

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

LUCIANO HENRIQUE DE JESUS

**ESTUDO DOS RECEPTORES DE RETINOL E DO PROCESSO DE
EMT EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO
– MODELO PDX EM CAMUNDONGOS BALB/C NUDE.**

PORTO ALEGRE

2017

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

LUCIANO HENRIQUE DE JESUS

**ESTUDO DOS RECEPTORES DE RETINOL E DO PROCESSO DE
EMT EM CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL – MODELO PDX
EM CAMUNDONGOS BALB/C NUDE.**

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor em Odontologia.
Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

PORTO ALEGRE

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Jesus, Luciano Henrique

ESTUDO DOS RECEPTORES DE RETINOL E DO PROCESSO DE EMT EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO - MODELO PDX EM CAMUNDONGOS BALB/C NUDE. / Luciano Henrique Jesus. -- 2017.

62 f.

Orientador: Prof. Pantelis Varvaki Rados.

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

1. carcinoma espinocelular oral. 2. modelo PDX.
3. microdissecção a laser. 4. receptores retinóides.
5. processo EMT. I. Rados, Prof. Pantelis Varvaki, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

DEDICATÓRIA

À mulher da minha vida Glauca pelo apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza, muito comuns para quem tenta trilhar novos caminhos.

Sem você nenhuma conquista valeria a pena.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a minha família, pela minha vida, minha formação e meu caráter.

Ao Prof. Dr. **Manoel Sant'Ana Filho**, por ter aceito me orientar nesta tese de doutorado até o momento de sua aposentadoria.

Ao Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados, por ter me orientado na reta final.

A Profa. Dra. Laura de Campos Hildebrand, pela segunda grande ajuda, sempre com paciência e comprometimento.

A Profa. Dra. Manoela Domingues Martins, pela confiança em sempre me convidar para fazer parte de seus projetos.

Aos professores da Patologia minha gratidão pelos ensinamentos transmitidos.

Aos colegas e amigos da Pós-graduação, especialmente os da patologia bucal, pelo companheirismo e troca de conhecimento em nosso convívio.

Aos técnicos e funcionários da Unidade de experimentação animal e do Laboratório de Patologia experimental do HCPA por todo apoio e ajuda do desenvolvimento da minha pesquisa.

À CAPES pela bolsa de doutorado. Ao CNPQ e a FIPE pelo apoio financeiro.

Aos professores que cursei disciplinas na pós-graduação e os que me aprovaram no exame de qualificação, pela contribuição na minha formação.

À todos os funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

À Banca examinadora desta defesa de tese, pelo pronto aceite e pelo tempo dedicado á avaliação e aperfeiçoamento deste documento.

Obrigado!!!

"Hoje levantei cedo pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite. É minha função escolher que tipo de dia vou ter hoje.

Posso reclamar porque está chovendo ou agradecer às águas por lavarem a poluição. Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me sentir encorajado para administrar minhas finanças, evitando o desperdício. Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar vivo.

Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que eu queria ou posso ser grato por ter nascido. Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalho. Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus por ter um teto para morar.

Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades. Se as coisas não saíram como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar.

O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser. E aqui estou eu, o escultor que pode dar forma.

Tudo depende só de mim."

Charles Chaplin.

RESUMO

Introdução: O carcinoma espinocelular (CEC) representa 7% de todos os novos casos de câncer no mundo, sendo o carcinoma espinocelular o tipo mais frequente. Tanto o comportamento biológico quanto o crescimento dos tumores devem ser melhores entendidos, uma vez que a sobrevivência dos pacientes apresentou discreta melhora nas últimas décadas. Os modelos PDX foram desenvolvidos para estudar a biologia tumoral e principalmente os mecanismos de crescimento e proliferação através da manutenção da arquitetura e microambiente tumoral do tumor original. Os retinóides possuem a capacidade de restaurar o crescimento e a diferenciação de células normais através da ação dos receptores retinóides nucleares (RARs e RXRs) que são os principais mediadores destas ações que ao sofrerem alterações na sua expressão podem levar ao desenvolvimento e manutenção de tumores. No estudo da carcinogênese o modelo PDX é uma importante ferramenta pois mantém a arquitetura e microambiente do tumor original melhorando a compreensão de algumas vias, entre estas o processo de EMT/MET, na diferenciação das células tronco tumorais e quais receptores nucleares podem estar influenciando nestas vias. **Objetivos:** Analisar os padrões de comportamento biológico - tempo de formação e expansão do tumor e a manutenção dos padrões histológicos e de arquitetura do tumor original - em F0 e F1 no modelo PDX (xenoinxerto derivado de paciente) das amostras de centro de tumor e epitélio adjacente em camundongos Balb C/nude e avaliar a expressão gênica dos receptores retinóides, ALDH1 e marcadores do processo de EMT/MET por RT-PCR em PDX de carcinoma espinocelular oral em comparação com a amostra dos pacientes doadores nas passagens F(0) e F(1). **Método:** 24 camundongos Balb C/Nude, divididos em 2 grupos TG(I) – tumor graft paciente (I) e TG(II) – tumor graft paciente (II), subdivididos em 4 grupos de 3 animais: (A) – receberam PDX do centro do tumor; (B) – receberam PDX de epitélio adjacente ao tumor (margem de segurança cirúrgica); (C) receberam PDX de um animal do grupo (A); (D) receberam PDX de um animal do grupo (B). E Após estas fases, as amostras coletadas serão avaliadas por RT-PCR para comparação das expressões gênicas entre a amostra original (CT e EA) com os PDX's nas passagens F(0) e F(1). **Resultados:** formação de tumores em todos os grupos – tanto do PDX de fragmento de centro do tumor quanto do PDX do epitélio adjacente. E A expressão gênica dos parâmetros observados não diferem no tumor original e passagem F(0) significativamente diferentes em F(1) ($p < 0,05$). **Conclusões:** A técnica do PDX para o CEC é possível de ser realizada em menor tempo com a implantação de apenas um fragmento do tumor. Os tumores resultantes do PDX apresentaram tamanho suficiente para novas passagens, bem como para seu

uso em estudos de comportamento biológico das células neoplásicas. Quanto ao epitélio adjacente ao tumor (margem de segurança cirúrgica) constatou-se a presença de células tumorais com potencial de promover o crescimento de tumores devendo portanto ser melhor observada nas ressecções. O PDX de primeira passagem F(0) é o que mais se assemelha com o tumor original sendo o melhor para testes terapêuticos e estudos da carcinogênese do CEC oral.

Keywords: CECP, modelo PDX, xenoenxerto, margem de segurança cirúrgica, , receptores retinóides, microdissecção a laser.

ABSTRACT

Introduction: Squamous cell carcinoma (SCC) represents 7% of all new cases of cancer in the world, with squamous cell carcinoma being the most frequent type. Both the biological behavior and the growth of the patients should be better understood, since the patients' survival show unobtrusive improvement in the last decades. PDX models were developed to study a tumor biology and especially the mechanisms of growth and proliferation through maintenance of the architecture and tumor microenvironment of the original tumor. Retinoids have a capacity to restore normal cell growth and differentiation through the action of nuclear retinoid receptors (RARs and RXRs) that are the main mediators and maintenance actions of tumors. In the study of carcinogenesis, the PDX model is an important tool because it maintains an architecture and microenvironment of the original tumor, improving an understanding of some pathways, among them in the EMT / MET process, the difference in tumor stem cells and which nuclear receptors may be influencing these routes. **Objectives:** To analyze changes in methodology and patterns of biological behavior - time of tumor formation and expansion and maintenance of histological and architectural patterns of the original tumor - in F0 and F1 without PDX model (patient derived xenograft) tumor and adjacent epithelium in Balb C / nude mice and to evaluate the gene expression of retinoid receptors, ALDH1 and EMT / MET process markers by RT-PCR in PDX of oral squamous cell carcinoma compared to a sample of donor patients in F (0) and F (1). **Method:** 24 Balb C / Nude mice, divided into 2 groups TG (I) - patient tumor graft (I) and TG (II) - patient tumor graft (II) subdivided into 4 groups of 3 animals: (A) - received PDX from the center of the tumor; (B) - received epithelial PDX adjacent to the tumor (surgical margin of safety); (C) received PDX from one animal of group (A); (D) received PDX from one animal of group (B). E After these phases, as samples collected for RT-PCR evaluation for comparison of gene expressions between an original sample (CT and EA) with F passages of PDX F (0) and F (1). **Results:** tumor formation in all groups - both the PDX of the tumor center fragment and the PDX of the adjacent epithelium. E The gene expression of the observed parameters did not differ without original tumor and F (0) differential passage in F (1) ($p < 0.05$). **Conclusions:** The PDX technique for CPB is possible to be performed in a shorter time with a tumor fragment implantation. Tumors resulting from PDX presented the solution for new passages, as well as for their use in studies of the biological behavior of neoplastic cells. As for the epithelium adjacent to the tumor (surgical margin of safety), a presence of tumor cells with the potential to promote the growth of tumors has been observed and should therefore be better observed in the resections. The first pass PDX F (0) is the one that most closely resembles the

original tumor being the best for therapeutic tests and studies of oral SCC carcinogenesis.

Keywords: CECP, PDX model, xenograft, surgical margin of safety, retinoid receptors, laser microdissection.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

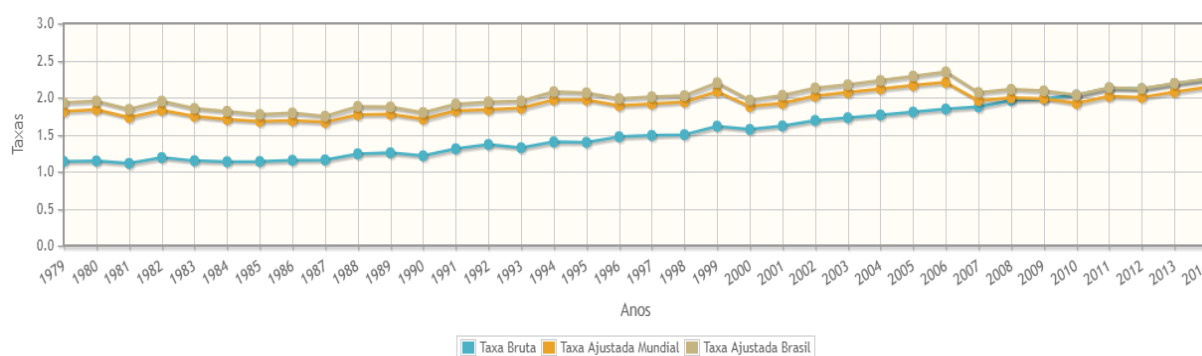
- 9-cis-RA – ácido 9 cis retinóico
- ALDH – aldeído desidrogenase
- ATRA – ácido trans-retinóico
- CEC – carcinoma espinocelular
- CECP – carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
- CTT – células tronco tumorais
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- EMT – Transição epitélio-mesenquima
- EMT-TF – fatores de transcrição da transição epitélio-mesenquima
- HPV – papiloma vírus humano
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- LCM – microdissecção por captura a laser
- MET – Transição mesenquima-epitélio
- NADP – fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
- PCR – reação em cadeia da polimerase
- PDX – Patient-derived tumour xenografts (xenoenxertos tumorais derivados de paciente)
- RA – ácido retinóico
- RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
- RAR – receptor de ácido retinóico
- RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
- RXR – receptores de retinóides X

Resumo.....	6
Abstract.....	8
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	10
Introdução.....	12
Antecedentes e justificativas.....	14
Referências Bibliográficas.....	22
Objetivos.....	32
Artigo Científico 1.....	33
Artigo Científico 2.....	45
Considerações Finais.....	59
Referências Bibliográficas.....	61

INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular é a neoplasia maligna predominante na cavidade oral (OLIVEIRA et al., 2011) e, portanto, o termo "câncer de boca" tende a ser utilizado de forma intercambiável com o carcinoma espinocelular (CEC). As estimativas mundiais para o câncer de boca e faringe em 2017 foram de 49.670 novos casos com uma taxa esperada de mortes de 9.700. Ao longo dos anos a taxa de sobrevivência vem melhorando de 52,7% em 1975 para 67,2% em 2009 (National Cancer Institute – NIH, 2017). Na figura-1 o gráfico mostra as estimativas brasileiras e mundiais (INCA, 2016).

