Dentre outras variáveis, este fato pode ser devido ao perfil e estilo de vida dos pacientes que desenvolvem a doença e à existência de células tumorais com características de células tronco e resistentes às terapias antineoplásicas.

Assim como outros tecido adultos, o tecido epitelial de revestimento apresenta um compartimento de células tronco mesenquimais (CTM) para reposição celular após processos patológicos ou fisiológicos. A partir desta constatação, surgiu a hipótese de que nos tumores malignos também existe uma subpopulação celular com capacidade de sustentar o crescimento neoplásico da mesma maneira que as CTM sustentam o tecido sadio. Portanto, a população tumoral é heterogênea, apresentando células com papel distinto no surgimento e desenvolvimento da neoplasia.

No interior do tumor há uma porção de células indiferenciadas com potencial de proliferação ilimitado e baixa taxa de divisão; células indiferenciadas com potencial de proliferação limitado e alta taxa de divisão e células diferenciadas. As células do primeiro grupo são responsáveis pela formação do tumor, bem como pela capacidade de invasão, disseminação de metástases e resistência às terapias antineoplásicas. Esta subpopulação celular é chamada de células tumorais com características semelhantes às células tronco.

A imunexpressão de marcadores específicos é capaz de evidenciar a presença e localização destas células no interior do tumor, entretanto a interpretação desta marcação permanece controversa na literatura. Para determinar a importância das células tumorais com características semelhantes às células tronco no CECP, há necessidade de relacionar a sua presença com os parâmetros clínicos do tumor, bem como com o perfil sócio demográfico e condição bucal dos pacientes portadores desta neoplasia.

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

CARCINOMA ESPINOCELULAR

O carcinoma espinocelular é a neoplasia maligna mais comum da boca. Os tumores de boca e pescoço agrupados representam o sexto tipo de câncer mais comum no mundo (1,2). Na América do Sul, Argentina, Brasil e Uruguai são os países com maiores níveis de incidência, embora o Brasil apresente taxas mais elevadas (1). Os carcinomas espinocelulares de boca e orofarínge são um subgrupo do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP), o qual é mais comum em homens, entretanto a proporção entre os sexos tem diminuído e, atualmente, é cerca de 1,5:1 para os tumores de boca e 2,8:1 para os de orofaringe (1).

A etiologia do CECP é multifatorial, porém os principais fatores de risco são a exposição ao fumo e ao álcool, exceto para os tumores de lábio, em que a radiação ultravioleta é a principal etiologia (1,2). Geralmente o fumo e o álcool são consumidos juntos e esta associação aumenta o risco para o desenvolvimento do câncer. O álcool aumenta a permeabilidade da mucosa bucal, facilitando a penetração de substâncias carcinogênicas presentes no tabaco, ocorrendo assim um sinergismo na associação destes dois fatores (3,4).

Apesar do fácil acesso ao exame físico, muitos tumores de CECP são diagnosticados numa fase tardia da doença. Este fato pode ser explicado devido à demora dos pacientes em procurar atendimento ou ainda a incapacidade dos profissionais de saúde em diagnosticar a doença (1,5). A proporção de pacientes diagnosticados com tumores em estágios avançados não mudou nos últimos anos, mesmo com o aumento das campanhas de prevenção (1). Da mesma maneira, apesar dos avanços no tratamento e melhora da qualidade de vida dos pacientes, os índices de sobrevivência pouco melhoraram nos 30 últimos anos (1,2).

O prognóstico dos pacientes portadores de CECP é realizado a partir de dados clínicos e histopatológicos do tumor. As características clínicas como tamanho (T), presença de metástases cervicais (N) e metástases à distância (M) classificam a neoplasia de acordo com o sistema TNM da American Joint Committee on Cancer (6). A determinação do TNM pode ser realizada no momento do diagnóstico clínico (cTNM) ou após o exame histopatológico da peça cirúrgica

(pTNM) (7). A combinação dos escores do sistema TNM determina o estadiamento clínico do tumor em 0, I, II, III, IVA, IVB e IVC.

As características histopatológicas dos CECP também devem ser consideradas no momento de determinar o prognóstico do paciente. A classificação dos tumores de acordo com a proporção de células diferenciadas e imaturas tem sido utilizada desde 1927 e já sofreu várias modificações ao longo dos anos (8-11). As alterações mais significativas foram: a graduação da porção mais indiferenciada do tumor e a avaliação da relação tumor/hospedeiro (9,10). Além disso, uma vez que a população de células tumorais é heterogênea, a área mais adequada para a graduação histopatológica é a zona de invasão, pois as células desta região com frequência apresentam características semelhantes às encontradas em tumores metastáticos (11).

De todos os processos envolvidos na carcinogênese, a invasão local e a formação de metástases são os parâmetros clínicos mais relevantes para determinar o prognóstico. Dentro do mesmo tumor há uma hierarquia celular na qual apenas algumas células possuem a capacidade de perpetuação e desenvolvimento de metástases (11-13). Estas células de comportamento diferenciado são capazes de determinar uma das características biológicas mais importantes para o prognóstico dos tumores (12). Esta subpopulação de células neoplásicas apresenta características semelhantes às células tronco mesenquimais (CTM), levando alguns autores a afirmar que o câncer é uma proliferação descontrolada de células com propriedades semelhantes às células tronco (14-19).

CÉLULAS TUMORAIS COM PROPRIEDADES DE CÉLULA TRONCO

A presença de uma população celular com características semelhantes às CTM foi primeiramente descrita em alterações malignas do sistema hematopoiético, como a leucemia mielóide aguda (20). Posteriormente, a presença destas células foi descrita em tumores sólidos de mama, próstata, pâncreas e cabeça e pescoço (21-24). A partir deste conhecimento, surgiu a hipótese da existência de células tronco tumorais (14,17). Porém, atualmente, o termo mais adequado para nomear esta população é célula tumoral com características de célula tronco (cancer stem-like cell-CSLC) (17).

A teoria da carcinogênese a partir das CSLC sugere que o câncer tem origem em células tronco ou progenitoras do tecido devido a desregulação das vias de sinalização da auto-renovação (17). Esta teoria também é sustentada por uma série de observações comuns aos estudos, tais como: apenas um pequeno número de células neoplásicas é capaz de dar origem a um novo tumor quando transplantadas para camundongo imunocomprometido e os tumores originados deste tipo de xenotransplante são heterogêneos, contêm CSLC e células neoplásicas comuns; as CSLC podem ser separadas das outras células neoplásicas por meio de marcadores de membrana específicos e ainda podem ser transplantadas serialmente por várias gerações, indicando a capacidade de auto-renovação (14,17,21,25-27,64).

Portanto, apenas as CSLC apresentam potencial tumorigênico, as outras células neoplásicas têm uma capacidade limitada de proliferação (17,21,28). De acordo com esta hipótese, as CSLC têm a capacidade de sustentar o crescimento do tumor assim como as CTM mantêm o tecido sadio. Este novo modelo de tumorigênese provocou um grande impacto no estudo do câncer, bem como no entendimento dos mecanismos básicos da iniciação tumoral e a procura por novas estratégias de tratamento.

Assim como em outros tipos de tumores sólidos, no carcinoma espinocelular foi identificada uma população de células tumorais com características de células tronco que retêm a propriedade de auto-renovação e são responsáveis pela formação e crescimento do tumor (14,21,28-30). O comportamento clínico agressivo do carcinoma espinocelular pode ser atribuído à característica das CSLC que apresentam aumento da atividade de transporte transmembrana e conseqüentemente maior resistência aos agentes quimioterápicos e radiação. Em estudo *in vitro* as CSLC de uma linhagem de células de carcinoma espinocelular foram submetidas a cinco tipos de quimioterápicos (carboplatina, docetaxel, paclitaxel, cisplatina e 5-fluorouracil). Após um regime de 48 horas de exposição ao medicamento ainda restavam células viáveis (31). Portanto, as CSLC seriam responsáveis pela resistência às terapias, recorrência, invasão e metástase tumoral (14).

MARCADORES DE CSLC

As CSLC podem ser isoladas das outras células neoplásicas em tumores de diferentes origens (21-24,32-36). Esta população celular compartilha características comuns, como por exemplo, a expressão da molécula de adesão CD44 e a Aldeído Desidrogenase (19,21).

MOLÉCULA DE ADESÃO CD44

O CD44 é codificado por um único gene no cromossomo 11p13 e consiste em um grupo polimórfico de glicoproteínas transmembrana que agem na interação célula-célula e célula-matriz (32,37-39). Além disto, o CD44 está relacionado com a orientação das células epiteliais diferenciadas em migrarem para as camadas descamativas (40).

A família de proteínas do CD44 apresenta 20 variantes descritas (32,38). Na organização desta molécula estão envolvidos 20 exons, mas somente os 5 primeiros e os 5 últimos são constantes. Os 10 exons restantes, localizados entre estas duas regiões, ligam-se de maneira aleatória formando múltiplas isoformas de tamanhos diferentes (CD44v). A molécula padrão (CD44s) é capaz de identificar todas as demais variantes e está relacionada com progressão tumoral, capacidade de invasão e formação de metástases (29,32,39).

O CD44 é composto de um domínio extracelular, contendo o receptor; um domínio que atravessa a membrana plasmática e uma cauda citoplasmática (38,39). O receptor pode interagir com várias moléculas da matriz extracelular (MEC) como galectina-8, colágeno, fibronectina, fibrinogênio e laminina, porém o principal ligante é o ácido hialurônico (32,38). O ácido hialurônico (AH) apresenta três funções principais, as quais podem contribuir para a progressão tumoral: aumenta o nível de hidratação dos tecidos, o que poderia facilitar a movimentação das células; participa de interações célula tumoral-matriz, facilitando a sobrevivência celular e invasão; interage com vários tipos de receptores de superfície celular (40).

A ativação da porção externa do CD44 altera a interação da cauda citoplasmática com moléculas intracelulares que modulam a sobrevivência e proliferação celular bem como a estrutura do citoesqueleto (39-41). A interação CD44/AH pode ativar determinados oncogenes e facilitar características essenciais

para a progressão tumoral, como proliferação, sobrevivência, migração e invasão celular (39,40,42). As modificações intracelulares resultantes da interação CD44/AH ocorrem principalmente pela ativação das proteínas RhoA e ROK. A primeira regula os níveis de cálcio intracelular, que, quando livre no citoplasma, provoca a alteração do citoesqueleto e a progressão do ciclo celular, conseqüentemente aumentando a proliferação celular. A ROK também está envolvida na regulação de proteínas do citoesqueleto, bem como na secreção de metaloproteinases (MMPs) responsáveis pela degradação da MEC durante a invasão tumoral (39).

Várias isoformas do CD44 estão presentes em células de tumores de mama (22), próstata (23), pâncreas (24), sistema digestivo (33) e cabeça e pescoço (21,43-45,65), no entanto, este comportamento é heterogêneo, gerando dúvidas sobre o papel do CD44 na carcinogênese (39,40,43,45-47). Estes resultados contraditórios podem ser devido as diferentes metodologias de avaliação do CD44, como por exemplo a citometria de fluxo (21) e a imunistoquímica (43), bem como a isoforma estudada e a localização anatômica dos tumores (39,48).

Estudos que avaliaram a expressão do CD44 em CECP e epitélio normal adjacente ao tumor por meio da imunistoquímica demonstraram que nos estágios iniciais da carcinogênese há um aumento da imunoexpressão do CD44 e da proliferação celular (43-45,48,49). Além disso, o aumento da expressão do CD44 estimularia a maior atividade do receptor de fator de crescimento epitelial (epidermal growth factor receptor-EGFR) (39,50,51). Em um estágio seguinte as células epiteliais perdem a expressão desta molécula de adesão e adquirem um fenótipo de mobilidade, apresentando a capacidade de invasão (43-45,48,49).

Em estudo recente os autores demonstraram que a super expressão do CD44s pode determinar um pior prognóstico de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (48). Porém, estudos com outras variantes da família do CD44 encontraram resultados distintos, relacionando a redução da marcação com prognóstico ruim (45,49,52,53). Existem ainda estudos que não encontraram relação da imunoexpressão de diferentes isoformas do CD44 com características clinicopatológicas do CECP (43,46,54). Estas conclusões distintas entre os estudos podem ser explicadas pelo fato da população tumoral ser heterogênea e haver

diferenças na imunexpressão do CD44 de acordo com a região do tumor avaliada (39).