Figura-1. Estimativas de mortalidade no Brasil e no mundo, dados do Instituto Nacional do Câncer, 2016.



**Fontes: MS/SVS/DASIS/CGIAE/Sistema de Informação sobre Mortalidade - SIM
MP/Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE
MS/INCA/Conprev/Divisão de Vigilância**

O conhecimento sobre a biologia deste tumor aumentou significativamente nos últimos 30 anos. Diversos modelos de estudo foram utilizados para mostrarem as alterações genéticas e moleculares nas células neoplásicas e no microambiente para entender o desenvolvimento e manutenção do tumor (CLAY et al., 2010; KRISHNAMURTHY et al., 2010).

Um desses modelos de estudo é o modelo PDX (*Patient-derived tumour xenografts* – xenoenxertos tumorais derivados de paciente) que é o processo de desenvolvimento e manutenção de tecido obtido de um paciente e que é introduzido em um hospedeiro receptor secundário, como ratos ou camundongos imunodeficientes, tipicamente por implantação direta de fragmentos de tumor ou de células (JUNG; SEOL; CHANG, 2017; MACBRIDE; HERMANS, 2016).

O modelo PDX consegue reproduzir um microambiente com o estroma e células tumorais, desta forma um modelo para contribuir com a compreensão dos diferentes processos envolvidos na carcinogênese, como os processos de EMT/MET por sinalização dos receptores

retinóides e avaliar o PDX de epitélio adjacente (margem de segurança) quanto a existência de células tronco tumorais ou possíveis zonas de invasão (KRISANAPRAKORNKIT; IAMAROON, 2012). Contribuindo desta forma para uma melhor avaliação na excisão cirúrgica do tumor quanto as margens na tentativa de melhorar o prognóstico e sobrevida dos pacientes (KALLURI; WEINBERG, 2009; MILSOM; RAK, 2008).

Através destes modelos e dos estudos realizados por nosso grupo de pesquisa com cultura de células o objetivo deste trabalho foi replicar a técnica do PDX e validar para que a compreensão e avanço com testes terapêuticos possam ser realizados e desta forma possibilitar o melhor entendimento do CEC oral e contribuir com a melhora da sobrevida dos pacientes.

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

O carcinoma espinocelular (CEC) é uma neoplasia que acomete o sistema aero digestivo superior, podendo destruir as estruturas e função dos órgãos envolvidos, afetando a voz, fala, paladar, olfato e audição. A prática comum de fumar e/ou consumir álcool, além da má higiene bucal, da má alimentação e da presença do papiloma vírus humano (HPV) podem explicar essa incidência desproporcionalmente maior deste tipo de carcinoma (HILDEBRAND et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2011).

Aproximadamente 50% dos pacientes com CEC apresentam doença avançada no momento do diagnóstico, o que conseqüentemente aumenta a chance de no tratamento cirúrgico a manutenção de uma margem positiva com presença de células tronco tumorais o que aumenta significativamente o risco de recorrência local, resultando em baixa taxa de sobrevida em 5 anos (HIRSHBERG et al., 2008; SAKAMOTO et al., 2012). Desta forma ainda se faz necessário uma melhor compreensão da genética molecular e imunorreguladora destes processos que conduzem à transformação neoplásica, manutenção/progressão da CEC oral (HILDEBRAND et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2011).

Para tanto existem muitos modelos para a investigação, que vão desde sistemas *in vitro* que utilizam a cultura de linhagens celulares de CEC, úteis para o estudo das interações entre as diferentes populações celulares, mas não reproduzindo sua complexidade, como por exemplo a interação estroma - células tumorais. E os modelos *in vivo* que se assemelham em reproduzir os traços característicos do tumor, incluindo os padrões de interações complexas como: resposta imunitária, angiogênese, invasão, metástase, sinais clínicos e anormalidades laboratoriais (DONG et al., 2013; PENG et al., 2013; SANO; MYERS, 2009; SMITH; THOMAS, 2006).

Modelo PDX (*Patient-derived tumour xenografts* – xenoenxertos tumorais derivados de paciente).

Os xenoenxertos são células ou secções de tecido removidas de uma espécie e enxertadas em uma espécie diferente. Desta forma os PDX's são estabelecidos a partir da transferência imediata de tecido de tumor fresco de paciente para camundongos ou ratos imunossuprimidos (ITO et al., 2002; KOPETZ; LEMOS; POWIS, 2012; MCMAHON; ZIJL; GILAD, 2013). Após um período de latência, esses PDX's iniciam uma fase de crescimento logarítmico que em determinado ponto é removido e reimplantado em sucessivas gerações (F0, F1...Fn) de camundongos ou ratos com alta taxa de replicação deste tumor (GIOVANELLA; FOGHT, 1985; HIDALGO et al., 2014).

A principal vantagem do modelo PDX é a heterogeneidade intra-tumoral mantendo as características histológicas e moleculares dos tumores originais nas primeiras passagens (GERLINGER et al., 2012; GUENOT et al., 2006). A segunda característica chave é a capacidade de manter um componente do estroma humano nas primeiras passagens e ao longo das passagens o estroma humano é substituído por estroma de origem murina (5-6 passagens) (CARNERO et al., 2015; GAZDAR; HIRSCH; MINNA, 2017).

Embora existam evidências de que o xenoinxerto humano possa ser parcialmente suportado por estroma murino, existem diferenças importantes no microambiente tumoral e que podem ser críticas para o fenótipo do tumor. Os perfis de expressão de genes do xenoinxerto de passagem precoce e tardia refletem essas mudanças nas características do estroma, mas também fornecem oportunidades únicas de pesquisa para diferenciar comportamentos tumorais e estromais através de matrizes murinas e humanas (BRAYTON; TREUTING; WARD, 2012; MECKLENBURG; TYCHSEN; PAUS, 2005; ROMANO et al., 2012; RUIZ et al., 2013).

O modelo PDX preserva a arquitetura, morfologia celular e características moleculares semelhantes ao tumor do paciente a partir do qual se originou. Além disso, os tumores derivados de pacientes crescem como tumores sólidos e mostram muitas das características histológicas do tumor original (DONG et al., 2013; PENG et al., 2013; SANO; MYERS, 2009; SMITH; THOMAS, 2006; WILSON et al., 2016).

Quanto ao local da implantação o PDX pode ser heterotópico ou ortotópico. Ortotópico quando a implantação do tecido corresponde àquele a partir do qual o tumor foi removido do paciente, permitindo assim estudar o comportamento do tumor em seu "ambiente natural" (ITO et al., 2002; KELLAND, 2004; KHANNA; HUNTER, 2005; KLINGHAMMER; WALTHER; HOFFMANN, 2017). Heterotópico, por outro lado, é qualquer outro local que não o local de origem do tumor, por exemplo a localização subcutânea (TOMAYKO; REYNOLDS, 1989). Embora o segundo seja mais fácil de realizar a partir do ponto de vista técnico, o comportamento de crescimento do tumor implantado pode ter uma característica de benignidade com encapsulamento (SANO; MYERS, 2009; SMITH; THOMAS, 2006; WILSON et al., 2016).

Transição Epitélio-mesenquimal (EMT) e Progressão Tumoral.

O processo de metástase no CEC oral envolve o desprendimento de células tumorais, regulação da motilidade celular (invasão), proliferação e evasão através do sistema linfático ou dos vasos sanguíneos (NOGUTI et al., 2012). Isto ocorre devido à redução da adesão intercelular de células tumorais à medida que progridem para a malignidade devido a subexpressão de E-caderina e superexpressão de proteínas como a vimentina e N-caderina. Esta

transição morfológica é conhecida como transição epitélio-mesenquimal (EMT) e o processo inverso caracterizado pelo aumento da expressão de E-caderina e diminuição dos marcadores mesenquimais, como transição mesenquima-epitelial (MET)(HIRSHBERG et al., 2008; KALLURI; WEINBERG, 2009; KRISANAPRAKORNKIT; IAMAROON, 2012; MILSOM; RAK, 2008; SAKAMOTO et al., 2012).

Estas características foram comprovadas a partir da observação das células tumorais próximas dos vasos sanguíneos que exibiam características de EMT, em contrapartida as células tumorais que se encontravam no lúmen dos vasos apresentavam características de MET. Estas observações sugerem que uma vez as células epiteliais tenham invadido, tanto o tecido conjuntivo quanto vasos sanguíneos e linfáticos, elas retornam ao seu fenótipo epitelial de origem. Além disso, os níveis de RNAm da N-caderina e da Vimentina são mais elevados nas amostras tumorais do que nas amostras de mucosa saudável, sendo que o oposto é observado na expressão gênica de E-caderina, a qual apresenta níveis reduzidos nas amostras tumorais em relação ao tecido normal (SAVAGNER, 2015; SUN et al., 2014).

Considerando os exemplos clássicos de desenvolvimento de câncer multinível, o EMT não pode ser analisado como um único processo linear (DE WEVER; MAREEL, 2003; RIETHMACHER; BRINKMANN; BIRCHMEIER, 1995; SEMB; CHRISTOFORI, 1998; SKRYPEK et al., 2017; TIWARI et al., 2012). Deve ser considerado como uma combinação de vários módulos de resposta celular ocorrendo em uma ordem e com um grau de conclusão controlado por caminhos distintos. Por trás desses módulos, vários fatores de transcrição (EMT-TF) podem fornecer um sinal unificador, mas cada um desses fatores também possui papéis específicos, com resultados diferentes (HO-YEN et al., 2014; HOLLESTELLE et al., 2013).

No CEC, os fenótipos de EMT podem ser desencadeados por várias vias inerentes, transitórias e reversíveis ou irreversíveis. Algumas dessas vias podem induzir apenas um ou mais módulos EMT funcionais, resultando em EMT parcial com fenótipo metaestável refletido pela migração e plasticidade (FRISCH; SCHALLER; CIEPLY, 2013; TIWARI et al., 2012). Além disso, o EMT-TF também controla várias respostas muito relevantes para a progressão do câncer, incluindo o controle da apoptose e as propriedades estaminais celulares. Este repertório funcional vai além do EMT, mas os torna integrantes para entender a dinâmica e o destino das células durante a progressão do CEC (MANI et al., 2009; SCHEEL; WEINBERG, 2012).

Receptores Retinóicos – mecanismos moleculares no crescimento tumoral.

A vitamina A é precursor natural dos retinóides, que são isopenóides insaturados de baixo peso molecular e lipossolúveis, no adulto, eles regulam a reprodução, imunidade e visão, e são necessários para o bom funcionamento da pele, pulmão, medula óssea, fígado e sistema neuronal. Entre os retinóides, o ácido trans-retinóico (*ATRA*) desempenha sua principal função na regulação genômica (GERMAIN et al., 2006a; SMELAND et al., 1994; SOMMER; VYAS, 2012). Os retinóides influenciam principalmente o crescimento celular, a diferenciação e a apoptose, sendo a desregulação da sinalização retinóide um mecanismo à carcinogênese (LAMMER et al., 2010; ROENIGK, 1988).

Em consonância com os seus efeitos biológicos pleiotrópicos, as vias de sinalização retinóide revelaram-se complexas, isto fica evidente pois seu funcionamento é semelhante às moléculas de sinal procariótico, que regulam diretamente a atividade de uma classe de proteínas de ligação ao DNA conhecidas como a superfamília dos receptores nucleares (GERMAIN et al., 2006a; SMELAND et al., 1994; SOMMER; VYAS, 2012).

Esses receptores nucleares são transdutores de sinais executivos, respondendo a uma série de derivados naturais de vitamina A – dos quais os mais importantes são o ácido trans-retinóico (*ATRA*) e o *9-cis-RA*. O controle de sinalização da vitamina A envolve muitos níveis, incluindo: absorção, armazenamento, transporte, ativação, modificação, interação e a quebra em retinol celular e proteínas de ácido retinóico celular (ALTUCCI et al., 2007; DAS et al., 2014; JENKINS et al., 2013; KEDISHVILI, 2013; SUN et al., 2000; ZHANG et al., 1996).

Foram descritos seis receptores retinóides que se dividem em duas classes, os receptores de ácido retinóico (*RAR*)(BENBROOK; LERNHARDT; PFAHL, 1988; BRAND et al., 1988; LIU; GIGUÈRE, 2014; PETKOVICH et al., 1987) e os receptores de retinóides X (*RXR*)(GERMAIN et al., 2006a; KLIEWER et al., 1992a; SUN et al., 2000). Cada subtipo é codificado por um gene específico do qual geralmente podem ser geradas múltiplas isoformas e múltiplos promotores (DURAND et al., 1992; LEHMANN et al., 1991).

Os subtipos e isoformas dos receptores são expressos de forma específica para o desenvolvimento de cada tecido, sugerindo que cada um deles pode ter tarefas específicas na regulação dos processos biológicos específicos de desenvolvimento celular e tecidual. As duas classes de receptores, *RAR* e *RXR* são bastante distintas entre si. Os *RAR*'s se ligam ao *ATRA* e ao *9-cis-RA* enquanto os *RXR*'s se ligam apenas a *9-cis-RA* (KLIEWER et al., 1992a; SHALINSKY et al., 1997).

Os *RAR*'s parecem ser os principais transdutores de sinal da vitamina A. Para converter um sinal retinóide em ativação transcricional de um gene, os *RAR*'s funcionam, no entanto, como heterodímeros com os *RXR*'s. Verificou-se que apenas os heterodímeros *RAR-RXR* se ligam eficazmente às suas sequências de reconhecimento de DNA (BERRODIN et al., 1992; KLIEWER et al., 1992b; SUN et al., 2000; ZHANG et al., 1996).

Estudos knockout de genes *in vivo* em camundongos confirmou o papel essencial do heterodímero *RAR-RXR* para a transdução dos retinóides. A ativação do heterodímero é controlada pelos *RAR*'s, uma vez que o heterodímero *RXR α -RAR α* foi encontrado para responder apenas aos ligandos-*RAR*, mas não aos ligandos-*RXR* (KUROKAWA et al., 1994). Uma vez que os ligandos-*RAR* e os ligandos-*RXR* podem levar a uma maior ativação do heterodímero (MINUCCI et al., 1997).

Deste modo, parece que os *RXR*'s funcionam apenas como potenciadores dos sinais dos retinóides. No entanto, foi demonstrado que o forte domínio observado para *RAR α* sobre *RXR α* (KUROKAWA et al., 1994) não foi observado com *RAR β* (LA VISTA-PICARD et al., 1996). No entanto, existem ligandos-*RXR* de alta afinidade, e o domínio *RAR* pode ter um significado limitado para a transdução normal de retinóides, isto é, o *ATRA* ativa apenas *RAR*'s, enquanto *9-cis-RA* ativaria simultaneamente os componentes *RAR* e *RXR* no heterodímero (BRAAKHUIS et al., 1997; CALIFANO et al., 1996a; LIN et al., 2000).

Simultaneamente à descoberta de que os *RAR*'s exigiam *RXR*'s para a ligação eficiente do DNA e a transativação, também descobriu-se que o *RXR* era um cofator essencial para vários outros receptores nucleares não esteroides, incluindo os receptores de hormônio da tireoide (BERRODIN et al., 1992; KLIEWER et al., 1992b; LEHMANN et al., 1993) e o receptor de vitamina D, onde *RXR*'s parecem funcionar principalmente como parceiros silenciosos em diversos processos na carcinogênese (DI MASI et al., 2015; KLIEWER et al., 1992b; LEHMANN et al., 1993; ZHANG et al., 1996).

No entanto, é evidente que os *RXR*'s têm um papel amplo como co-receptores, permitindo interações cruzadas entre certos retinóides e outros sinais hormonais e vitamínicos. Isto é provável que ocorra não só através do *RXR* contido nos heterodímeros, mas também através da competição quando as moléculas *RXR* estão em oferta limitada (GERMAIN et al., 2006b; MINUCCI et al., 1997). Na presença de concentrações elevadas de ligandos-*RXR*, a competição entre homodímeros *RXR* e heterodímeros também pode ocorrer (LEHMANN et al., 1993). Assim, os receptores retinóides fazem parte de uma rede complexa que permite interações cruzadas entre um grande número de receptores nucleares e seus ligandos (BERRODIN et al., 1992; MOREB et al., 2005).

A desregulação do ciclo celular é um passo essencial no processo de carcinogênese. Alguns reguladores do ciclo celular foram identificados na inibição do crescimento induzida por retinóides em várias neoplasias malignas (CHAKRAVARTI et al., 2001, 2003). Estudos *in vitro* mostraram que os retinóides regulam a expressão das proteínas reguladoras do ciclo celular (LAMMER et al., 2010; SCHLIEPHAKE, 2003).

Alguns estudos observaram a diminuição da expressão dos receptores retinóides *RAR* β e *RXR* α não apenas na maioria dos CEC orais, mas também em lesões potencialmente malignas, sugerindo que alterações na expressão dessas proteínas são eventos iniciais em seu desenvolvimento (CALIFANO et al., 1996b; KAO et al., 2002; MCMAHON; ZIJL; GILAD, 2015). Outros estudos também demonstraram alterações com aumento da expressão dos receptores retinóides em tecidos orais adjacentes aos CEC na região do campo de cancerização (CALIFANO et al., 2000; KAO et al., 2002).

Células tronco tumorais (CTT) e ALDH1 (Aldeído Desidrogenase 1)

As CTT's, também chamados de células iniciadoras tumorais, compreendem uma pequena subpopulação distinta de células tumorais que possuem características de auto renovação, capacidade de diferenciação múltipla, e resistência a drogas (CROKER et al., 2009; HILDEBRAND et al., 2014; KRISHNAMURTHY et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011) (OLIVEIRA et al., 2011; BHAIJEE et al., 2012; REYA et al., 2001; KRISHNAMURTHY & NÖR, 2012; HILDEBRAND et al., 2014).

As implicações das CTT's têm atraído cada vez mais atenção dos pesquisadores, incluindo a detecção precoce e suas implicações no prognóstico em CEC orais. As CTT's podem ser identificadas, principalmente, por meio da evidência da molécula de adesão de superfície CD44 e da enzima aldeído desidrogenase isoforma 1 (ALDH1)(LEONCINI et al., 2014; SU et al., 2010). Estudos têm mostrado, que *Aldh1* corresponde a um marcador de CTT's em diferentes tipos de tumores (HIRSHBERG et al., 2008; HUANG et al., 2014; ISLAM et al., 2015; SU et al., 2010; ZHOU; SUN, 2014), inclusive em CEC, e que a superexpressão desta enzima está associada a piores prognósticos e menor sobrevida para estes pacientes (HILDEBRAND et al., 2014; HIRSHBERG et al., 2008; PIN et al., 2016; SU et al., 2010; ZHOU et al., 2015).

As ALDH's, são definidas como uma superfamília de enzimas dependentes de NADP (+), que participam do metabolismo de aldeídos, catalisando a oxidação de aldeídos exógenos (drogas e etanol) e aldeídos endógenos (lipídios, aminoácidos ou vitaminas) em seus ácidos carboxílicos correspondentes (MARCHITTI et al., 2009). A toxicidade primária dos aldeídos

pode induzir inativação enzimática, dano do DNA, diminuição da homeostase celular e da morte celular, formando adutos com vários alvos celulares, incluindo glutatona, ácidos nucleicos e aminoácidos (BROOKS; THERUVATHU, 2005; CHOI; MYERS, 2008). Deficiência e polimorfismos de ALDH's estão relacionados a diversas doenças e pode até contribuir para a ocorrência de CEC (MATSUO et al., 2001; RIZZO; CARNEY, 2005). Numerosos estudos indicaram que os tumores possuem altos níveis de ALDH (CROKER et al., 2009; SU et al., 2010).

A sinalização do ácido retinóico (*RA*) desempenha papéis significativos em células estaminais embrionárias e células tumorais (CHANDA et al., 2013; QIU et al., 2015). A possível atividade antitumoral da *RA* é devida à ativação de uma série de programações genéticas celulares que modulam a diferenciação celular, apoptose e crescimento, através da via clássica. Por esta via, o retinol (vitamina A) absorvido pelas células é oxidado a retinal pelo retinol aldeído desidrogenase (RALDH) (DRAGNEV; PETTY, 2003). Em seguida, a retinal é oxidada em *RA* em uma reação catalisada por ALDH1A1, ALDH1A2, ALDH1A3 e ALDH8A1. O *RA* metabolizado inclui *ATRA*, *9-cis-RA* e *13-cis-RA*. As isoformas de ALDH, especialmente ALDH1A1, têm alta afinidade com *ATRA* e *9-cis-RA* (GINESTIER et al., 2010). O *RA* pode entrar no núcleo e induzir a atividade transcricional dos efetores através da ativação dos heterodímeros de receptores de *AR* (*RAR- α* , β , γ) e receptores retinóides X (*RXR- α* , β , γ)(CLAY et al., 2010; KRISHNAMURTHY et al., 2010; MINUCCI et al., 1997).