Apesar das divergências de resultados para o papel da imunomarcção do CD44 em CECP, de acordo com as funções desta molécula de adesão, pode-se concluir que num primeiro momento, a interação CD44/HA estabiliza a célula neoplásica, estimulando a sua proliferação e o crescimento do tumor (40,45). Por outro lado, a perda da imunexpressão do CD44 indicaria um segundo passo da progressão tumoral, em que as células perdem a adesão célula-célula e célula-matriz, esta última liberando o ácido hialurônico, determinando um meio extracelular mais hidratado e propício para a mobilidade celular, o que facilita a capacidade de invasão e migração das células neoplásicas (40,43,45,48,49). Desta maneira, a imunomarcção do CD44 pode variar de acordo com o momento de evolução em que se encontram as células tumorais.

ALDEÍDO DESIDROGENASE

A aldeído desidrogenase (ALDH1) é uma enzima citosólica responsável pela oxidação de aldeídos intracelulares em ácidos carboxílicos (56,57). Várias isoformas já foram descritas e sua localização é citoplasmática, na mitocôndria e retículo endoplasmático. A principal função da ALDH1 é a conversão do retinaldeído em ácido retinóico, segundo passo do processo de metabolização do retinol (vitamina A) (15,34,56-58).

O primeiro estágio de conversão do retinol é um processo reversível, entretanto a segunda etapa, a formação do ácido retinóico, é um processo irreversível, sendo possível apenas em células que possuem expressão da ALDH1 (57). O ácido retinóico é um metabólico ativo do retinol que está relacionado com o controle da proliferação e desenvolvimento celular uma vez que serve como ligante de receptores nucleares que regulam a transcrição (57-59). Desta maneira, o retinol e seus metabólitos estão envolvidos no processo final de diferenciação de células maduras porém apresentam papel oposto nas CTM, promovendo a capacidade de auto renovação (34).

Devido a esta relação da ALDH1 com a capacidade de auto renovação, esta molécula tornou-se um marcador tanto de CTM quanto de CSLC em vários tecidos, podendo ser avaliada com diferentes técnicas, incluindo a imunistoquímica

(15,36,60). Em tecidos epiteliais saudáveis, a imunomarcagem da ALDH1 evidencia sua localização principalmente nas camadas basal e parabasal (34,59). Além disso, a ALDH1 pode ser observada em células do sistema endócrino, nas glândulas salivares, tireóide, hipófise e adrenal (34,35).

Entretanto, tecidos de mesma origem, como os tecidos epiteliais, podem apresentar uma variação de expressão da ALDH1. Deng et al. (2010) avaliando tecidos epiteliais saudáveis observaram que a imunomarcagem da ALDH1 é distinta e pode ser classificada em três tipos: tecidos sem marcação, tecidos com marcação fraca e tecidos com marcação evidente e intensa. Além disso, os autores observaram uma clara correlação no padrão de expressão da ALDH1 entre tumores e tecidos de origem (34).

Muitos estudos relacionam a superexpressão de ALDH1 com prognóstico e tempo de sobrevivência ruins, concluindo que tumores com alta expressão de ALDH1 apresentam comportamento clínico mais agressivo e conseqüentemente, tempo de sobrevivência menor dos pacientes (35,36,60-62). Devido à relação do ALDH1 com o metabolismo do retinol e conseqüentemente como controle da auto-renovação e proliferação celular, esta enzima identifica células tumorais com capacidade de manutenção do tumor (34).

Os marcadores CD44 e ALDH1 são usados para identificar células com características semelhantes às CTM dentro da população celular tumoral (64). Uma vez que estas células são responsáveis pelo desenvolvimento e manutenção do tumor (14,19,21,25-27,64), a imunomarcagem de CD44 e ALDH1 evidencia tumores com maior capacidade de invasão e disseminação de metástases, conseqüentemente com pior prognóstico (35,36,40,43,45,48,49,60-62).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. WARNAKULASURIYA S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45: 309-16.
2. JEMAL A, BRAY F, CENTER MM, FERLAY J, WARD E, FORMAN D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
3. SQUIER CA, KREMER MJ, WERTZ PW. Effect of ethanol on lipid metabolism and epithelial permeability barrier of skin and oral mucosa in the rat. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 595-599.
4. HOWIE NM, TRIGKAS TK, CRUCHLEY AT, WERTZ PW, SQUIER CA, WILLIAMS DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis* 2001; 7: 349-354.
5. GROOME PA, ROHLAND SL, HALL SF, IRISH J, MACKILLOP WJ, O'SULLIVAN B. A population-based study of factors associated with early versus late stage oral cavity cancer diagnoses. *Oral Oncol* 2011; 47: 642-647.
6. EDGE SB, COMPTON CC. The AJCC the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *An Surg Oncol* 2010; 17: 1471-1474.
7. VAN DER SCHROEFF MP, JONG RJB. Staging and prognosis in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2009; 45: 356-360.
8. BRODERS AC. Carcinoma of the mouth: types and degrees of malignancy. *Ann J Roentgenol Rad Ther Nucl Med* 1927; 17: 90-93.
9. JAKOBSSON PA, ENEROTH CM, KILLANDER D, MOBERGER G, MÅRTENSSON B. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol* 1973; 12: 1-8.
10. ANNEROTH G, BATSAKIS J, LUNA M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res* 1987; 95: 229-249.
11. BRYNE M, KOPPANG H, LILLENG R, STENE T, BANG G, DABELSTEEN E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 432-437.

12. YANAMOTO S, KAWASAKI G, YAMADA SI, YOSHITOMI I, KAWANO T, YONEZAWA H, ROKUTANDA S, NARUSE T, UMEDA M. Isolation and characterization of cancer stem-like side population cells in human oral cancer cells. *Oral Oncol* 2011 Jul 12. [Epub ahead of print]
13. LIANG X. EMT: new signals from the invasive front. *Oral Oncol* 2011; 47: 686-687.
14. REYA T, MORRISON SJ, CLARKE MF, WEISSMAN IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111.
15. DOUVILLE J, BEAULIEU R, BALICKI D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cell Develop* 2009; 18: 17-25.
16. BURKET J, WRIGHT NA, ALISON MR. Stem cells and cancer: an intimate relationship. *J Pathol* 2006; 209: 287-297
17. WICHA MS, LIU S, DONTU G. Cancer stem cells: an old idea-a paradigm shift. *Cancer Res* 2006; 66: 1883-1890.
18. ARMSTRONG L, STOJKOVIC M, DIMMICK I, AHMAD S, STOJKOVIC P, HOLE N, LAKO M. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells* 2004; 22: 1142-1151.
19. CLAY MR, TABOR M, OWEN JR, 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 deshydrogenase. *Head Neck* 2010; 32:1195-1201.
20. BONNET D, DICK JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997;3:730-737.
21. PRINCE ME, SIVANANDAN R, KACZOROWSKI A, WOLF GT, KAPLAN MJ, DALERBA P, WEISSMAN IL, CLARKE MF, AILLES LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104 (3): 973-978.
22. AL-HAJJ M, WICHA MS, BENITO-HERNANDEZ A, MORRISON SJ, CLARKE MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3983-3988.

23. COLLINS AT, BERRY PA, HYDE C, STOWER MJ, MAITLAND NJ. Prostate identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005; 65: 10946-10951.
24. LI C, HEIDT DG, DALERBA P, BURANT CF, ZHANG L, ADSAY V, WICHA M, CLARKE MF, SIMEONE DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 2007; 67: 1030-1037.
25. ADAMS JM, STRASSER A. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res* 2008; 68 (11): 4018-4021.
26. LOBO NA, SHIMONO Y, QIAN D, CLARKE MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 675-699.
27. REDONDO JM, UGARTE EB, GARCIA JAM, DEL CERRO MH, VAN DEN STEEN PE, OPDENAKKER G, TEROL MJ, GARCIA AP. Alpha4beta1 integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. *Blood* 2008; 112: 169-178.
28. BIANCHINI C, CIORBA A, PELUCCHI S, PIVA R, PASTORE A. Head and neck cancer: the possible role of stem cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008; 265: 17-20.
29. PRIES R, WITTKOPF N, TRENKLE T, NITSCH SM, WOLLENBERG B. Potential stem cell marker CD44 is constitutively expressed in permanent cell lines of head and neck cancer. *In Vivo* 2008; 22: 89-92.
30. HARPER LJ, PIPER K, COMMON J, FORTUNE F, MACKENZIE IC. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2007; 36: 594-603.
31. OKAMOTO A, CHIKAMATSU K, SAKAKURA K, HATSUSHIKA K, TAKAHASHI G, MASUYAMA K. Expansion and characterization of cancer stem cell-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2009; 45: 633-639.
32. NAOR D, WALLACH-DAYAN SB, ZAHALKA MA, SIONOV RV. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in a cancer dissemination. *Sem Cancer Biol* 2008; 18: 260-267.
33. TAKAISHI S, OKUMURA T, TU S, WANG SS, SHIBATA W, VIGNESHWARAN R, GORDON SA, SHIMADA Y, WANG TC. Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cell* 2009; 27 (5): 1006-1020.

34. CHUTE JP, MURAMOTO GG, WHITESIDES J, COLVIN M, SAFI R, CHAO NJ, MCDONNELL DP. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 11707-11712.
35. 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, BUTZON 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: e10277.
36. 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: 555-567.
37. ARUFFO A, STAMENKOVIC I, MELNICK M, UNDERHILL CB, SEED B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61: 1301-1313.
38. NAOR D, SIONOV RV, ISH-SHALOM D. CD44: structure, function and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997; 71: 241-319.
39. WANG SJ, BOURGUIGNON LYW. Role of hyaluronan-mediated CD44 signaling in head and neck squamous cell carcinoma progression and chemoresistance. *Am J Pathol* 2011; 178: 956-963.
40. VARKI A, CUMMINGS RD, ESKO JD, FREEZE HH, STANLEY P, BERTOZZI CR, ETZLER ME. Essentials of glycobiology 2009; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cap 15, 37 e 44.
41. GERGOLIOS A, BATISTATOU A, CHARALABOPOULOS A, MANOLOPOULOS L, CHARALABOPOULOS K. The role of CD44 adhesion molecule in oral cavity cancer. *Exp Oncol* 2006; 28: 94-98.
42. TOOLE BP. Hyaluronan-CD44 Interactions in Cancer: Paradoxes and Possibilities. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 7462-7468.
43. MACK B, GIRES O. CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *Plos One* 2008; 3: e3360.

44. OLIVEIRA LR, OLIVEIRA-COSTA JP, ARAUJO IM, SOAVE DF, ZANETTI JS, SOARES FA. Cancer stem cell immunophenotypes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Pathol Med* 2011; 40: 135-142.
45. BÁNKFALVI A, KRABORT M, BUCHWALOW IB, VÉGH A, FELSZEGHY E, PIFFKÓ J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin and β -catenin) during oral carcinogenesis and tumor progression. *J Pathol* 2002; 198: 343-351.
46. OLIVEIRA DT, SHERRIFF M, ODELL EW. Expression of CD44 variant exons by primary and metastatic oral squamous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1998; 27:303-307.
47. HEROLD-MENDE C, SEITER S, BORN AI, PATZELT E, SCHUPP M, ZÖLLER J, BOSCH FX, ZÖLLER M. Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Pathol* 1996; 179: 66-73.
48. KOKKO LL, HURME S, MAULA SM, ALANEN K, GRÉNMAN R, KINNUNEN I, VENTELA S. Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011; 47: 510-516.
49. GONZÁLES-MOLES MA, BRAVO M, RUIZ-ÁVILA I, ESTEBAN F, BASCONES-MARTÍNEZ A, GONZÁLES-MOLES S. Adhesion molecule CD44 expression in non-tumor epithelium adjacent to tongue cancer. *Oral Oncol* 2004; 40: 281-286.
50. WOBUS M, KUNS R, WOLF C, HORN LC, KÖHLER U, SHEYN I, WERNESS BA, SHERMAN LS. CD44 mediates constitutive type I receptor signaling in cervical carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 2001; 83: 227-234.
51. WOBUS M, RANGWALA R, SHEYN I, HENNIGAN R, COILA B, LOWER EE, YASSIN RS, SHERMAN LS. CD44 associates with EGFR and erbB2 in metastasizing mammary carcinoma cells. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002; 10: 34-39.
52. STOLL C, BARETTON G, SOOST F, TERPE HJ, DOMIDE P, LOË U. Prognostic importance of the expression of CD44 splice variants in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1999; 35: 484-489.