Microdissecção por captura de laser (LCM)

A microdissecção por captura de laser (LCM) é usada para isolar células específicas de regiões microscópicas de tecido, células ou organismos. Várias técnicas de microdissecção de tecidos foram usadas para isolar populações celulares puras. A LCM foi desenvolvida para abordar o problema da heterogeneidade dos tecidos, que é uma mistura de diferentes tipos de células. Liotta et al. (1998) desenvolveram esse sistema principalmente para análise molecular de tumores sólidos. Três diferentes classes de biomoléculas, podem ser investigadas usando espécimes LCM: DNA, RNA e proteínas (DOMAZET et al., 2008; SIMONE et al., 1998).

Uma grande vantagem de usar LCM é para obter células específicas para análise molecular onde o procedimento é realizado observando diretamente as células sob microscopia de luz (MURAKAMI; LIOTTA; STAR, 2000). A LCM é atualmente o único método que é capaz de separar subpopulações celulares de monocamadas de tecido ou população de células sem perturbar o estado molecular de uma célula (FEND; KREMER; QUINTANILLA-MARTINEZ, 2000).

A principal limitação da LCM é a necessidade de identificar células de interesse com base em características morfológicas (ESPINA et al., 2006). Outras limitações do LCM incluem o cuidado com o tecido obtido para preservação das moléculas de interesse e o cuidado com os protocolos de coloração também para preservação do RNA e DNA (MURAKAMI; LIOTTA; STAR, 2000).

As amostras obtidas pela LCM podem ser submetidas a qualquer tipo de análise molecular. O DNA e o RNA são facilmente extraídos e utilizados para reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise da expressão gênica (MAITRA et al., 1999; SIMONE et al., 1998). As análises de DNA e RNA requerem menos material do que análises de proteínas. Portanto, as análises genômicas podem ser realizadas em amostras de uma única célula, enquanto isso pode não ser possível para proteínas. A LCM pode ser aplicada a uma variedade de métodos para descobrir novos genes e analisar eficientemente sua função em células específicas. Outras aplicações são projetadas para identificar perda de heterozigosidade e polimorfismos conformacionais de cadeia simples (SIMONE et al., 1998; XU, 2010).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTUCCI, Lucia et al. RAR and RXR modulation in cancer and metabolic disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, [s. l.], v. 6, n. 10, p. 793–810, 2007.
- BENBROOK, D.; LERNHARDT, E.; PFAHL, M. **A new retinoic acid receptor identified from a hepatocellular carcinoma.** *Nature*, 1988.
- BERRODIN, TJ et al. Heterodimerization among thyroid hormone receptor, retinoic acid receptor, retinoid X receptor, chicken ovalbumin upstream promoter transcription factor, and an endogenous liver protein. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, [s. l.], v. 6, n. 9, p. 1468–78, 1992.
- BRAAKHUIS, B. J. et al. Retinoid metabolism and all-trans retinoic acid-induced growth inhibition in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. **British journal of cancer**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 189–197, 1997.
- BRAND, N. et al. **Identification of a second human retinoic acid receptor.** *Nature*, 1988.
- BRAYTON, C. F.; TREUTING, P. M.; WARD, J. M. Pathobiology of Aging Mice and GEM: Background Strains and Experimental Design. **Veterinary Pathology**, [s. l.], v. 49, n. 1, p. 85–105, 2012.
- BROOKS, Philip J.; THERUVATHU, Jacob A. DNA adducts from acetaldehyde: Implications for alcohol-related carcinogenesis. **Alcohol**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 187–193, 2005.
- CALIFANO, Joseph et al. Advances in Brief Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer : Implications for. **Cancer Research**, [s. l.], v. June 1, n. 56, p. 2488–2493, 1996. a.
- CALIFANO, Joseph et al. Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer : Implications for Field Cancerization Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer : Implications for. **Cancer Research**, [s. l.], v. 56, n. June, p. 2488–2492, 1996. b.
- CALIFANO, Joseph et al. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. 347–352, 2000.
- CARNERO, Amancio et al. Disruptive chemicals, senescence and immortality. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 36, n. iii, p. S19–S37, 2015.

- CHAKRAVARTI, N. et al. Expression of RARalpha and RARbeta in human oral potentially malignant and neoplastic lesions. **International journal of cancer**, [s. l.], v. 91, n. 1, p. 27–31, 2001.
- CHAKRAVARTI, Nitin et al. Retinoic acid receptor-alpha as a prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, [s. l.], v. 103, n. 4, p. 544–549, 2003.
- CHANDA, Bhaskar et al. Retinoic Acid Signaling Is Essential for Embryonic Hematopoietic Stem Cell Development. **Cell**, [s. l.], v. 155, n. 1, p. 215–227, 2013.
- CHOI, S.; MYERS, J. N. Molecular Pathogenesis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Implications for Therapy. **Journal of Dental Research**, [s. l.], v. 87, n. 1, p. 14–32, 2008.
- CLAY, MR et al. Single marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. **Head Neck**, [s. l.], v. 32, n. 9, p. 1195–1201, 2010.
- CONDON, Mark S. The role of the stromal microenvironment in prostate cancer. **Seminars in Cancer Biology**, [s. l.], v. 15, n. 2, p. 132–137, 2005.
- CROKER, Alysha K. et al. High aldehyde dehydrogenase and expression of cancer stem cell markers selects for breast cancer cells with enhanced malignant and metastatic ability. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, [s. l.], v. 13, n. 8 B, p. 2236–2252, 2009.
- DAS, Bhaskar C. et al. Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 22, n. 2, p. 673–683, 2014.
- DE WEVER, Olivier; MAREEL, Marc. Role of tissue stroma in cancer cell invasion. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 200, n. 4, p. 429–447, 2003.
- DI MASI, Alessandra et al. Retinoic acid receptors: From molecular mechanisms to cancer therapy. **Molecular Aspects of Medicine**, [s. l.], v. 41, p. 1–115, 2015.
- DOMAZET, B. et al. Laser capture microdissection in the genomic and proteomic era: targeting the genetic basis of cancer. **International journal of clinical and experimental pathology**, [s. l.], v. 1, n. 6, p. 475–488, 2008.
- DONG, Zhihong et al. Xenograft tumors vascularized with murine blood vessels may overestimate the effect of anti-tumor drugs: a pilot study. **PloS one**, [s. l.], v. 8, n. 12, p. e84236, 2013.

DRAGNEV, Konstantin H.; PETTY, W. Jeffrey. Retinoid Targets in Cancer Therapy and Chemoprevention and its distribution. **Cancer Biology & Therapy**, [s. l.], v. 2, n. August, p. 150–156, 2003.

DURAND, Béatrice et al. All-trans and 9-cis retinoic acid induction of CRABP II transcription is mediated by RAR-RXR heterodimers bound to DR1 and DR2 repeated motifs. **Cell**, [s. l.], v. 71, n. 1, p. 73–85, 1992.

ESPINA, Virginia et al. Laser-capture microdissection. **Nature Protocols**, [s. l.], v. 1, n. 2, p. 586–603, 2006.

FEND, Falko; KREMER, M.; QUINTANILLA-MARTINEZ, L. Laser capture microdissection: Methodical aspects and applications with emphasis on immuno-laser capture microdissection. **Pathobiology**, [s. l.], v. 68, n. 4–5, p. 209–214, 2000.

FRISCH, Steven M.; SCHALLER, Michael; CIEPLY, Benjamin. Mechanisms that link the oncogenic epithelial–mesenchymal transition to suppression of anoikis. **Journal of Cell Science**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 21–29, 2013.

GAZDAR, Adi F.; HIRSCH, Fred R.; MINNA, John D. From mice to men and back - an assessment of preclinical model systems for the study of lung cancers. **J Thorac Oncol.**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 287–299, 2017.

GERLINGER, Marco et al. Intratumor Heterogeneity and Branched Evolution Revealed by Multiregion Sequencing. **N Engl J Med**, [s. l.], v. 366, n. 10, p. 883–892, 2012.

GERMAIN, P. et al. International Union of Pharmacology. LX. Retinoic acid receptors. **Pharmacol Rev**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 712–725, 2006. a.

GERMAIN, Pierre et al. International Union of Pharmacology. LXIII. Retinoid X receptors. **Pharmacological reviews**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 760–772, 2006. b.

GINESTIER, Christophe et al. Retinoid signaling regulates breast cancer stem cell differentiation. **Cell Cycle**, [s. l.], v. 8, n. 20, p. 3297–3302, 2010.

GIOVANELLA, B. C.; FOGHT, J. The Nude Mouse in Cancer Research. **Advances in Cancer Research**, [s. l.], v. 44, p. 69–120, 1985.

GUENOT, Dominique et al. Primary tumour genetic alterations and intra-tumoral heterogeneity are maintained in xenografts of human colon cancers showing chromosome instability. **Journal of Pathology**, [s. l.], v. 208, n. 5, p. 643–652, 2006.

- HIDALGO, Manuel et al. Patient Derived Xenograft Models : An Emerging Platform for Translational Cancer Research. **cancer discovery**, [s. l.], v. 4, n. 9, p. 998–1013, 2014.
- HILDEBRAND, Laura C. et al. Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. **Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, [s. l.], v. 43, n. 7, p. 499–506, 2014.
- HIRSHBERG, Abraham et al. Metastatic tumours to the oral cavity - Pathogenesis and analysis of 673 cases. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 44, n. 8, p. 743–752, 2008.
- HO-YEN, Colan M. et al. C-Met in invasive breast cancer: Is there a relationship with the basal-like subtype? **Cancer**, [s. l.], v. 120, n. 2, p. 163–171, 2014.
- HOLLESTELLE, Antoinette et al. Loss of E-cadherin is not a necessity for epithelial to mesenchymal transition in human breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 138, n. 1, p. 47–57, 2013.
- HUANG, Cong Fa et al. Correlation of ALDH1, CD44, OCT4 and SOX2 in tongue squamous cell carcinoma and their association with disease progression and prognosis. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, [s. l.], v. 43, n. 7, p. 492–498, 2014.
- INCA. Instituto Nacional do Cancer - Estimativa 2016. **Ministério Da Saúde**, [s. l.], p. 51, 2016.
- ISLAM, Farhadul et al. Cancer stem cells in oesophageal squamous cell carcinoma: Identification, prognostic and treatment perspectives. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, [s. l.], v. 96, n. 1, p. 9–19, 2015.
- ITO, Mamoru et al. Nod/scid/mouse: an excellent recipient mouse model engraftment of human cells. **Bone**, [s. l.], v. 100, n. 9, p. 3175–3182, 2002.
- JENKINS, Glenn et al. Genome stability pathways in head and neck cancers. **International journal of genomics**, [s. l.], v. 2013, n. 19, p. 464720, 2013.
- JUNG, Jaeyun; SEOL, Hyang Sook; CHANG, Suhwan. The Generation and Application of Patient Derived Xenograft (PDX) Model for Cancer Research. **Cancer research and treatment : official journal of Korean Cancer Association**, [s. l.], 2017.
- KALLURI, Raghu; WEINBERG, Robert a. Review series The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J of Clin Investigation**, [s. l.], v. 119, n. 6, p. 1420–1428, 2009.