53. MOSTAAN LV, KHORSANDI MT, SHARIFIAN SM, SHANDIZ FH, MIRASHRAFI F, SABZARI H, BADIEE R, BORGHEI H, YAZDANI N. Correlation between E-cadherin and CD44 adhesion molecules expression and cervical lymph node metastasis in oral tongue SCC: Predictive significance or not. *Pathol Res Pract* 2011; 207: 448-451.
54. VAN HAL NL, VAN DONGEN GA, STIGTER-VAN WALSUM M, SNOW GB, BRAKENHOFF RH. Characterization of CD44v6 isoforms in head-and-neck squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer* 1999; 82: 837-45.
55. BIDDLE A, LIANG X, GAMMON L, FAZIL B, HARPER LJ, EMICH H, COSTEA DE, MACKENZIE IC. Cancer stem cells in squamous cell carcinoma switch between two distinct phenotypes that are preferentially migratory or proliferative. *Cancer Res* 2011 Jul 26. [Epub ahead of print]
56. RIVEROS-ROSA H, JULIAN-SANCHEZ A, PINA E. Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Arch Med Res* 1997; 28: 453-471.
57. DUESTER G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis clinicopathological and immunohistochemical. *Cell* 2008; 134: 921-931.
58. KUMAR S, SANDELL LL, TRAINOR PA, KOENTGEN F, DUESTER G. Alcohol and aldehyde dehydrogenases: retinoid metabolic effects in mouse knockout models. *Biochim Biophys Acta* 2011; Apr 15 [Epub ahead of print].
59. YU M, GUAN K, ZHANG C. The promoting effect of retinoic acid on proliferation of chicken primordial germ cells by increased expression of cadherin and catenins. *Amino Acids* 2010; 40: 933-941.
60. LIANG D, SHI Y. Aldehyde dehydrogenase-1 is a specific marker for stem cells in human lung adenocarcinoma. *Med Oncol* 2011 Apr 12 [Epub ahead of print].
61. DUONG V, ROCHETTE-EGLY C. The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 1023-1031.
62. 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: 69-76.

63. YU CC, LO WL, CHEN YW, HUANG PI, HSU HS, TSENG LM, HUNG SC, KAO SY, CHANG CJ, CHIOU SH. Bmi-1 Regulates Snail Expression and Promotes Metastasis Ability in Head and Neck Squamous Cancer-Derived ALDH1 Positive Cells. *J Oncol* 2011 [Epub ahead of print].
64. 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: 9969-9978.

OBJETIVOS

1. Avaliar o perfil sócio demográfico e condições bucais dos pacientes com tumor primário de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço do sul do Brasil.
2. Identificar e quantificar as células tumorais positivas e negativas para a imunomarcção de CD44 e ALDH1 em duas áreas do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço: centro do tumor e zona de invasão.
3. Avaliar a relação entre a imunomarcção de CD44 e ALDH1 com os parâmetros clínicos e histopatológicos do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.
4. Verificar a distância entre as ilhas tumorais positivas para a imunomarcção de CD44 e ALDH1 e os vasos sanguíneos.

Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico *Head and Neck* (Qualis Odontologia A1 – Ano base 2008, Fator de Impacto 2.182).

PERFIL SÓCIO DEMOGRÁFICO E CONDIÇÕES BUCAIS DE PACIENTES
PORTADORES DE CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO
ATENDIDOS EM HOSPITAL DE REFERÊNCIA DO SUL DO BRASIL.

Ana Luísa Carvalho^{1*}; Laura de Campos Hildebrand^{1*}; Alex Nogueira Hass²; Isabel da Silva Lauxen¹; Manoel Sant'Ana Filho¹.

1. Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
2. Periodontia, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul

*Ambos autores contribuíram da mesma maneira para a realização do artigo

RESUMO

Antecedentes: Países em desenvolvimento apresentam alta incidência de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (CECP). Os principais fatores de risco para este tumor são a exposição ao fumo e ao álcool. Nível sócioeconômico e condições bucais podem estar associados à etiologia.

Objetivo: Avaliar o perfil sócio demográfico e condições bucais dos pacientes, bem como as características clínicas e histopatológicas do CECP.

Métodos: Foram avaliados 78 pacientes que buscaram atendimento em hospital do sul do Brasil no período de Outubro de 2009 à Outubro de 2010. Dados sobre sexo, idade, cor da pele, educação, hábitos de higiene bucal, nível sócio econômico e história odontológica foram obtidos por meio de entrevista. Cárie, perda dentária e uso de próteses dentárias foram acessados por meio de um exame intrabucal.

Resultados: A média de idade da população estudada foi de 57,6 anos, sendo que a maioria da amostra era constituída de homens (80,8%), brancos (83,3%), fumantes atuais ou ex-fumantes (94,8%) com história de consumo moderado ou severo de bebidas alcólicas (82%). Os pacientes apresentaram baixo nível sócio-econômico (56,4%) e poucos anos de estudo (80,8%). Segundo as características clínicas, 60,2% dos casos foram classificados como T1 e T2, sendo que 59% não

apresentaram metástases regionais. A localização mais frequente foi a boca (73%), sendo a língua o sítio mais acometido (26,9%). Quanto à classificação histopatológica, 57,7% dos tumores foram classificados em graus III e IV.

Conclusão: O perfil do paciente portador de CECP observado no presente estudo assemelha-se ao de outras populações, entretanto o momento do diagnóstico está mudando, sendo realizado nos estágios iniciais da doença.

Palavras-chave: carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço; câncer de boca; etiologia; incidência.

INTRODUÇÃO

Os países em desenvolvimento, como Brasil, Paquistão e Índia, apresentam maior incidência de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (CECP) do que países desenvolvidos.¹⁻⁴ Na América do Sul, a região que compreende Argentina, sul do Brasil e Uruguai tem os níveis mais elevados de incidência desta neoplasia, sendo que no Brasil são observadas as maiores taxas.^{5,6}

Na população brasileira, o CECP é o sétimo tipo de câncer mais comum e a estimativa para os anos de 2010 e 2011 é de 14.120 casos novos, dos quais 10.330 em homens e 3.790 em mulheres.³ Os homens brasileiros apresentam o terceiro maior risco para desenvolvimento do câncer de boca no mundo, após a França e Índia.^{2,6} A distribuição de casos novos é heterogênea entre os estados e capitais do país, entretanto, as regiões Sudeste e Sul apresentam maiores taxas de incidência, em especial, as cidades de São Paulo e Porto Alegre.⁶

O consumo de álcool e tabaco representa um dos principais fatores de risco para estes tumores⁵⁻⁹ e geralmente são consumidos juntos. Esta associação aumenta significativamente o risco para o desenvolvimento do câncer, uma vez que uma das características do álcool é a sua capacidade de modificar a permeabilidade da mucosa facilitando a penetração de substâncias carcinogênicas presentes no fumo.^{7,10} A higiene oral também é relatada como possível fator de risco.^{1,2,9} As desigualdades sociais podem ser consideradas como fator de risco para o desenvolvimento do tumor, uma vez que o baixo nível sócioeconômico está relacionado a hábitos que afetam o comportamento e estilo de vida.^{2,11}

O diagnóstico precoce é possível a partir de um correto exame da boca e orofaringe, entretanto, a maioria dos tumores ainda é diagnosticada num momento

tardio, quando a doença está em estágio avançado.^{4,6} Tal fato contribui para as baixas taxas de sobrevida em cinco anos, assim como para um tratamento mais agressivo.^{2,6,12,13}

O sistema TNM de classificação da American Joint Committee on Cancer (AJCC)¹⁴ tem como objetivo ajudar profissionais da saúde e pesquisadores a escolher opções de tratamento, estimar o prognóstico e comparar resultados de diferentes terapias.¹⁵ Esta classificação baseia-se nas características clínicas da lesão como tamanho do tumor em sua maior extensão (T), presença de metástases regionais (N) e presença de metástases à distância (M). Quando esta classificação é realizada antes do tratamento cirúrgico, é referido como TNM clínico (cTNM), e quando realizada após o exame histopatológico do tecido ressecado é referido como TNM patológico (pTNM).¹⁶

Além das características clínicas do tumor, a graduação histopatológica, exposição aos fatores de risco, idade do paciente e tipo de tratamento são aspectos envolvidos no prognóstico.^{15,17-19} O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil sócio demográfico e condições bucais dos pacientes, bem como as características clínicas e histopatológicas de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço no sul do Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra do Estudo:

Foram avaliados 78 pacientes atendidos no Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Departamento de Otorrinolaringologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) no período de Outubro de 2009 a Outubro de 2010. Foram incluídos pacientes maiores de idade de ambos os sexos com diagnóstico de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço primário sem tratamento prévio.

Entrevista:

Todos os pacientes foram informados dos objetivos e métodos da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (GPPG nº09-315). Os pacientes foram entrevistados para obtenção de dados sociodemográficos e comportamentais. Foram obtidas informações como sexo, idade, cor da pele, estado civil e educação, além de hábitos de higiene bucal, fumo, consumo de bebidas alcoólicas, percepção das condições bucais, nível sócio econômico, história médica e odontológica.

Exame Clínico:

Os pacientes foram examinados para obtenção de informações como uso de próteses dentárias removíveis (prótese total/parcial, superior/inferior) e suas condições dentárias (CPOD).²⁰ Nos prontuários do hospital, foram coletadas as informações referentes às características clínicas do tumor como o pTNM¹⁶ e a terapêutica utilizada em cada caso. Os pacientes receberam tratamento para o tumor de acordo com protocolo do HCPA:

- Somente tratamento cirúrgico;
- Tratamento cirúrgico associado à radioterapia;
- Somente radioterapia;
- Tratamento cirúrgico associado à radioterapia e quimioterapia;
- Radioterapia associada à quimioterapia;
- Nenhum tratamento.

Após 18 meses do início do estudo, foi realizado um acompanhamento dos pacientes participantes a partir das informações contidas nos prontuários.

Gradação Histopatológica:

A gradação histopatológica dos tumores foi realizada por dois patologistas (AC e LH) em lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE) de acordo com os critérios de Bryne et al. (1989).²¹ A reprodutibilidade foi confirmada ao longo do estudo, onde a cada 20 lâminas graduadas, uma era sorteada para reavaliação após um período de 7 dias (Kappa>0,7).

Análise Estatística:

Os indivíduos foram divididos em três grupos etários (<50, 50-59 e ≥ 60 anos de idade). Cor da pele foi definida como "brancos" ou "não-brancos", já que a população do estudo incluiu apenas uma pequena porcentagem de outros grupos raciais e étnicos. O nível econômico foi avaliado segundo o Critério Brasil da Associação Brasileira de Empresas de Pesquisa (CCEB).²² O nível econômico foi categorizado em estratos alto e baixo nível utilizando a mediana dos escores do CCEB. O nível educacional foi classificado em três categorias: ≤ 4, 5-8 e ≥ 9 anos de estudo.

A exposição ao fumo foi calculada de maneira combinada para os pacientes fumantes atuais e ex-fumantes. O nível de exposição ao fumo foi calculado por meio da multiplicação do número de maços de cigarros consumidos por dia pelo

número de anos de hábito (n° maços/dia X n° anos de hábito X 365 dias). A exposição ao fumo foi categorizada de acordo com tertil de cigarros-ano em: pacientes que nunca fumaram (0 cigarros-ano), nível 1 (1-8887 cigarros-ano), nível 2 (8888-18250 cigarros-ano) e nível 3 (> 18.250 cigarros-ano).

O consumo diário de álcool foi calculado multiplicando o número de doses consumidas em uma semana pelo teor médio de álcool puro por volume em um copo de cerveja, vinho ou cachaça (bebida alcoólica típica brasileira, do tipo destilada, produzida a partir da cana de açúcar) dividido por 7 dias. A quantidade de álcool puro em volume foi estimado em 10 ml para um copo de cerveja (200ml por copo de cerveja, teor alcoólico de 5%), 12ml para um copo de vinho (100 ml por copo de vinho, teor de álcool 12%), e 10ml para um copo de cachaça (25 ml por copo de cachaça, teor de álcool 40%). Para obter a quantidade de álcool em gramas, o álcool puro em volume foi convertido para álcool puro em peso utilizando o fator de conversão padrão de 0,8. Assim, um copo de cerveja apresenta 8g de etanol puro, um copo de vinho 9.6g de álcool puro, e uma dose de cachaça 8g de etanol puro. Os indivíduos foram classificados de acordo com tertil de consumo diário de álcool em pacientes que nunca beberam (0g/dia), hábito leve (1-8.5g/dia), hábito moderado (8.6-32g/dia) e hábito severo (> 32 g/dia).

A análise dos dados foi realizada utilizando o pacote estatístico STATA (Stata 10 para Macintosh, Stata Corporation, College Station, TX, EUA). As estatísticas descritivas são relatadas para cada variável. São relatados o número e a percentagem relativa de indivíduos para as variáveis categóricas. Médias e desvios-padrão (DP) foram relatados para variáveis contínuas.

RESULTADOS

A média de idade dos pacientes foi de 57,6 anos sendo a maioria dos indivíduos homens (80,8%), brancos (83,3%), fumantes atuais ou ex-fumantes (94,8%) e com história de consumo moderado ou severo de bebidas alcólicas (82%). Outras características comuns aos pacientes avaliados foram o baixo nível sócio-econômico (56,4%), poucos anos de estudo (80,8%) e mais de 1 ano sem consulta odontológica (66,7%). O tratamento mais frequente para o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço foi a intervenção cirúrgica associada ou não à

radioterapia (83,6%). Outras informações referentes aos pacientes incluídos no estudo estão descritas na tabela 1.

A tabela 2 descreve as condições bucais dos indivíduos no que se refere à experiência de cárie, perda dentária e uso de próteses. Quanto ao uso de próteses dentárias removíveis, 65,4% dos pacientes usam e 34,6% não. De acordo com a experiência de cárie, 25,6% dos pacientes avaliados foram desdentados totais. Nos pacientes com dentes (74,4%), a média de dentes perdidos foi de 17,1 dentes e o número do CPOD ficou em 10,7.

Quanto ao tamanho do tumor, 60,2% dos casos foram classificados como T1 e T2, enquanto que 39,7% como T3 e T4. A presença de metástases regionais foi relatada em 42,4% dos casos, e a ausência em 59%. A localização mais frequente dos tumores foi na boca (73%), sendo a língua o sítio mais acometido (26,9%). De acordo com a graduação histopatológica, 57,7% dos tumores foram classificados em graus III e IV (tabela 3).

Tabela 1. Perfil sócio-demográfico e comportamental dos pacientes do estudo.

Variável	n	%
Idade		
Média	57,6 anos	
Máx.	78 anos	
Min.	37 anos	
<50 anos	20	25.6
50-59 anos	21	26.9
≥60 anos	37	47.4
Sexo		
Feminino	15	19.2
Masculino	63	80.8
Cor da Pele		
Branco	65	83.3
Não-branco	13	16.7
Estado Civil		
Casado	48	61.5
Solteiro/divorciado	19	24.4
Viúvo	11	14.1
Nível Sócioeconômico		
Alto	34	43.6
Baixo	44	56.4
Anos de Estudo		
Alto	15	19.2
Médio	28	35.9
Baixo	35	44.9
Frequência de Escovação		
<1 vez/dia	39	50
≥1 vez/dia	39	50
Uso de Colutório		
Sim	21	26.9
Não	57	73.1
Visita ao Dentista		
<1 ano	26	33.3
≥1 ano	52	66.7
Fumo		
Fumante atual	37	47.4
Ex-fumante	37	47.4
Nunca fumou	4	5.12
Exposição ao Fumo		
Nunca fumou	4	5.1
Leve	21	27
Moderado	24	30.8
Severo	29	37.2
Consumo de Álcool		
Nunca bebeu	5	6.4
Leve	9	11.5
Moderado	27	34.6
Severo	37	47.4
Tratamento Oncológico		
Cirurgia	43	57.3
Cirurgia+radioterapia	20	26.3
Radioterapia	4	5.3
Cirurgia+radioterapia +quimioterapia	4	5.3
Radioterapia +quimioterapia	4	5.3
Nenhum	3	3.8
Acompanhamento (18 meses)		
Livre de doença	54	69.2
Recidiva	15	19.2
Metastase	2	2.6
Óbito	4	5.1
Sem informação	3	3.8
Total	78	100.0

Tabela 2. Uso de prótese e condições dentárias dos pacientes do estudo.

Variável	Estimativa
Prótese (n/%)	
Nenhuma	27 (34.6)
Superior	34 (43.6)
Inferior	1 (1.3)
Superior/Inferior	16 (20.5)
Edêntulo (n/%)	
Sim	20 (25.6)
Não	58 (74.4)
Dentes perdidos (média±dp)	17.1±9.7
Experiência de cárie (média±dp)*	
CPOD	10.7±9.1
COD	2.9±2.9

*Apenas indivíduos com dentes

Tabela 3. Características clínicas e histopatológicas dos tumores.

Variável	n	%
Tamanho		
T1	22	28.2
T2	25	32
T3	14	17.9
T4	17	21.8
Metástase regional		
N0	46	59
N1	20	27
N2	7	9
N3	5	6.4
Metástase		
M0	78	100
M1	0	0
Localização		
Língua	21	26.9
Assoalho	10	12.8
Lábio	10	12.8
Palato	11	14.1
Mucosal jugal	5	6.4
Pescoço	21	27
Gradação histopatológica		
Não graduados	12	15.4
In situ	5	6.4
II	8	10.2
III	18	23.1
IV	27	34.6
Sem Informação	8	10.2
Total	78	100.0

DISCUSSÃO

A incidência do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) está decrescendo ao longo dos últimos anos⁴, entretanto ainda representa o sexto tipo de câncer mais comum no mundo.⁶ O CECP é uma lesão mais comumente encontrada em indivíduos do sexo masculino, acima dos 50 anos de idade. As características clínicas dos pacientes avaliados neste estudo foram semelhantes ao perfil relatado na literatura.^{4,6,19} No presente estudo, os indivíduos mais acometidos pela neoplasia além do fato de serem homens, com média de idade de 57,6 anos, eram de cor de pele branca. A predominância de indivíduos de pele clara neste estudo é devido ao fato da pesquisa ter sido realizada em um centro de referência do sul do Brasil, onde a população é predominantemente branca.

No presente estudo, a maior parte dos pacientes avaliados apresentavam exposição moderada e severa para fumo (68%) e álcool (82%), evidenciando a relação entre o câncer de boca e o consumo combinado destes dois fatores. Apesar de haver um declínio na prevalência do tabagismo na população adulta brasileira²³, 94,8% dos pacientes avaliados neste estudo eram fumantes ou ex-fumantes. Este declínio do hábito de fumar ainda não apresentou um reflexo na incidência do CECP, o que talvez seja observado nas próximas décadas.

Um aspecto interessante deste estudo foi o fato de não haver diferença para o desenvolvimento do CECP entre indivíduos fumantes atuais e ex-fumantes (47,43% para ambos). Além disso, 18 pacientes (dados não apresentados) cessaram o hábito de fumar há menos de 1 ano, sugerindo que os efeitos carcinogênicos do tabaco são cumulativos. Portanto, mesmo sem exposição atual ao fumo, o paciente continua sendo considerado como de risco para o desenvolvimento desta neoplasia.

As localizações mais frequentes do CECP na boca são a língua, assoalho de boca e lábio inferior.^{2,12,13} Nos pacientes avaliados, o sítio mais acometido foi a língua (26,92%), seguido do palato (14,1%), assoalho e lábio inferior (12,82% para ambos). A alta incidência do palato na amostra estudada pode ser devido à combinação desta região anatômica com os tumores que acometem a orofaringe e se estendem para a boca.

As modalidades de tratamento para o CECP são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia com avanços significativos em todas estas modalidades.¹³

Entretanto, a ressecção cirúrgica é a terapia mais indicada para o tratamento definitivo. A combinação de cirurgia com radioterapia apresenta melhora nas taxas de sobrevivência em 5 anos.^{1,17} No presente estudo, o tratamento mais frequente foi a intervenção cirúrgica associada ou não à radioterapia (83,6%) conforme preconizado pela literatura. O acompanhamento dos pacientes em 18 meses mostrou que 69,3% estavam livres de doença, demonstrando ser esta a melhor indicação terapêutica para o CECP.

Outras características comuns observadas nesta amostra foram o baixo nível sócio econômico e poucos anos de estudo, fatores que também estão relacionados com o local de realização do estudo. A coleta de dados ocorreu em um hospital da rede pública do sul do Brasil, sendo a maioria dos indivíduos atendidos de baixa renda. Entretanto, o baixo nível socioeconômico foi relacionado como um fator de risco para o desenvolvimento do CECP por outros grupos de pesquisadores,^{2,11,24} mas o perfil dos pacientes permanece o mesmo tanto em países pobres e em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos.²

A maior parte dos pacientes avaliados nesta pesquisa (66,7%) relataram um intervalo de tempo superior há um ano desde a última consulta odontológica. Segundo alguns autores, há uma associação significativa entre a falta de atendimento odontológico e o desenvolvimento do câncer bucal.^{12,25} Os resultados destes estudos demonstraram que o mau estado da boca e dentes pode ser causa independente do câncer de cabeça, pescoço e esôfago.¹² Entretanto, o presente estudo não encontrou tal relação, uma vez os pacientes dentados apresentaram uma média de CPOD (10,7) menor do que a encontrada na população adulta brasileira (16,3).²⁶ Além disso, não houve relação entre a frequência de escovação e o desenvolvimento do tumor (Tabela 1).

Segundo a literatura, a gradação histopatológica determina o comportamento tumoral que irá refletir no prognóstico dos pacientes, uma vez que tumores indiferenciados apresentam maior índice de recidiva e desenvolvimento de metástases.²¹ A maioria dos casos avaliados neste estudo apresentaram classificação histopatológica nos graus III e IV (66,4%), entretanto 69,2% estão livres de doença após 18 meses. Isto demonstra que a população celular é heterogênea e o comportamento do tumor não pode ser determinado somente por um ou outro parâmetro isoladamente e sim pelo somatório destes.

Em geral, o diagnóstico do CECP é realizado em estágios tardios, quando os tumores apresentam dimensões maiores e conseqüentemente presença de metástases regionais, determinado um prognóstico ruim para os pacientes.^{4,6,17} Entretanto, no presente estudo, 60,2% dos casos foram classificados como T1 e T2 e 59% sem metástases cervicais. Estes dados podem ser explicados por alguns fatores, tais como: melhora no treinamento dos profissionais de saúde para o diagnóstico destas lesões; instrução do auto-exame em campanhas de prevenção de câncer de boca; e melhor acesso à serviços de referência em saúde.

O perfil do paciente portador de CECP observado no presente estudo assemelha-se ao de outras populações, entretanto o momento do diagnóstico está mudando, sendo realizado nos estágios iniciais da doença.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Otorrinolaringologia e às Equipes de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silver HJ, Guimaraes CCG, Pedruzzi P et al. Predictors of functional decline in locally advanced head and neck cancer patients from south Brazil. *Head Neck* 2010; 32:1217-1225.
2. Cancela MC, Voti L, Guerra-Yi M, Chapuis F, Mazuir M, Curado MP. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head Neck* 2010; 32: 357-367.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro: INCA, 2009.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
5. World Health Organization, Globocan. Acesso em Julho 2011: <http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm>
6. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45: 309-16.

7. Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Effect of ethanol on lipid metabolism and epithelial permeability barrier of skin and oral mucosa in the rat. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 595-599.
8. Szyman´ska K, Hung RJ, Wunsch-Filho V et al. Alcohol and tobacco, and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Latin America: a case-control study. *Cancer Causes Control* 2011; 22: 1037-1046.
9. Wunsch-Filho VW. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol* 2002; 38: 737-746.
10. Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis* 2001; 7: 349-354.
11. Boing AF, Antunes JL, de Carvalho MB, de Góis Filho JF, Kowalski LP, Michaluart P Jr. How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk? *J Epidemiol Community Health* 2011; 65:709-714.
12. Guha N, Boffetta P, Wünsch Filho V et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol* 2007; 166: 1159-1173.
13. Rapidis AD, Gullane P, Langdon JD, Lefebvre JL, Scully C, Shah JP. Major advances in the knowledge and understanding of the epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis, management and prognosis of oral cancer. *Oral Oncol* 2009; 45: 299-300.
14. Edge SB, Compton CC. The AJCC the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *An Surg Oncol* 2010; 17: 1471-1474.
15. van der Schroeff MP, Jong RJB. Staging and prognosis in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2009; 45: 356-360.
16. Takes RP, Rinaldo A, Silver CE et al. Future of the TNM classification and staging system in head and neck cancer. *Head Neck* 2010; 32: 1693-1711.
17. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell cancer overview. *Oral Oncol* 2009; 45: 301-308.
18. Araújo Júnior RF, Barboza CAG, Clebis NK, Moura SAB, Costa ALL. Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical

- classification in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13: E344-E347.
19. Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol* 2010; 20: 2-9.
 20. WHO. Caries prevalence: DMFT and DMFS. Acesso em Julho 2011: <http://www.whocollab.od.mah.se/expl/orhdmft.html>.
 21. Bryne M, Koppang H, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 432-437.
 22. Associação Brasileira de Empresas de pesquisa (ABEP). Critério de classificação econômica Brasil. Acesso em Julho 2011: <http://www.abep.org/novo/ContentID=302>.
 23. Monteiro CA, Cavalcante TM, Moura EC, Claro RM, Szwarcwald CL. Population-based evidence of a strong decline in the prevalence of smokers in Brazil (1989–2003). *Bull World Health Organ* 2007; 85: 527–534.
 24. Conway DI, Petticrew M, Marlborough H, Berthiller J, Hashibe M, Macpherson LM. Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Int J Cancer* 2008; 122: 2811–2819.
 25. Holmes Jr L, des Vignes-Kendrick M, Slomka J, Mahabir S, Beeravolu S, Emani SR. Is dental care utilization associated with oral cavity cancer in a large sample of community-based United States residents? *Community Dent Oral Epidemiol* 2009; 37: 134–142.
 26. Brasil. Ministério da Saúde. SB Brasil 2010. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Acesso em Julho 2011: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacaonova_281210.pdf
 27. Susin C, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Tooth loss and associated risk indicators in an adult urban population from south Brazil. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2005; 63: 85–93.

Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico *Oral Oncology* (Qualis Odontologia A1 – Ano base 2008, Fator de Impacto 2.891).

IMUNOMARCAÇÃO DO CD44 E ALDH1 NA ZONA DE INVASÃO E CENTRO DO TUMOR EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO.

Laura de Campos Hildebrand¹; Ana Luísa Carvalho¹; Isabel da Silva Lauxen¹;
Jacques Eduardo Nör²; Manoel Sant'Ana Filho¹.

1. Patologia Bucal, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul
2. Faculdade de Odontologia, Universidade de Michigan

RESUMO

No carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço o CD44 e ALDH1 são utilizados para identificar uma população celular com características semelhantes às células tronco mesenquimais. Estas células são responsáveis pela formação e crescimento do tumor, além de determinarem características relevantes para o prognóstico. O objetivo deste estudo foi avaliar a imunexpressão de CD44 e ALDH1 na zona de invasão e centro do tumor de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, bem como a relação da imunomarcção com os parâmetros clínicos dos tumores. Além disso, foi mensurada a distância entre as ilhas tumorais da zona de invasão e os vasos sanguíneos. A amostra compreendeu 46 indivíduos com tumores primários. De toda a peça cirúrgica foram eleitos blocos de parafina mostrando a área central do tumor e a zona de invasão. A partir deste material foi realizada a graduação histopatológica e imunomarcção do CD44 e ALDH1. Não houve diferença da distância dos vasos sanguíneos e as ilhas tumorais positivas e negativas para o CD44 e ALDH1. A imunomarcção para os dois anticorpos não apresentou diferença entre as regiões do tumor. A imunomarcção do CD44 foi heterogênea entre os tumores e não apresentou relação com os fatores de prognóstico. O ALDH1 mostrou relação direta com tamanho, presença de metástase regional e estadiamento clínico. Concluiu-se que não há diferença no perfil de imunomarcção do CD44 e ALDH1 entre as áreas do tumor e somente a

imunomarcção positiva para ALDH1 pode identificar tumores de comportamento agressivo.

Palavras-chave: CD44; ALDH1; Carcinoma Espinocelular de Cabeça e Pescoço; Câncer de Boca

INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular é a neoplasia maligna mais comum da boca, sendo que os tumores de boca e pescoço agrupados representam o sexto tipo de câncer mais comum. Apesar dos avanços no tratamento, a taxa de sobrevida em 3 anos para pacientes com doença avançada ainda é de apenas 30-50%.^{1,2}

A invasão local e a formação de metástases são os parâmetros clínicos mais relevantes para determinar o prognóstico, e somente algumas células tumorais possuem esta capacidade.^{3,4,5} Além disso, esta subpopulação celular apresenta características semelhantes às células tronco mesenquimais (CTM).⁶⁻¹¹

Assim como em outros tipos de tumores sólidos, no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) foi identificada uma população de células que retêm a propriedade de autorenovação semelhante às CTM.¹²⁻¹⁵ As células neoplásicas com características de célula tronco podem ser isoladas da população total do tumor a partir da imunopressão de marcadores específicos como o CD44 e aldeído desidrogenase (ALDH1).^{7,12,14,16-19}

O CD44 consiste em um grupo polimórfico de glicoproteínas transmembrana que agem na interação célula-célula e célula-matriz.^{16,19-22} O principal ligante do CD44 é o ácido hialurônico (HA), um abundante componente da matriz extracelular.^{21,22} A interação CD44/HA ativa características essenciais para a progressão tumoral, tais como proliferação, sobrevivência, migração e invasão celular.^{4,22-26} Desta maneira, há uma relação entre a imunomarcção do CD44 e o comportamento tumoral.^{4,27-30}

A aldeído desidrogenase (ALDH1) é uma enzima citosólica cuja principal função é a conversão de retinaldeído em ácido retinóico no processo de metabolismo do retinol.^{31,32} Os produtos resultantes deste metabolismo promovem a capacidade de autorenovação nas CTM.^{33,34} Desta maneira, o ALDH1 também está presente em células neoplásicas que possuem esta mesma

capacidade de proliferação^{7,15,19,34-37} e em tumores com comportamento clínico agressivo.^{32,33,35,38-40}

O objetivo do presente estudo foi avaliar e relacionar a imunexpressão de CD44 e ALDH1 na zona de invasão e centro do tumor de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço com os parâmetros clínicos dos tumores e mensurar a distância entre as ilhas tumorais da zona de invasão e os vasos sanguíneos.

METODOLOGIA

De uma amostra inicial de 78 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço tratados no Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), foram selecionados 46 tumores primários. As informações clínicas dos tumores como localização, tamanho, presença de metástases cervicais e/ou à distância e o estadiamento foram coletadas nos prontuários do hospital.

De cada tumor foi selecionado um bloco de parafina contendo uma área de centro do tumor e da zona de invasão. De cada bloco de parafina foram realizados três cortes seriados de 3µm cada um. Dois cortes foram utilizados para a imunomarcção de CD44 e ALDH1 e outro para coloração por hematoxilina e eosina (HE). A partir das lâminas coradas por HE, os tumores foram graduados por dois patologistas bucais (LCH e ALHC) de acordo com os critérios de Anneroth et al.⁴⁰ para o centro do tumor e Bryne et al.³ para a zona de invasão. Desta maneira, os tumores foram classificados em graus I, II, III e IV segundo suas características morfológicas em cada zona tumoral avaliada.

A técnica de imunistoquímica para ambos os marcadores foi realizada segundo protocolo do Angiogenesis Research Laboratory da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan. Para os dois anticorpos a recuperação antigênica foi desenvolvida com a Dako retrieval solution citrate pH6.0 (Dako, Carpinteria, CA, USA) em banho-maria, a 95°C, por 40 minutos. Foi utilizado o anticorpo anti-CD44s (clone EPR1013Y, coelho, Abcam, Washington, D.C., USA) na diluição de 1:100 e o anticorpo anti-ALDH1 (clone 44, camundongo, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) na concentração de 1:50. Para o controle negativo utilizou-se soro não imune da mesma espécie animal de desenvolvimento do anticorpo primário. O sistema de detecção empregado foi o

Mach 3™ para anti-corpo primário de camundongo ou coelho, marcado com *Horseradish peroxidase* (Biocare Medical, Concord, CA, USA). Como cromógeno foi utilizada a diaminobenzidina (DAB). As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer e montadas.

Foram consideradas positivas para o ALDH1 as células que apresentaram imunomarcção em seu citoplasma. Para o CD44 foram consideradas positivas as células com imunomarcção em membrana. A imunoexpressão de ambos marcadores foi classificada em negativa - menos de 5% das células tumorais marcadas e positiva - mais de 5% das células tumorais marcadas (Figuras 1 e 2). Foram utilizados 2 casos de carcinoma espinocelular in situ para avaliação descritiva dos marcadores.

A avaliação foi realizada em duas regiões distintas do tumor: zona de invasão e centro do tumor. A zona de invasão foi identificada como as primeiras ilhas tumorais localizadas próximas à área de transição entre o epitélio adjacente e tumor. Para determinação do centro do tumor, foram avaliadas as ilhas tumorais localizadas na região central da neoplasia, evitando áreas de necrose.

Para a medida da distância entre as ilhas da zona de invasão tumoral e os vasos sanguíneos foram capturadas imagens por meio de uma câmera de vídeo (Q-Color5™, Olympus America, Inc., Center Valley, PA, USA) acoplada a um microscópio, no aumento de 200x. As imagens foram registradas utilizando o *software* QCapture Pro™ 5 (QImaging Co., Surrey, BC, Canada). De cada lâmina histológica foram capturadas tantas imagens quanto o necessário para avaliação de toda zona de invasão tumoral. As imagens foram transferidas para o *software* Image Pro-Plus 5.1 (Media Cybernetics, Inc., Silver Spring, Maryland, USA) onde foi quantificada a distância entre os vasos sanguíneos e as ilhas tumorais positivas e negativas para imunoexpressão de ambos marcadores estudados.

Todos os dados foram analisados no programa SPSS, versão 18. As variáveis quantitativas foram submetidas ao teste de Kolmogorov-Smirnov, indicando ter distribuição normal ($p > 0,05$). Para a comparação da distância das ilhas tumorais para os vasos sanguíneos foi utilizado o teste t-student. Para verificação da associação entre a imunoexpressão dos marcadores com os parâmetros clínicos dos tumores foi utilizado o teste Qui-Quadrado de Pearson e o teste Exato de Fisher.

A reprodutibilidade foi confirmada ao longo do estudo, onde a cada 20 lâminas avaliadas (HE, CD44 e ALDH1), uma era sorteada para reavaliação após um período de 7 dias ($Kappa > 0,7$). Além disso, durante a avaliação das lâminas histológicas, os examinadores estavam cegos para qual paciente pertencia o material.

Todos os pacientes participantes foram informados dos objetivos e métodos da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, bem como o estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (GPPG/HCPA nº09-315).

RESULTADOS

A maior parte dos tumores (67,4%) foi diagnosticada com menos de 4 cm na sua maior dimensão (T1 e T2) e ausência de metástases regionais (N0). Nenhum paciente apresentou metástase à distância no momento da primeira avaliação. Não houve diferença entre os dois critérios de graduação histopatológica utilizados (dados não mostrados). Para a avaliação da graduação histopatológica com os demais parâmetros, foi utilizado o critério de Bryne et al.³ 58,6% dos casos apresentaram estadiamento clínico nos graus I e II. 89,2% dos tumores foram classificados de acordo com suas características histopatológicas em graus III e IV (Tabela 1). A boca foi a localização mais frequente, sendo os sítios mais acometidos a língua, lábio inferior e assoalho (dados não mostrados).

A tabela 2 mostra que, no período de acompanhamento, 33 pacientes estavam livres da doença e 11 apresentaram recidiva, metástase ou evoluíram para o óbito. A maioria dos tumores apresentou média de distância dos vasos abaixo de 200µm. Esta medida não apresentou diferença entre os tumores com imunomarcção positiva e negativa para CD44 e ALDH1, bem como para os parâmetros clínicos e histopatológicos dos tumores (Tabela 3).

O ALDH1 mostrou relação com tamanho, presença de metástase regional e estadiamento clínico. A imunomarcção do CD44 não apresentou associação com os parâmetros clínicos e histopatológicos dos tumores (Tabela 4). Não houve diferença estatística na avaliação dos marcadores ALDH1 e CD44 entre a zona de invasão e centro do tumor (dados não mostrados). Os casos de carcinoma espinocelular in situ foram positivos para imunomarcção do CD44 e ALDH1.