KAO, Shou-Yen et al. The retinoic acid receptor-beta (RAR-beta) mRNA expression in the oral squamous cell carcinoma associated with betel quid use. **Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, [s. l.], v. 31, n. 4, p. 220–6, 2002.

KEDISHVILI, Natalia Y. Enzymology of retinoic acid biosynthesis and degradation. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 54, n. 7, p. 1744–1760, 2013.

KELLAND, L. R. “Of mice and men”: Values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. **European Journal of Cancer**, [s. l.], v. 40, n. 6, p. 827–836, 2004.

KHANNA, Chand; HUNTER, Kent. Modeling metastasis in vivo. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 513–523, 2005.

KIM, Michael et al. Orthotopic and heterotopic generation of murine pancreatic cancer xenografts. **Nat Protoc**, [s. l.], v. 4, n. 11, p. 1670–1680, 2014.

KLIEWER, S. a et al. Retinoid X receptor-COUP-TF interactions modulate retinoic acid signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 89, n. 4, p. 1448–52, 1992. a.

KLIEWER, Steven A. et al. Retinoid X receptor interacts with nuclear receptors in retinoic acid, thyroid hormone and vitamin D3 signalling. **Nature**, [s. l.], v. 355, n. 6359, p. 446–449, 1992. b.

KLINGHAMMER, Konrad; WALTHER, Wolfgang; HOFFMANN, Jens. Choosing wisely – Preclinical test models in the era of precision medicine. **Cancer Treatment Reviews**, [s. l.], v. 55, p. 36–45, 2017.

KOPETZ, S.; LEMOS, R.; POWIS, G. The Promise of Patient-Derived Xenografts: The best laid plans of mice and men. **Clinical Cancer Research**, [s. l.], v. October 1, n. 18(19), p. 5160–5164, 2012.

KRISANAPRAKORNKIT, Suttichai; IAMAROON, Anak. Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma. **ISRN Oncology**, [s. l.], v. 2012, p. 1–10, 2012.

KRISHNAMURTHY, Sudha et al. Endotelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. **Cancer metastasis reviews**, [s. l.], v. 70, n. 23, p. 9969–9978, 2010.

- KUROKAWA, R. et al. Regulation of retinoid signalling by receptor polarity and allosteric control of ligand binding. **Nature**, [s. l.], v. 371, n. October 6, p. 528–531, 1994.
- LA VISTA-PICARD, N. et al. The receptor-DNA complex determines the retinoid response: a mechanism for the diversification of the ligand signal. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 4137–4146, 1996.
- LAMMER, EJ et al. Retinoic acid embryopathy. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 3, n. Oct., p. 2015, 2010.
- LEHMANN, J. M. et al. Identification of retinoids with nuclear receptor subtype- selective activities. **Cancer Res.**, [s. l.], v. 51, n. 32, p. 4804–4809, 1991.
- LEHMANN, J. M. et al. Formation of retinoid X receptor homodimers leads to repression of T3 response: hormonal cross talk by ligand-induced squelching. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 13, n. 12, p. 7698–707, 1993.
- LEONCINI, E. et al. Adult height and head and neck cancer: A pooled analysis within the INHANCE Consortium. **Head and Neck**, [s. l.], v. 36, n. 10, p. 1391, 2014.
- LIN, B. et al. Orphan receptor COUP-TF is required for induction of retinoic acid receptor beta, growth inhibition, and apoptosis by retinoic acid in cancer cells. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 957–70, 2000.
- LIU, Xingxing; GIGUÈRE, Vincent. Inactivation of RAR β inhibits Wnt1-induced mammary tumorigenesis by suppressing epithelial-mesenchymal transitions. **Nuclear receptor signaling**, [s. l.], v. 12, p. e004, 2014.
- MACBRIDE, Megan M.; HERMANS, Els. **Xenograft Host Selection : Important Factors for Experimental Success taconic insights oncology and immuno-oncology**. [s.l: s.n.].
- MAITRA, A et al. Enrichment of epithelial cells for molecular studies. **Nature medicine**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 459–63, 1999.
- MANI, Sendurai a et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell**, [s. l.], v. 133, n. 4, p. 704–715, 2009.
- MARCHITTI, S. A. et al. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. **Drug metabolism toxicology**, [s. l.], v. 4, n. 6, p. 697–720, 2009.

- MATSUO, K. et al. Gene-environment interaction between an aldehyde dehydrogenase-2 (ALDH2) polymorphism and alcohol consumption for the risk of esophageal cancer. **Carcinogenesis**, [s. l.], v. 22, n. 6, p. 913–6, 2001.
- MCMAHON, T.; ZIJL, Peter C. M. Van; GILAD, Assaf A. Endocrine-therapy-Resistant ESR1 variants revealed by genomic characterization of breast-cancer-derived xenografts. **Cell Rep**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 320–331, 2013.
- MCMAHON, T.; ZIJL, Peter C. M. Van; GILAD, Assaf A. Head and neck cancer stem cells: the side population. **Laryngoscope**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 320–331, 2015.
- MECKLENBURG, Lars; TYCHSEN, Birte; PAUS, Ralf. Learning from nudity: Lessons from the nude phenotype. **Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 14, n. 11, p. 797–810, 2005.
- MILSOM, Chloe; RAK, Janusz. Tissue factor and cancer. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, [s. l.], v. 36, n. 3–4, p. 160–176, 2008.
- MINUCCI, S. et al. Retinoid X receptor (RXR) within the RXR-retinoic acid receptor heterodimer binds its ligand and enhances retinoid-dependent gene expression. **Molecular and cellular biology**, [s. l.], v. 17, n. 2, p. 644–655, 1997.
- MOREB, J. S. et al. Retinoic acid down-regulates aldehyde dehydrogenase and increases cytotoxicity of 4-hydroperoxycyclophosphamide and acetaldehyde. **J Pharmacol Exp Ther**, [s. l.], v. 312, n. 1, p. 339–345, 2005.
- MURAKAMI, H.; LIOTTA, L.; STAR, R. A. IF-LCM: Laser capture microdissection of immunofluorescently defined cells for mRNA analysis. **Kidney International**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 1346–1353, 2000.
- NOGUTI, Juliana et al. Metastasis from Oral Cancer: An Overview. **Cancer Genomics & Proteomics**, [s. l.], v. 9, n. 5, p. 329–35, 2012.
- OLIVEIRA, Lucinei R. et al. Cancer stem cell immunophenotypes in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, [s. l.], v. 40, n. 2, p. 135–142, 2011.
- PENG, Shaohua et al. Tumor grafts derived from patients with head and neck squamous carcinoma authentically maintain the molecular and histologic characteristics of human cancers. **Journal of translational medicine**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 198, 2013.
- PETKOVICH, Martin et al. A human retinoic acid receptor which belongs to the family of nuclear receptors. **Nature**, [s. l.], v. 330, n. 6147, p. 444–450, 1987.

PIN, Elisa et al. A pilot study exploring the molecular architecture of the tumor microenvironment in human prostate cancer using laser capture microdissection and reverse phase protein microarray. **Molecular Oncology**, [s. l.], v. 10, n. 10, p. 1234, 2016.

QIU, J. J. et al. Critical role of retinoidrexinoid signaling in mediating transformation and therapeutic response of NUP98-RARG leukemia. **Leukemia**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 1153–1162, 2015.

RIETHMACHER, D.; BRINKMANN, V.; BIRCHMEIER, C. A targeted mutation in the mouse E-cadherin gene results in defective preimplantation development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 92, n. 3, p. 855–9, 1995.

RIZZO, William B.; CARNEY, Gael. Sjögren-Larsson syndrome: Diversity of mutations and polymorphisms in the fatty aldehyde dehydrogenase gene (ALDH3A2). **Human Mutation**, [s. l.], v. 26, n. 1, p. 1–10, 2005.

ROENIGK, Henry H. Liver toxicity of retinoid therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 199–208, 1988.

ROMANO, Rosa et al. From murine to human Nude/SCID: The thymus, T-Cell development and the missing link. **Clinical and Developmental Immunology**, [s. l.], v. 2012, 2012.

RUIZ, Paulina et al. Transplant tolerance: New insights and strategies for long-term allograft acceptance. **Clinical and Developmental Immunology**, [s. l.], v. 2013, 2013.

SAKAMOTO, Koji et al. Overexpression of SIP1 and Downregulation of E-cadherin Predict Delayed Neck Metastasis in Stage I/II Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma After Partial Glossectomy. **Annals of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 612–619, 2012.

SANO, Daisuke; MYERS, Jeffrey N. Xenograft models of head and neck cancers. **Head & neck oncology**, [s. l.], v. 1, p. 32, 2009.

SAVAGNER, Pierre. **Epithelial-mesenchymal transitions: From cell plasticity to concept elasticity**. 1. ed. [s.l.] : Elsevier Inc., 2015. v. 112

SCHEEL, Christina; WEINBERG, Robert A. Cancer stem cells and epithelial-mesenchymal transition: Concepts and molecular links. **Seminars in Cancer Biology**, [s. l.], v. 22, n. 5–6, p. 396–403, 2012.

SCHLIEPHAKE, H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer—A review. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, [s. l.], v. 32, n. 3, p. 233–245, 2003.

SEMB, Henrik; CHRISTOFORI, Gerhard. The Tumor-Suppressor Function of E-Cadherin. **Am J Hum Genet**, [s. l.], v. 63, p. 1588–1593, 1998.

SHALINSKY, David R. et al. A Novel Retinoic Acid Receptor-selective Has Potent Antitumor Carcinoma Xenografts in Nude Mice. **Cancer Research**, [s. l.], v. 57, n. January I, p. 162–168, 1997.

SIMONE, Nicole L. et al. Laser-capture microdissection: Opening the microscopic frontier to molecular analysis. **Trends in Genetics**, [s. l.], v. 14, n. 7, p. 272–276, 1998.

SKRYPEK, Nicolas et al. Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Epigenetic Reprogramming Driving Cellular Plasticity. **Trends in Genetics**, [s. l.], v. xx, 2017.

SMELAND, E. B. et al. All-trans retinoic acid directly inhibits granulocyte colony-stimulating factor-induced proliferation of CD34+ human hematopoietic progenitor cells. **Blood**, [s. l.], v. 84, n. 9, p. 2940–5, 1994.

SMITH, Lee P.; THOMAS, Giovana R. Animal models for the study of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a historical perspective with review of their utility and limitations. Part A. Chemically-induced de novo cancer, syngeneic animal models of HNSCC, animal models of t. **International journal of cancer**. [s. l.], v. 118, n. 9, p. 2111–22, 2006.

SOMMER, Alfred; VYAS, Krishna S. A global clinical view on vitamin A and carotenoids. **American Journal of Clinical Nutrition**, [s. l.], v. 96, n. 5, p. 1204–1206, 2012.

SU, Yun et al. Aldehyde dehydrogenase 1 A1-positive cell population is enriched in tumor-initiating cells and associated with progression of bladder cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, [s. l.], v. 19, n. 2, p. 327–337, 2010.

SUN, S. Y. et al. Dual mechanisms of action of the retinoid CD437: nuclear retinoic acid receptor-mediated suppression of squamous differentiation and receptor-independent induction of apoptosis in UMSCC22B human head and neck squamous cell carcinoma cells. **Molecular pharmacology**, [s. l.], v. 58, n. 3, p. 508–14, 2000.

SUN, Shuyang et al. Targeting the c-Met / FZD8 Signaling Axis Eliminates Patient-Derived Cancer Stem – like Cells in Head and Neck Squamous Carcinomas. **Tumor and Stem Cell Biology**, [s. l.], v. 74, n. 24, p. 7546–7560, 2014.

TIWARI, Neha et al. EMT as the ultimate survival mechanism of cancer cells. **Seminars in Cancer Biology**, [s. l.], v. 22, n. 3, p. 194–207, 2012.

TOMAYKO, Mary M.; REYNOLDS, C.Patrick. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice *. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, [s. l.], n. 24, p. 148–154, 1989.

WILSON, George D. et al. Cancer Stem Cell Signaling during Repopulation in Head and Neck Cancer. **Stem Cells International**, [s. l.], v. 2016, 2016.

XU, Baogang J. Combining laser capture microdissection and proteomics: Methodologies and clinical applications. **Proteomics - Clinical Applications**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 116–123, 2010.

ZHANG, L. et al. Discovery of novel retinoic acid receptor agonists having potent antiproliferative activity in cervical cancer cells. **J. Med. Chem.**, [s. l.], v. 39, n. 14, p. 2659–2663, 1996.

ZHOU, Chengyong; SUN, Baochun. The prognostic role of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in head and neck squamous cell carcinomas: A meta-analysis. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 50, n. 12, p. 1144–1148, 2014.

ZHOU, FEI et al. Aldehyde dehydrogenase 1: A specific cancer stem cell marker for human colorectal carcinoma. **Molecular Medicine Reports**, [s. l.], v. 11, n. 5, p. 3894–3899, 2015.

OBJETIVOS

Geral

Avaliar a expressão gênica dos receptores retinóides, ALDH1 e marcadores do processo de EMT em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço primário e tumores resultantes de PDX de duas diferentes regiões: centro do tumor e epitélio adjacente não neoplásico.

Específicos

- a) Desenvolver tumores primários por meio do xenoenxerto de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço em camundongos Balb C/nude a partir de duas diferentes regiões: centro do tumor e epitélio adjacente não neoplásico.

- b) Correlacionar a expressão de receptores retinóicos RAR e RXR (isoformas α e β) com a expressão de marcadores do processo de EMT e marcador de célula tronco tumoral (ALDH1) nos tumores gerados pelo epitélio adjacente e centro do tumor por meio de PCR em tempo real;

- c) Avaliar a expressão de receptores retinóicos (RAR α , RAR β , RXR α e RXR β) em amostras de tumores gerados do epitélio adjacente e centro do tumor por meio de PCR em tempo real;

- d) Avaliar a expressão de marcadores do processo de EMT (E-caderina, N-caderina e Vimentina) no tumor original e nos tumores gerados pelo epitélio adjacente e centro do tumor por meio da PCR em tempo real;

- e) Avaliar a expressão de ALDH1 no tumor original e nos tumores gerados pelo PDX por meio da PCR em tempo real;

Modelo PDX em camundongos Balb C/Nude para avaliar xenoenxertos de amostras de centro do tumor e epitélio adjacente(margem segurança cirúrgica) quanto ao desenvolvimento de tumores.

Este artigo será submetido ao Journal of Experimental and Clinical Cancer Research – fator de impacto:5.1

Resumo

Background: O carcinoma espinocelular (CEC) representa 7% de todos os novos casos de câncer no mundo, sendo o carcinoma espinocelular o tipo mais frequente. Tanto o comportamento biológico quanto o crescimento dos tumores devem ser melhores entendidos, uma vez que a sobrevida dos pacientes não apresentou melhora nas últimas décadas. Os modelos PDX foram desenvolvidos para estudar a biologia tumoral e principalmente os mecanismos de crescimento e proliferação através da manutenção da arquitetura e microambiente tumoral do tumor original. **Objetivos:** Analisar modificações na metodologia e os padrões de comportamento biológico - tempo de formação e expansão do tumor e a manutenção dos padrões histológicos e de arquitetura do tumor original - em F0 e F1 no modelo PDX (xenoenxerto derivado de paciente) das amostras de centro de tumor e epitélio adjacente em camundongos Balb C/nude. **Método:** 24 camundongos Balb C/Nude, divididos em 2 grupos TG(I) – tumor graft paciente (I) e TG(II) – tumor graft paciente (II), subdivididos em 4 grupos de 3 animais: (A) – receberam PDX do centro do tumor; (B) – receberam PDX de epitélio adjacente ao tumor (margem de segurança cirúrgica); (C) receberam PDX de um animal do grupo (A); (D) receberam PDX de um animal do grupo (B). **Resultados:** formação de tumores em todos os grupos – tanto do PDX de fragmento de centro do tumor quanto do PDX do epitélio adjacente. **Conclusões:** A técnica do PDX para o CEC é possível de ser realizada em menor tempo com a implantação de apenas um fragmento do tumor. Os tumores resultantes do PDX apresentaram tamanho suficiente para novas passagens, bem como para seu uso em estudos de comportamento biológico das células neoplásicas. Quanto ao epitélio adjacente ao tumor (margem de segurança cirúrgica) constatou-se a presença de células tumorais com potencial de promover o crescimento de tumores devendo portanto ser melhor observada nas ressecções. **Keywords:** CECP, modelo PDX, xenoenxerto, margem de segurança cirúrgica.

Introdução

Xenoenxerto de tumor derivado de paciente (PDX), é estabelecido através da implantação do material de tumor de pacientes em animais imunocomprometidos, são modelos pré-clínicos importantes na pesquisa do câncer [1,2]. PDXs derivados de diferentes tumores como câncer de mama, coloretal, pancreático, pulmonar, melanoma, prostático, de células renais, glioblastoma multiforme e câncer de cabeça e pescoço demonstraram assemelhar-se ao tumor original, tanto histológica quanto molecularmente [3,4].

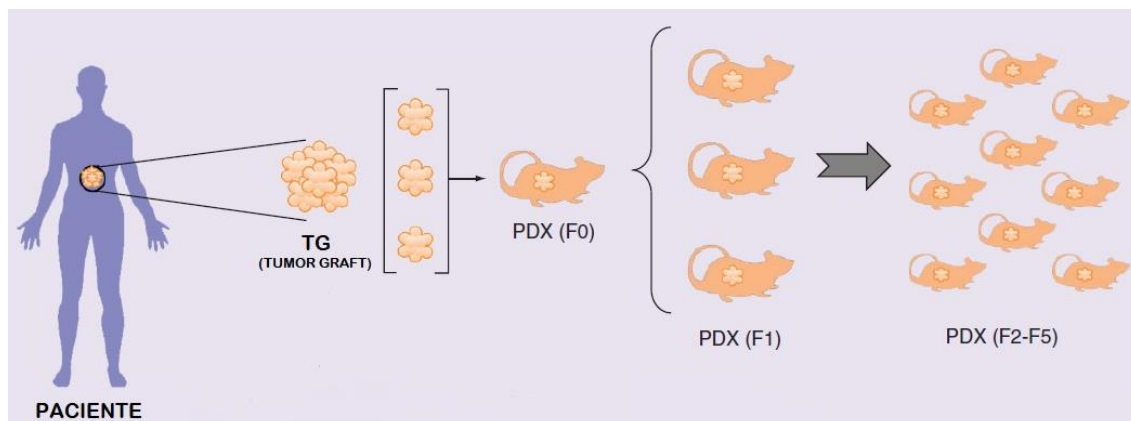
O PDX abrange o processo de desenvolvimento e manutenção de tecido obtido de um paciente que é introduzido em um hospedeiro receptor secundário, como ratos ou camundongos imunodeficientes, tipicamente por implantação direta de fragmentos do tumor ou de seleção de células tumorais [5,6].

A peça cirúrgica do tumor fresco obtido durante a cirurgia de ressecção ou biópsia quer do sítio primário ou lesões metastáticas é muitas vezes doadora de amostras de cerca de 2-8mm - PDX. Após o enxerto do PDX na primeira coorte de camundongos receptores (frequentemente denominada F0), os tumores em crescimento são removidos e rexeitados em série em segunda coorte de animais (F1). Estes procedimentos são repetidos de acordo com o número de passagens que se pretende no estudo (F0-Fn) – Figura-1 [3,7].

O uso de amostras de tumor de pacientes é considerado superior a cultura de células em termos de taxa de enxertia, pois biologicamente, o tecido enxertado mantém em grande parte a heterogeneidade e a arquitetura do tumor original, e podem ser passados para outro grupo de animais, permitindo a manutenção do tecido por várias "gerações" [8].

Através dos novos dados de que os tumores PDX se assemelham mais ao câncer clínico original, seu uso tem aumentado, mas os cuidados com a técnica de implante requer um conjunto de habilidades mais especializado. Os modelos PDX podem sofrer longos períodos de latência após o enxerto e taxas de enxertia variáveis. A latência do enxerto tumoral, medida como o tempo entre a implantação e o desenvolvimento de um tumor de xenoenxerto progressivamente crescente, pode variar de dois a doze meses [9,10].

Figura-1: Esquema para demonstrar o processo de passagens. (adaptado de Sia D, Moeini,A; Labгаа,L; Villanueva,A.The future of patientderived tumor xenografts in cancer treatment. *Pharmacogenomics*. 2015;16(14):1671-83).



As taxas de enxertia tipicamente variam entre 23-75% dependendo do tipo de tumor. Maiores taxas de sucesso de enxertia estão associadas a tumores clinicamente agressivos [11]. De fato, os pacientes cujos cânceres apresentaram maiores taxas de enxerto apresentaram menor sobrevida geral com aumento do potencial metastático. As correlações entre o mau prognóstico e a taxa de enxertia foram tão marcadas que foi sugerido como preditivo do curso da doença [12,13].