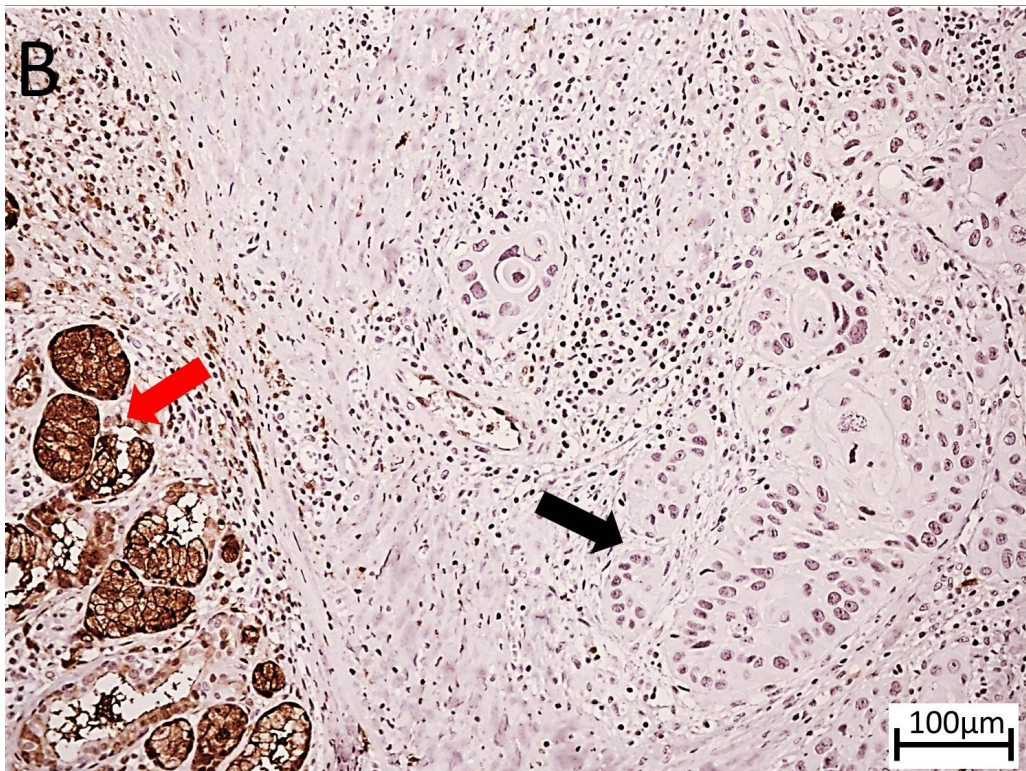
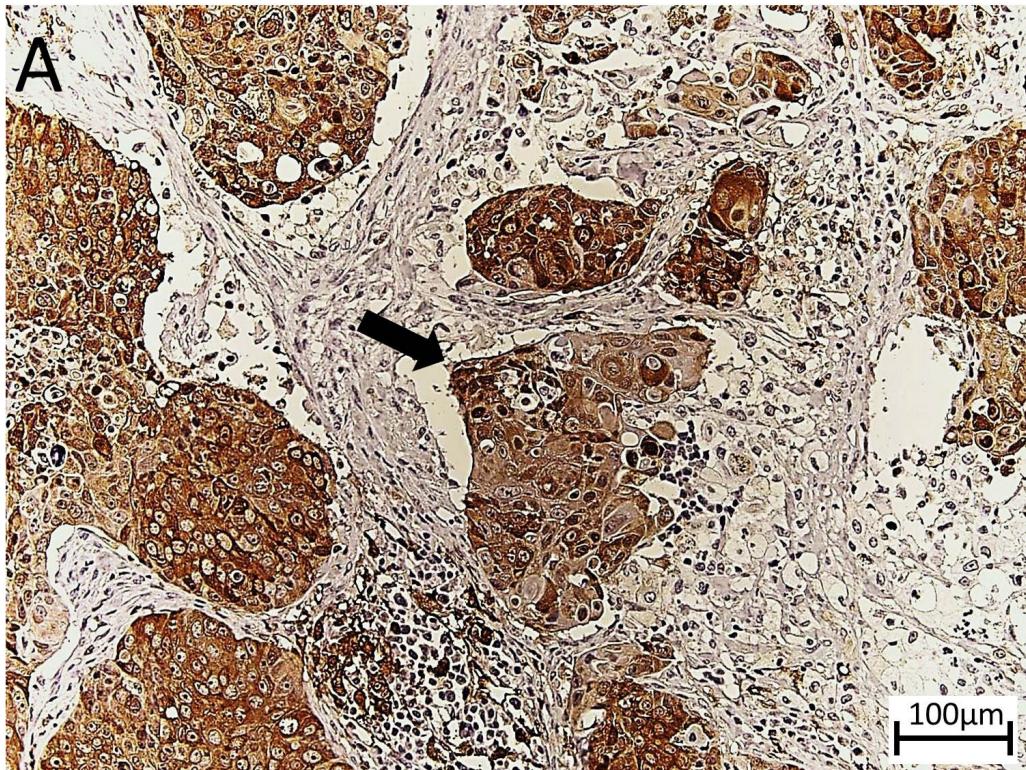


Figura 1: Imunomarcção do ALDH1. A: ilha tumoral com imunomarcção positiva (seta preta). B: Ilha tumoral com imunomarcção negativa (seta preta) e ácinos de glândula salivar com imunomarcção positiva (seta vermelha). Aumento original de 200x. FONTE: Patologia Bucal FO/UFRGS.

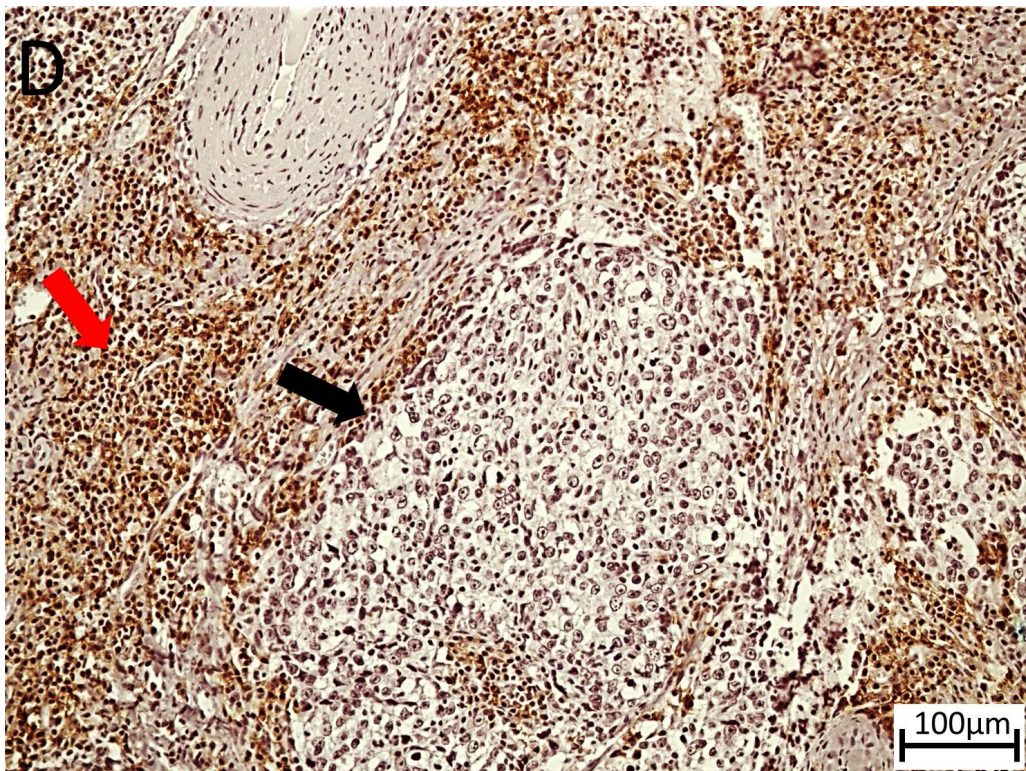
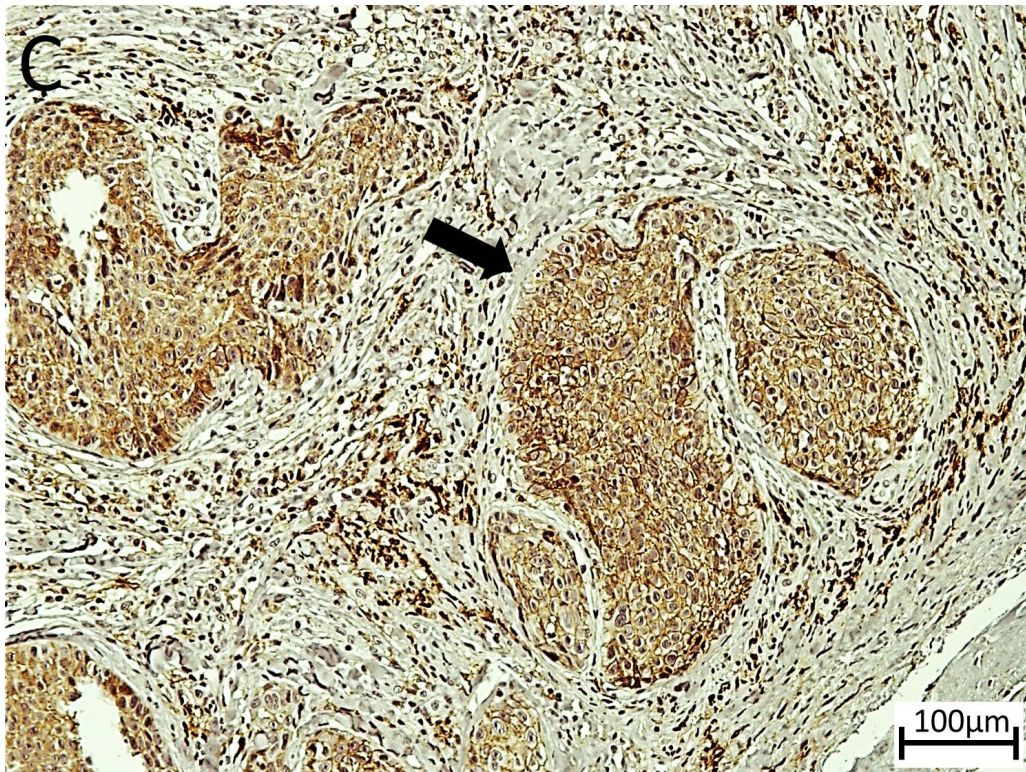


Figura 2: Imunomarcção do CD44. C: ilha tumoral com imunomarcção positiva (seta preta). D: Ilha tumoral com imunomarcção negativa (seta preta) e linfócitos com imunomarcção positiva (seta vermelha). Aumento original de 200x. FONTE: Patologia Bucal FO/UFRGS.

Tabela 1: Descrição dos dados de acordo com os parâmetros clínicos e histopatológicos dos tumores.

VARIÁVEL	n	%
TAMANHO		
1	13	28.3
2	18	39.1
3	9	19.6
4	6	13
NÓDULO		
0	31	67.4
1, 2 e 3	15	32.6
ESTÁGIO		
I	12	26
II	15	32.6
III	10	21.8
IV	9	19.6
LOCALIZAÇÃO		
Boca	30	65.2
Pescoço	16	34.8
GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA		
II	5	10.8
III	17	37
IV	24	52.2
TOTAL	46	100

Tabela 2: Descrição dos dados de acordo com o acompanhamento, estadiamento clínico, graduação histopatológica e imunomarcagem de CD44 e ALDH1.

ACOMPANHAMENTO (18 meses)	n	ESTADIAMENTO				GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA			ALDH1		CD44	
		I	II	III	IV	II	III	IV	-	+	-	+
Livre de doença	33	9	13	5	6	4	13	16	20	13	16	17
Prognóstico ruim	11	3	2	3	3	1	3	7	4	7	4	7
Sem informação	2											
TOTAL	46											

Tabela 3: Média da distância entre as ilhas tumorais da zona de invasão e vasos sanguíneos.

MÉDIA DISTÂNCIA (μm)	ALDH1	CD44
Média negativo	79,7	85,13
Máx.	225	219,8
Min.	9,7	9
Média positivo	87,3	79,2
Máx.	174,9	174,2
Min.	23,7	21,7

Tabela 4: Relação entre a imunomarcção de ALDH1 e CD44 com parâmetros clínicos e histopatológicos dos tumores.

MARCADOR	ALDH1				p	CD44				p
	Positivo		Negativo			Positivo		Negativo		
VARIÁVEL	n	%	n	%		n	%	n	%	
Tamanho										
T1 e T2	10	32.3	21	67.7	0,007	18	58	13	42	0,310
T3 e T4	12	80	3	20		6	40	9	60	
Nódulo										
N0	10	32.3	21	67.7	0,007	17	54.8	14	45.2	0,696
N1, 2 e 3	12	80	3	20		7	46.7	8	53.3	
Estadiamento										
I e II	7	26	20	74	0,001	16	59.3	11	40.7	0,289
III e IV	15	78.9	4	21.1		8	42.1	11	57.9	
Gradação										
Histopatológica										
II	3	60	2	40	0,845	3	60	2	40	0,264
III e IV	19	46.3	22	53.7		21	51.2	20	48.8	
TOTAL			46/100%					46/100%		

Teste Qui-Quadrado de Pearson e teste Exato de Fisher, p<0,05

DISCUSSÃO

Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, ainda existem lacunas na compreensão do comportamento e progressão desta doença. A imunomarcção do CD44 e ALDH1 localiza as células tumorais com fenótipo indiferenciado e capazes de proliferar indefinidamente.^{4,7,10,12,14,16-18} Portanto, estes dois marcadores podem identificar tumores com maior capacidade de invasão e desenvolvimento de metástases, parâmetros clínicos importantes para a determinação do prognóstico.^{21,23,29,33,34,36,42}

Dos 33 pacientes livres de doença no período de acompanhamento de 18 meses, 22 foram classificados com estadiamento clínico I e II, bem como 29 apresentaram tumores com gradação histopatológica III e IV. A relação entre os dados clínicos e histopatológicos dos tumores deste grupo, permite afirmar que, a curto prazo, as características clínicas são mais relevantes do que as histopatológicas para a determinação do prognóstico do paciente.

O oxigênio se difunde no tecido por uma distância média de 100-200µm dos vasos sanguíneos,⁴³ o que explica a média de distância dos vasos encontrada neste estudo abaixo de 100µm. Porém, esta medida não apresentou diferença entre os tumores com imunomarcção positiva e negativa para CD44 e ALDH1, bem como para os parâmetros clínicos e histopatológicos dos tumores. Este dado evidencia

que independentemente do comportamento clínico do tumor e grau de diferenciação, todas as células tumorais estão localizadas em um meio ambiente propício para proliferação e desenvolvimento da neoplasia.

As células mais indiferenciadas e responsáveis pela invasão e formação de metástases estariam localizadas no fronte de invasão do tumor,^{3,4,5} portanto seria de se esperar uma imunomarcção para o CD44 e ALDH1 diferente entre esta região e o centro do tumor. Entretanto, no presente estudo, não houve diferença estatística na imunomarcção entre as áreas do tumor, bem como entre os dois critérios de gradação histopatológica utilizados. Estes dados sugerem que o perfil da população celular não difere entre as diferentes regiões do tumor, uma vez que a imunomarcção de CD44 e ALDH1 evidencia as células neoplásicas com comportamento mais agressivo.^{4,7,10,12,14,16-18}

A família do CD44 é composta por várias isoformas, sendo todas as variantes reconhecidas pelo anticorpo utilizado neste estudo. Entretanto, apesar de utilizar o mesmo clone do anticorpo, estudos apresentam resultados distintos. Enquanto alguns estudos encontraram relação entre a imunomarcção positiva do CD44s com o pior prognóstico do CECP,^{17,24,28,44,45} outros observaram que a perda do CD44s indicaria menor sobrevida dos pacientes.^{39,46,47} No presente estudo este marcador não apresentou relação com os parâmetros clínicos relativos ao prognóstico dos tumores, resultado que concorda com outros estudos na literatura.^{27,29} Estes achados variados podem ser explicados pelo fato da população tumoral ser heterogênea e estar em estágios distintos da carcinogênese.

Num primeiro momento, a ligação do CD44 ao ácido hialurônico da matriz extracelular estabiliza a célula neoplásica, estimulando a proliferação e conseqüentemente o crescimento da ilha tumoral.^{24,26} Por outro lado, a perda da expressão do CD44 indicaria um segundo passo da progressão tumoral, em que as células perdem a adesão célula-célula e célula-matriz facilitando a invasão e migração das células neoplásicas.^{16,20,22,24-26} Esta relação entre a interação CD44/HA e o estímulo da proliferação celular pode ser observado no presente estudo por meio da avaliação do perfil de imunomarcção do CD44 nos casos de carcinoma in situ. Estes casos estão num período do desenvolvimento tumoral em que a proliferação predomina sobre a mobilidade celular e invasão, portanto as células estão positivas para imunoexpressão do CD44.

Em tumores invasivos, o CD44 apresentou distribuição dos casos semelhante entre a imunomarcção positiva e negativa. Este resultado pode ser devido à característica da população tumoral ser heterogênea, contendo células em diferentes estágios de maturação e proliferação. Enquanto numa área do tumor predomina a proliferação e conseqüentemente a imunomarcção positiva do CD44, em outra região esta molécula de adesão está ausente, caracterizando células com fenótipo de mobilidade e capacidade de invasão.^{12,44,45}

No presente estudo, a imunomarcção do ALDH1 apresentou relação com parâmetros importantes para a determinação do prognóstico, tais como tamanho do tumor, presença de metástases regionais e estadiamento clínico. Os tumores com imunomarcção positiva para o ALDH1 apresentaram tamanho maior no momento do diagnóstico e presença de metástase regional, resultando em um estadiamento clínico mais avançado.

O ALDH1 foi negativo para a maior parte dos os pacientes livres de doença, evidenciando a relação entre a ausência de ALDH1 com tumores de comportamento menos agressivo. Este resultado concorda com a literatura na medida que a imunomarcção positiva do ALDH1 indica tumores com maior potencial proliferativo e comportamento clínico agressivo.^{32,33,35,38-40} A identificação dos tumores mais indiferenciados pela imunomarcção da ALDH1 é devido a presença desta enzima em células com capacidade de autorevoção e proliferação por tempo indefinido responsáveis pela manutenção do tumor.³¹⁻³⁴

De acordo com os resultados deste estudo, concluímos que não há diferença no perfil de imunomarcção do CD44 e ALDH1 entre as áreas do tumor. Bem como, não há diferença na distância das ilhas tumorais positivas e negativas para os vasos sanguíneos. Dos marcadores estudados, somente a imunomarcção positiva para ALDH1 pode identificar tumores de comportamento agressivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Serviço de Otorrinolaringologia e às Equipes de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Às equipes do Laboratório de Histopatologia Prof. Dr. J. J. Barbachan da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil e

Angiogenesis Research Laboratory da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan, EUA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45: 309-316.
2. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
3. Bryne M, Koppang H, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 432-437.
4. Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2009; 45: 633-639.
5. Liang X. EMT: new signals from the invasive front. *Oral Oncol* 2011; 47: 686-687.
6. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111.
7. Douville J, Beaulieu R, Balicki D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cell Develop* 2009; 18: 17-25.
8. Burket J, Wright NA, Alison MR. Stem cells and cancer: an intimate relationship. *J Pathol* 2006; 209: 287-297
9. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea-a paradigm shift. *Cancer Res* 2006; 66: 1883-1890.
10. Armstrong L, Stojkovic M, Dimmick I, Ahmad S, Stojkovic P, Hole N et al. Phenotypic characterization of murine primitive hematopoietic progenitor cells isolated on basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Stem Cells* 2004; 22: 1142-1151.
11. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 3983-3988.

12. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 973-978.
13. Bianchini C, Ciorba A, Pelucchi S, Piva R, Pastore A. Head and neck cancer: the possible role of stem cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2008; 265: 17-20.
14. Pries R, Wittkopf N, Trenkle T, Nitsch SM, Wollenberg B. Potential stem cell marker CD44 is constitutively expressed in permanent cell lines of head and neck cancer. *In Vivo* 2008; 22: 89-92.
15. Harper LJ, Piper K, Common J, Fortune F, Mackenzie IC. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2007; 36: 594-603.
16. Naor D, Wallach-Dayana SB, Zahalka MA, Sionov RV. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in a cancer dissemination. *Sem Cancer Biol* 2008; 18: 260-267.
17. Oliveira LR, Oliveira-Costa JP, Araujo IM, Soave DF, Zanetti JS, Soares FA. Cancer stem cell immunophenotypes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Pathol Med* 2011; 40: 135-142.
18. 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: 9969-9978.
19. Sterz CM, Kulle C, Dakic B, Makarova G, Böttcher MC, Bette M et al. A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9. *Oral Oncol* 2010; 46: 116-122.
20. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell* 1990; 61: 1301-1313.
21. Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function and association with the malignant process. *Adv Cancer Res* 1997; 71: 241-319.
22. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR et al. Essentials of glycobiology. 2nd Edition New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2009

23. Wang SJ, Bourguignon LYW. Role of hyaluronan-mediated CD44 signaling in head and neck squamous cell carcinoma progression and chemoresistance. *Am J Pathol* 2011; 178: 956-963.
24. Bánkfalvi A, Krabort M, Buchwalow IB, Végh A, Felszeghy E, Piffkó J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin and β -catenin) during oral carcinogenesis and tumor progression. *J Pathol* 2002; 198: 343-351.
25. Gergolios A, Batistatou A, Charalabopoulos A, Manolopoulos L, Charalabopoulos K. The role of CD44 adhesion molecule in oral cavity cancer. *Exp Oncol* 2006; 28: 94-98.
26. Toole BP. Hyaluronan-CD44 interactions in cancer: paradoxes and possibilities. *Clin Cancer Res* 2009; 15: 7462-7468.
27. Mack B, Gires O. CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *Plos One* 2008; 3 (10): e3360.
28. Kokko LL, Hurme S, Maula SM, Alanen K, Grénman R, Kinnunen I et al. Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011; 47: 510-516.
29. Oliveira DT, Sherriff M, Odell EW. Expression of CD44 variant exons by primary and metastatic oral squamous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1998; 27:303-307.
30. Herold-Mende C, Seiter S, Born AI, Patzelt E, Schupp M, Zöller J et al. Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Pathol* 1996; 179: 66-73.
31. Riveros-Rosa H, Julian-Sanchez A, Pina E. Enzymology of ethanol and acetaldehyde metabolism in mammals. *Arch Med Res* 1997; 28: 453-471.
32. Duester G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis clinicopathological and immunohistochemical. *Cell* 2008; 134: 921-931.
33. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M et al. ALDH1 Is a Marker of Normal and Malignant Human Mammary Stem Cells and a Predictor of Poor Clinical Outcome. *Cell Stem Cell* 2007; 1: 555-567.
34. Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, Colvin M, Safi R, Chao NJ et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 11707-11712.

35. Duong V, Rochette-Egly C. The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 1023-1031.
36. Yu C, Yao Z, Dai J, Zhang H, Escara-Wilke J, Zhang X et al. ALDH Activity Indicates Increased Tumorigenic Cells, But Not cancer Stem Cells, in Prostate Cancer Cell Lines. *In Vivo* 2011; 25: 69-76.
37. Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 385: 307-313.
38. Yu CC, Lo WL, Chen YW, Huang PI, Hsu HS, Tseng ML et al. Bmi-1 regulates snail expression and promotes metastasis ability in head and neck squamous cancer-derived ALDH1 positive cells. *J Oncol* 2011 [Epub ahead of print].
39. Lugli A, Iezzi G, Hostettler I, Muraro MG, Mele V, Tornillo L et al. Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2010; 103: 382-390.
40. Clay MR, Tabor M, Owen JR, 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 deshydrogenase. *Head Neck* 2010; 32:1195-1201.
41. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent* 1987; 95: 229-249.
42. Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q et al. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *Plos One* 2010; 5: e10277.
43. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.
44. Kosunen A, Pirinen R, Ropponen K, Pukkila M, Kellokoski J, Virtaniemi J, Sironen R et al. CD44 expression and its relationship with MMP-9, clinicopathological factors and survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2007; 43: 51-59.

45. Jong MC, Pramana J, van der Wal JE, Lacko M, Peutz-Kootstra CJ, Jong JM et al. CD44 expression predicts local recurrence after radiotherapy in larynx cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5329-5338.
46. Gonzalez-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Avila I, Esteban F, Rodriguez-Archilla A, Gonzalez-Moles S et al. Adhesion molecule CD44 as a prognostic factor in tongue cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 5197-5202.
47. Carinci F, Stabellini G, Calvitti M, Pelucchi S, Targa L, Farina A, Pezzetti F et al. CD44 as prognostic factor in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Craniofac Surg* 2002; 13: 85-89.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os países em desenvolvimento apresentam maior incidência de carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (CECP) (1,2,3). Na América do Sul, a região que compreende Argentina, sul do Brasil e Uruguai tem os níveis mais elevados de incidência desta neoplasia, sendo que no Brasil são observadas as maiores taxas (4,5). Na população brasileira, o CECP é o sétimo tipo de câncer mais comum e a estimativa para o ano de 2010 é de 14.120 casos novos (3). A distribuição de casos novos é heterogênea entre os estados e capitais do país, entretanto, as regiões Sudeste e Sul apresentam maiores taxas de incidência, em especial, as cidades de São Paulo e Porto Alegre (5).