Quanto ao local de implantação este pode ser heterotópico e ortotópico. Ortotópico significa a implantação no mesmo local anatômico daquele a partir do qual o tumor primário foi retirado, permitindo assim estudar o comportamento do tumor em seu "ambiente natural" [14]. As vantagens deste modelo são a melhor taxa de enxertia devido ao genótipo e fenótipo semelhantes ao tumor original. A implantação heterotópica é qualquer outro local que não o local anatômico original, por exemplo a localização subcutânea. Como vantagem possui a facilitação da técnica, porém, em grande parte dos casos, o tumor pode apresentar um comportamento não invasivo [5,15,16].

O objetivo deste trabalho foi avaliar o modelo PDX para carcinoma espinocelular de cavidade oral utilizando fragmentos de centro do tumor e epitélio adjacente.

Metodologia

Este estudo foi aprovado número 16/0251 – 2016 pelos Comitês de Ética em Pesquisa e da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Foram utilizados 24 Camundongos BALB/c nude em divididos em dois grupos: TG(I) – PDX paciente(I) e TG(II) – PDX paciente(II), por meio de randomização estratificada por peso. O

manejo das caixas e dos animais foi do tipo “convencional controlado”, empregando materiais e vestimentas submetidos a processo prévio de autoclavagem. A frequência de troca das caixas seguiu a rotina da Unidade de experimentação animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

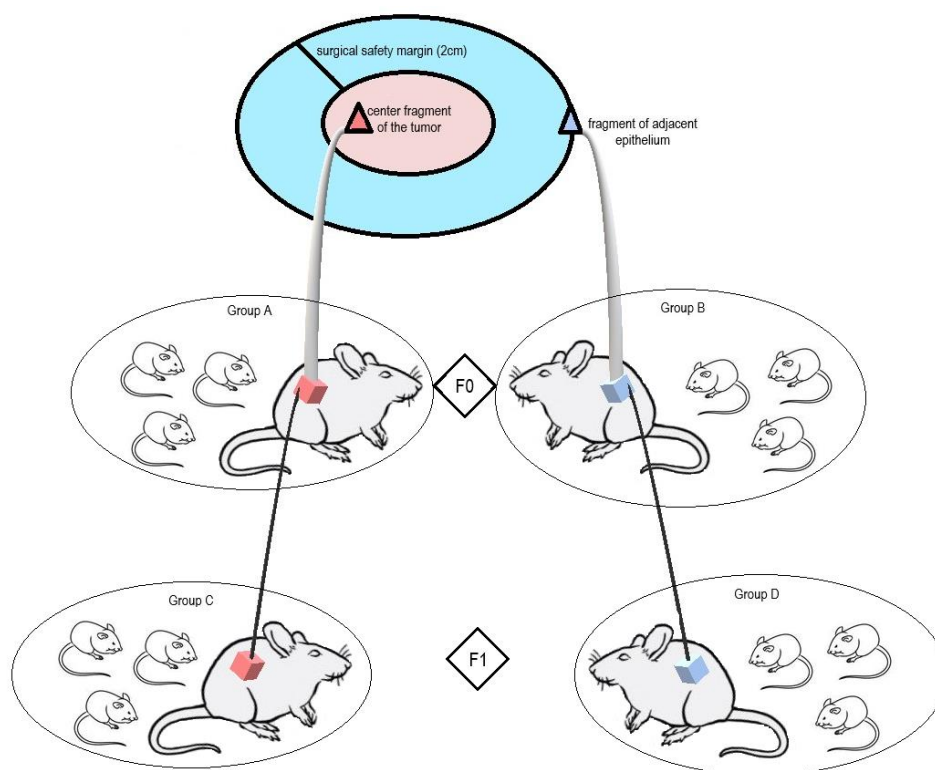
Como critérios de inclusão dos pacientes foi definido que deveriam apresentar CEC primários com planejamento de ressecção cirúrgica como tratamento inicial, sendo equivalentes quanto ao estadiamento clínico, sexo e exposição aos fatores de risco. Ao término da ressecção a peça foi coletada e analisada pelo patologista do HCPA que forneceu as amostras de centro do tumor e epitélio adjacente, sem comprometer o diagnóstico e prognóstico do paciente.

A amostra de centro do tumor foi removida de área não necrótica e não ulcerada com o tamanho determinado pelo patologista plantonista assim como a amostra de epitélio adjacente foi retirado da margem de segurança cirúrgica determinada pelo cirurgião responsável pela ressecção sendo de 2cm definida com critério clínico de área não endurecida.

Cada grupo TG(I) e TG(II) foi dividido em quatro grupos experimentais: A/B que receberam o PDX(F0) – primeira passagem e C/D que receberam o enxerto de um dos animais dos grupos A/B(F1) – segunda passagem (Figura-2). Esta passagem do tumor serviu para análise do padrão histológico e molecular comparando-se com o tumor original [17].

As fases cirúrgicas foram definidas da seguinte maneira: **F(0)** – Foram colhidos o PDX de 2 pacientes com CEC oral (amostra do centro do tumor e epitélio adjacente – Figura 1). As amostras foram colocados em um meio de cultura (L15 culture médium – Life Technology, Breda, The Netherlands) com 100 U/ml de penicilina-gentamicina e transportada em um isopor com gelo para o laboratório de experimentação, onde uma peça de 2x2x2mm foi implantada na área subcutânea do flanco direito de cada animal (Grupos A e B) após incisão de 4mm com bisturi e divulsão de planos teciduais, após o implante da peça a incisão foi suturada com fio de nylon 5-0. O restante de cada peça foi congelado e armazenado para posterior comparação histológica; **(F1)** – após 8 semanas os tumores foram medidos nos animais do Grupo A e B e o de maior tamanho em cada grupo foi removido com o animal em anestesia geral e peças de 2x2x2mm foram implantadas na área subcutânea do flanco direito de uma nova série de animais (Grupos C e D) após incisão de 4mm e divulsão de planos teciduais, após o implante a incisão foi suturada com fio de nylon 5-0.

Figura.2 – Esquema demonstrando as localizações dos fragmentos da peça cirúrgica, os grupos animais e as passagens realizadas.



As fases (F0) e (F1) tiveram duração de 8 semanas e após este período os animais foram eutanasiados por sobre dose anestésica (concentração igual ou superior a 5%), os sinais clínicos condizentes com óbito (ausência de movimento respiratório, ausência de batimentos cardíacos, ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal) foram monitorados por um período adicional de 10 minutos após a parada respiratória. Após a constatação da morte, foi realizada a coleta dos tumores para congelamento e posterior análise histomorfométrica.

Resultados

Na tabela.1 apresentamos a caracterização da amostra perfil sociodemográfico/comportamental e características clínicas e histopatológicas dos tumores dos pacientes (I) e (II) doadores dos PDXs.

Tabela.1 - Perfil sociodemográfico/comportamental e características clínicas e histopatológicas dos tumores dos pacientes (I) e (II) doadores dos PDXs. Os critérios para classificação microscópica dos tumores e epitélio adjacente foram respectivamente Bryne et al. (1992) e WHO (2017) (Bryne et al. 1992; EI-Naggar A.K., Chan J.K.C., Grandis J.R., Takata T. 2017).

	PACIENTE 1	PACIENTE 2
Idade	65 anos	53 anos
Sexo	masculino	masculino
Fumante	sim	sim
Alcool	sim	não (parou a 5 anos)
Localização do tumor	assoalho de boca	assoalho de boca
Tamanho do tumor	T2	T2
Metástase regional	não	não

Os grupos A e C, PDX de centro do tumor apresentaram um padrão de crescimento aritmético ao longo das 8 semanas (Tabela.2). Macroscopicamente encapsulado, com coloração branco-acastanhado, ao corte longitudinal sem presença de cavidades ou conteúdo líquido. Os grupos B e D, com PDX do epitélio adjacente apresentaram um padrão de crescimento geométrico inicial nas primeiras duas semanas e depois um padrão aritmético de crescimento (Tabela.2). Macroscopicamente encapsulado, com coloração castanho-avermelhado, ao corte longitudinal presença de cavidade com líquido de coloração citrina.(Figura.3)

Tabela.2: medidas em milímetros do tamanho do peça removida após passagem F(0) e F(1) dos PDX de CT e EA dos pacientes (I) e (II). (⊖ - PDX perdido em cada grupo).

	Passagem F(0)		Pasagem F(1)	
	CT	EA	CT	EA
Paciente(I)	6,3	13,7	5,9	11,3
	7,0	15,1	5,4	⊖
	⊖	⊖	⊖	10,9
Paciente(II)	7,7	12,3	5,8	11,2
	8,1	⊖	6,9	⊖
	⊖	11,8	⊖	10,8

Figura.4: Macroscopia do PDX: (A) CT - F(0) e F(1); (B) EA F(0) e F(1).

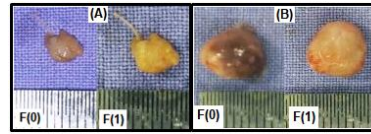
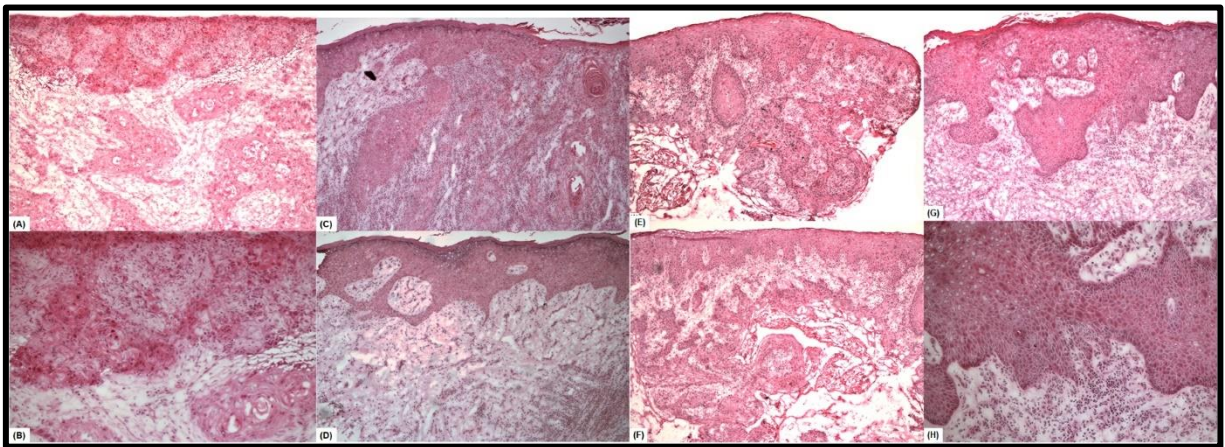


Figura.5: Fotomicrografia: (A) tumor original/CT – paciente (I), aumento 10x e (B) aumento 20x; (C) epitélio adjacente original/EA – paciente (I), aumento 10x e (D) aumento 20x; (E) tumor original/CT – paciente (II), aumento 10x e (F) aumento 20x; (G) epitélio adjacente original/EA – paciente (II), aumento 10x e (H) aumento 20x.