O perfil dos pacientes avaliados neste estudo foi semelhante ao relatado na literatura, apresentando média de idade de 57,6 anos, sendo a maioria homens (80,8%), brancos (83,3%), fumantes atuais ou ex-fumantes (94,8%) e consumo moderado ou severo de bebidas alcólicas (82%). Um aspecto interessante foi o fato de não haver diferença para o desenvolvimento do CECP entre indivíduos fumantes atuais e ex-fumantes (47,43% para ambos), sugerindo que os efeitos carcinogênicos do tabaco são cumulativos. Portanto, mesmo sem exposição atual ao fumo, o paciente continua sendo considerado como de risco para o desenvolvimento desta neoplasia. Além disso, 18 pacientes cessaram o hábito de fumar há menos de 1 ano da data de diagnóstico do tumor.

Grande parte da amostra deste estudo apresentou baixo nível socioeconômico (56,4%) e poucos anos de estudo (80,8%). As desigualdades sociais podem ser consideradas como fator de risco para o desenvolvimento do tumor, uma vez que o baixo nível socioeconômico está relacionado com hábitos que afetam o comportamento e estilo de vida (2,6).

A localização mais frequente dos tumores foi a boca (73%), sendo a língua o sítio mais acometido (26,9%). Quanto à graduação histopatológica, 57,7% dos tumores foram classificados em graus III e IV. Entretanto, os tumores foram diagnosticados em estágios iniciais da doença, sendo 60,2% dos casos classificados como T1 ou T2 e 59% não apresentaram metástases regionais. Isto pode evidenciar uma possível melhora nos procedimentos de diagnóstico, bem como o

treinamento dos profissionais e acesso aos serviços de referência em saúde. A longo prazo estas mudanças observadas podem diminuir a morbidade e mortalidade desta neoplasia maligna.

Apesar dos avanços no diagnóstico do CECp, ainda existem lacunas na compreensão do comportamento e progressão desta doença. A partir da evidência de células tronco mesenquimais (CTM) em tecidos adultos, surgiu a hipótese de que nos tumores malignos também existam células com capacidade de sustentar a neoplasia assim como as CTM mantêm o tecido sadio. Com a evolução das pesquisas, foi possível diferenciar as células com características de CTM das demais células neoplásicas. Além disso os estudos provaram que estas células têm capacidade de perpetuação e podem reproduzir o tumor de origem a partir da implantação de um pequeno número de células (7-13).

A imunomarcção do CD44 e ALDH1 pode identificar as células tumorais com fenótipo indiferenciado e capazes de proliferar indefinidamente, evidenciando tumores com maior capacidade de invasão e desenvolvimento de metástases, parâmetros clínicos importantes para a determinação do prognóstico (9,13,14,15-18).

A família do CD44 é composta por várias isoformas, sendo todas as variantes reconhecidas pelo anticorpo utilizado neste estudo. Entretanto, apesar de utilizar o mesmo clone do anticorpo, estudos apresentam resultados distintos. Enquanto alguns estudos encontraram relação entre a imunomarcção positiva do CD44s com o pior prognóstico do CECp (17,19,20-22), outros observaram que a perda do CD44s indicaria menor sobrevida dos pacientes (23-25). No presente estudo este marcador não apresentou relação com os parâmetros clínicos relativos ao prognóstico dos tumores, resultado que concorda com outros estudos na literatura (26,27). Estes achados variados podem ser explicados pelo fato da população tumoral ser heterogênea e estar em momentos distintos da carcinogênese, portanto a presença do CD44 evidencia células em proliferação enquanto que sua ausência, células com capacidade de mobilidade no meio extracelular e capacidade de invasão.

A imunomarcção de ALDH1 identifica células com capacidade de auto renovação e potencial de proliferação por maior período de tempo, características semelhantes às CTM (14). No presente estudo, a imunomarcção do ALDH1

apresentou relação com parâmetros importantes para a determinação do prognóstico, tais como tamanho do tumor, presença de metástases regionais e estadiamento clínico. Os tumores com imunomarcção positiva para o ALDH1 apresentaram tamanho maior no momento do diagnóstico e presença de metástase regional, resultando em um estadiamento clínico mais avançado.

O ALDH1 foi negativo para a maior parte dos os pacientes livres de doença, evidenciando a relação entre da ausência de ALDH1 com tumores de comportamento menos agressivo. Este resultado concorda com a literatura na medida que a imunomarcção positiva do ALDH1 indica tumores com maior potencial proliferativo e comportamento clínico agressivo (23,28-31).

As células mais indiferenciadas e responsáveis pela invasão e formação de metástases estariam localizadas no frente de invasão do tumor (32-34), portanto seria de se esperar uma imunomarcção para o CD44 e ALDH1 diferente entre esta região e o centro do tumor. Entretanto, no presente estudo, não houve diferença estatística na imunomarcção entre as áreas do tumor, bem como entre os dois critérios de graduação histopatológica utilizados. Estes dados sugerem que o perfil da população celular não difere entre as diferentes regiões do tumor

O oxigênio se difunde no tecido por uma distância média de 100-200 μ m dos vasos sanguíneos (35), o que explica a média de distância dos vasos encontrada neste estudo abaixo de 100 μ m. Porém, esta medida não apresentou diferença entre os tumores com imunomarcção positiva e negativa para CD44 e ALDH1, bem como para os parâmetros clínicos e histopatológicos dos tumores. Este dado evidencia que independentemente do comportamento clínico do tumor e grau de indiferenciação, todas as células tumorais estão localizadas em um meio ambiente propício para proliferação e desenvolvimento da neoplasia.

A imunomarcção de CD44 e ALDH1 pode identificar células tumorais com comportamento diferenciado das demais, porém para afirmar que estas células identificadas são as verdadeiras células tronco tumorais há necessidade de utilizar outros marcadores imunoistoquímicos ou diferentes técnicas em associação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SILVER HJ, DE CAMPOS GRAF GUIMARAES C, PEDRUZZI P, BADIA M, SPULDARO DE CARVALHO A, OLIVEIRA BV, RAMOS GH, DIETRICH MS, PIETROBON R. Predictors of functional decline in locally advanced head and neck cancer patients from south Brazil. *Head Neck* 2010; 32:1217-1225.
2. CANCELA MC, VOTI L, GUERRA-YI M, CHAPUIS F, MAZUIR M, CURADO MP. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head Neck* 2010; 32: 357-367.
3. BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro: INCA, 2009.
4. WORLD HEALTH ORGANIZATION, GLOBOCAN. Acesso em Julho 2011: <http://www-dep.iarc.fr/WHOdb/WHOdb.htm>
5. WARNAKULASURIYA S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45: 309-16.
6. BOING AF, ANTUNES JL, DE CARVALHO MB, DE GÓIS FILHO JF, KOWALSKI LP, MICHALUART PJR. How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk? *J Epidemiol Community Health* 2011; 65:709-714.
7. REYA T, MORRISON SJ, CLARKE MF, WEISSMAN IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414: 105-111.
8. WICHA MS, LIU S, DONTU G. Cancer stem cells: an old idea-a paradigm shift. *Cancer Res* 2006; 66:1883-1890.
9. PRINCE ME, SIVANANDAN R, KACZOROWSKI A, WOLF GT, KAPLAN MJ, DALERBA P, WEISSMAN IL, CLARKE MF, AILLES LE. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104 (3): 973-978.
10. ADAMS JM, STRASSER A. Is tumor growth sustained by rare cancer stem cells or dominant clones? *Cancer Res* 2008; 68 (11): 4018-4021.
11. LOBO NA, SHIMONO Y, QIAN D, CLARKE MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2007; 23: 675-699.

12. REDONDO JM, UGARTE EB, GARCIA JAM, DEL CERRO MH, VAN DEN STEEN PE, OPDENAKKER G, TEROL MJ, GARCIA AP. Alpha4beta1 integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. *Blood* 2008; 112: 169-178.
13. 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: 9969-9978.
14. DOUVILLE J, BEAULIEU R, BALICKI D. ALDH1 as a functional marker of cancer stem and progenitor cells. *Stem Cell Develop* 2009; 18: 17-25.
15. PRIES R, WITTKOPF N, TRENKLE T, NITSCH SM, WOLLENBERG B. Potential stem cell marker CD44 is constitutively expressed in permanent cell lines of head and neck cancer. *In Vivo* 2008; 22: 89-92.
16. NAOR D, WALLACH-DAYAN SB, ZAHALKA MA, SIONOV RV. Involvement of CD44, a molecule with a thousand faces, in a cancer dissemination. *Semin Cancer Biol* 2008; 18: 260-267.
17. OLIVEIRA LR, OLIVEIRA-COSTA JP, ARAUJO IM, SOAVE DF, ZANETTI JS, SOARES FA. Cancer stem cell immunophenotypes in oral squamous cell carcinoma. *Oral Pathol Med* 2011; 40: 135-142.
18. STERZ CM, KULLE C, DAKIC B, MAKAROVA G, BÖTTCHER MC, BETTE M, WERNER JA, MANDIC R. A basal-cell-like compartment in head and neck squamous cell carcinomas represents the invasive front of the tumor and is expressing MMP-9. *Oral Oncol* 2010; 46: 116-122.
19. BÁNKFALVI A, KRABORT M, BUCHWALOW IB, VÉGH A, FELSZEGHY E, PIFFKÓ J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin and β -catenin) during oral carcinogenesis and tumor progression. *J Pathol* 2002; 198: 343-351.
20. KOKKO LL, HURME S, MAULA SM, ALANEN K, GRÉNMAN R, KINNUNEN I, VENTELA S. Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011; 47: 510-516.
21. KOSUNEN A, PIRINEN R, ROPPONEN K, PUKKILA M, KELLOKOSKI J, VIRTANIEMI J, SIRONEN R, JUHOLA M, KUMPULAINEN E, JOHANSSON R,

- NUUTINEN J, KOSMA VM. CD44 expression and its relationship with MMP-9, clinicopathological factors and survival in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2007; 43: 51-59.
22. JONG MC, PRAMANA J, VAN DER WAL JE, LACKO M, PEUTZ-KOOTSTRA CJ, JONG JM, TAKES RP, KAANDERS JH, VAN DER LAAN BF, WACHTERS J, JANSEN JC, RASCH CR, VAN VELTHUYSEN ML, GRÉNMAN R, HOEBERS FJ, SCHUURING E, VAN DEN BREKEL MW, BEGG AC. CD44 expression predicts local recurrence after radiotherapy in larynx cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 5329-5338.
23. LUGLI A, IEZZI G, HOSTETTLER I, MURARO MG, MELE V, TORNILLO L, CARAFA V, SPAGNOLI G, TERRACCIANO L, ZLOBEC I. Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2010; 27; 103: 382-390.
24. GONZALEZ-MOLES MA, BRAVO M, RUIZ-AVILA I, ESTEBAN F, RODRIGUEZ-ARCHILLA A, GONZALEZ-MOLES S, ARIAS B. Adhesion molecule CD44 as a prognostic factor in tongue cancer. *Anticancer Res* 2003; 23: 5197-5202.
25. 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: 85-89.
26. MACK B, GIRES O. CD44s and CD44v6 expression in head and neck epithelia. *Plos One* 2008; 3 (10): e3360.
27. OLIVEIRA DT, SHERRIFF M, ODELL EW. Expression of CD44 variant exons by primary and metastatic oral squamous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1998; 27:303-307.
28. DUESTER G. Retinoic acid synthesis and signaling during early organogenesis clinicopathological and immunohistochemical. *Cell* 2008; 134: 921-931.
29. 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: 555-567.

30. DUONG V, ROCHETTE-EGLY C. The molecular physiology of nuclear retinoic acid receptors. From health to disease. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 1023-1031.
31. YU CC, LO WL, CHEN YW, HUANG PI, HSU HS, TSENG ML, HUNG SC, KAO SY, CHANG CJ, CHIOU SH. Bmi-1 regulates snail expression and promotes metastasis ability in head and neck squamous cancer-derived ALDH1 positive cells. *J Oncol* 2011 [Epub ahead of print].
32. BRYNE M, KOPPANG H, LILLENG R, STENE T, BANG G, DABELSTEEN E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 432-437.
33. OKAMOTO A, CHIKAMATSU K, SAKAKURA K, HATSUSHIKA K, TAKAHASHI G, MASUYAMA K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* 2009; 45: 633-639.
34. LIANG X. EMT: new signals from the invasive front. *Oral Oncol* 2011; 47: 686-687.
35. CARMELIET P, JAIN RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407: 249-257.