O corte histológico da amostra do centro do tumor da paciente (I) e (II) apresentaram-se de forma clássica com presença de ilhas e cordões de células epiteliais neoplásicas, disceratose, pleomorfismo celular e nuclear, hiper cromatismo e inúmeras figuras de mitose (Figura.5). Já nas amostras de epitélio adjacente do paciente (I) e (II) o epitélio apresentou uma variação de displasia com apagamento da camada basal, disceratose, hiper cromatismo e figuras de mitose na camada intermediária do epitélio e em algumas áreas ilhas de células epiteliais neoplásicas.(Figura.5)

Microscopicamente as amostras de centro do tumor (grupos A e C) apresentaram um padrão sólido com presença de pequenas cavidades com células epiteliais descamadas, manutenção de estroma do tumor original e características de benignidade sem infiltração – presença de ilhas e cordões de células epiteliais neoplásicas, com pleomorfismo, hiper cromatismo, disceratose, várias figuras de mitose e em alguns cortes pérolas de ceratina (Figura.6 e 7).

Nos fragmentos de epitélio adjacente (grupos B e D) microscopicamente apresentou formato cístico com acúmulo de líquido com células epiteliais descamadas. Presença de uma

cápsula de tecido conjuntivo e justaposto a um tecido epitelial neoplásico e estroma do tecido original – ilhas e cordões de células epiteliais neoplásicas com pleomorfismo, hiperchromatismo, disceratose e várias figuras de (Figura.6 e 7).

Figura.6: Fotomicrografia: (A) PDX/CT – paciente(I)/F(0), aumento 10x e (B) aumento 20x; (C) PDX/CT – paciente(I)/F(1), aumento 10x e (D) aumento 20x; (E) PDX/EA – paciente(I)/F(0), aumento 10x e (F) aumento 20x; (G) PDX/EA – paciente(I)/F(1), aumento 10x e (G) aumento 20x.

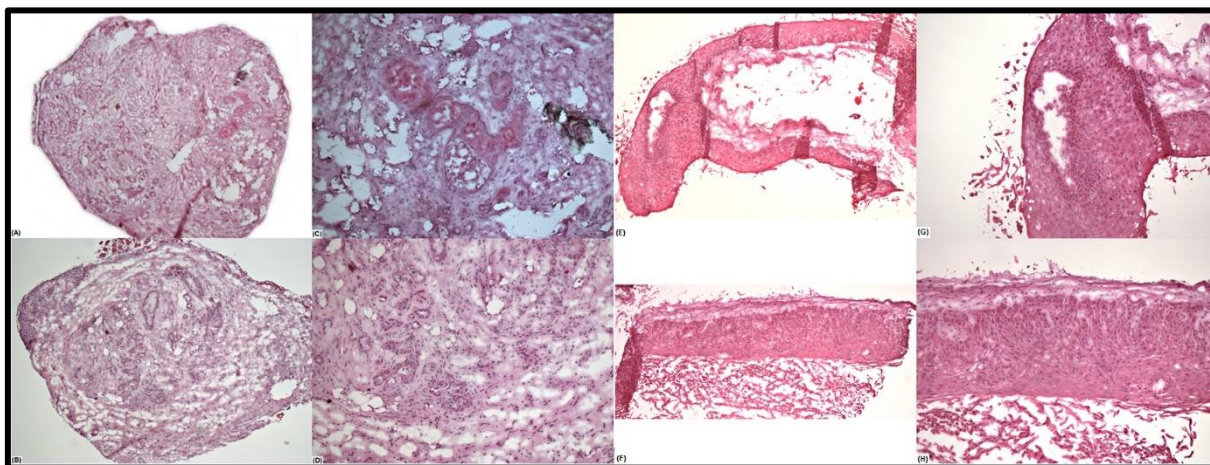
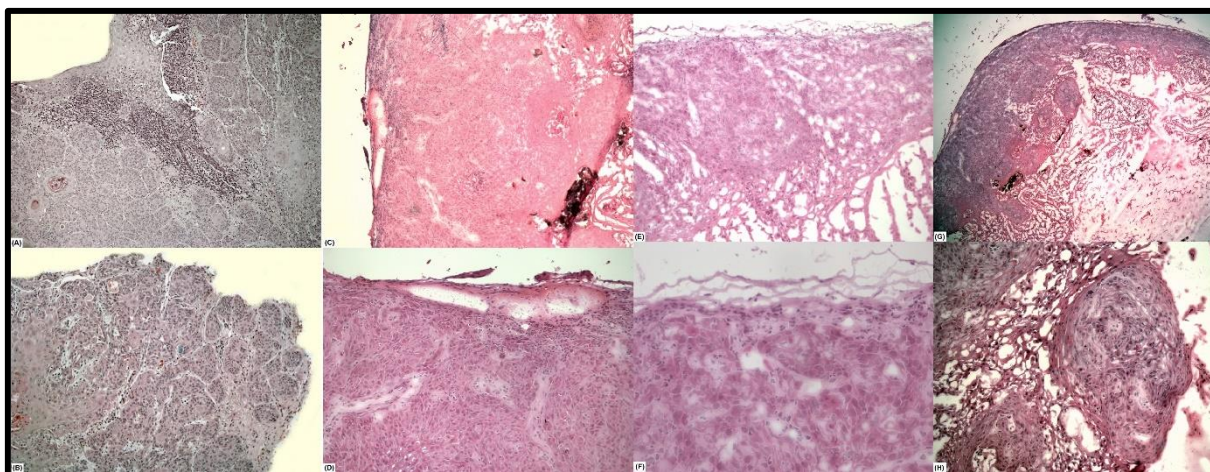


Figura.7: Fotomicrografia: (A) PDX/CT – paciente(II)/F(0), aumento 10x e (B) aumento 20x; (C) PDX/CT – paciente(II)/F(1), aumento 10x e (D) aumento 20x; (E) PDX/EA – paciente(I)/F(0), aumento 10x e (F) aumento 20x; (G) PDX/EA – paciente(I)/F(1), aumento 10x e (H) aumento 20x.



Discussão

De acordo com [18] tem-se que geralmente são enxertados de 2 a 3 fragmentos de 2mm em cada sítio, no experimento descrito foi enxertado apenas 1 fragmento – nas primeiras 8 semanas foi realizado o monitoramento com manipulação mínima dos animais – os fragmentos da região do centro do tumor cresceram em média 3,5 vezes o tamanho do tumor original enquanto que os fragmentos de epitélio adjacente cresceram 7 vezes mais. Após a primeira passagem a taxa de crescimento desacelerou em 20%.

Quanto aos padrões de crescimento tem-se que no enxerto de fragmento de centro do tumor este apresentou um padrão mais sólido com muito estroma e ilhas de células epiteliais neoplásicas espassadas e áreas de microformações císticas. Já no enxerto de epitélio adjacente este apresentou um padrão cístico, com uma proliferação de células neoplásicas mais densa e reduzida quantidade de estroma (Figuras 6 e 7).

Os dois enxertos tanto o de centro do tumor quanto de epitélio adjacente apresentaram um cápsula devido a implantação heterotópica, tendendo a assumir um comportamento benigno de crescimento de acordo com outros achados da literatura[12,19,20].

Arvai et. al ao examinar as zonas de transição morfogenéticas (epitélio adjacente não neoplásico) em um grande número de tumores primários (adenocarcinoma de cólon), descobriu uma zona de transição localizada em tecido considerado normal (não neoplásico) com áreas multifocais de células tronco tumorais quiescentes/proliferativas. Esta zona de transição, encontrada no epitélio adjacente a áreas tumorais, contrasta com o centro do tumor onde a proliferação é mais uniforme[21,22].

Portanto é possível que estas zonas de transição sejam um fenômeno geral do estágio pré-invasivo de carcinogênese, onde a transição proliferativa-quiescente altamente regulada sugere que esta zona pode funcionar como um estágio que precede o surgimento de subclones (células tronco tumorais) invasivos mais discretos que ficam escondidos no epitélio adjacente não neoplásico[23,24].

O epitélio adjacente a área neoplásica clinicamente apresentou-se dentro dos parâmetros de normalidade, mas microscopicamente já havia a presença de ilhas de células epiteliais neoplásicas no tecido conjuntivo adjacente da margem de segurança cirúrgica sugerindo assim a importância do exame histopatológico transoperatório por congelação nos casos de carcinoma espinocelular nos dois casos [25–27].

O CEC surge como resultado de múltiplos eventos moleculares que se desenvolvem a partir das influências combinadas da predisposição genética de um indivíduo e exposição a

carcinógenos ambientais [28]. A exposição crônica a agentes cancerígenos, como tabaco, álcool, vírus oncogênicos e inflamação, pode danificar genes individuais, bem como porções maiores do material genético, incluindo cromossomos [28,29].

Conclusão

De acordo com os achados das adaptações na técnica observou-se que foi possível expandir tumores a partir dos PDX's com tempo de 8 semanas apresentando tumores com tamanho suficiente para novas passagens e também com possibilidade de testes terapêuticos. Quanto ao epitélio adjacente ao tumor (margem de segurança cirúrgica) constatou-se a presença de células tumorais com potencial de promover o crescimento de tumores devendo portanto ser melhor observada nas ressecções.

Referências

1. Braakhuis BJ, Laarman DA, Nauta JJ, van Walsum M, van Dongen GA, Snow GB. Transplantability of human head and neck squamous cell carcinomas in athymic nude mice. Arch. Otolaryngol. Head. Neck Surg. 1989;115:1076–8.
2. Hidalgo M, Amant F, Biankin A V, Budinská E, Byrne AT, Caldas C, et al. Patient Derived Xenograft Models : An Emerging Platform for Translational Cancer Research. cancer Discov. 2014;4:998–1013.
3. Adeegbe DO, Liu Y. Patient-Derived Xenografts in Oncology. Cancer Drug Discov. Dev. [Internet]. 2017;13–41.
4. Malaney P, Nicosia S V., Davé V. One mouse, one patient paradigm: New avatars of personalized cancer therapy. Cancer Lett. [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2014;344:1–12.
5. Jung J, Seol HS, Chang S. The Generation and Application of Patient Derived Xenograft (PDX) Model for Cancer Research. Cancer Res. Treat. [Internet]. 2017;
6. MacBride MM, Hermans E. Xenograft Host Selection : Important Factors for Experimental Success. TACONIC INSIGHTS Oncol. IMMUNO-ONCOLOGY. 2016.
7. Pearson AT, Finkel KA, Warner KA, Nör F, Tice D, Martins MD, et al. Patient-derived xenograft (PDX) tumors increase growth rate with time. Oncotarget. 2016;7:7993–8005.
8. Rosfjord E, Lucas J, Li G, Gerber HP. Advances in patient-derived tumor xenografts: From target identification to predicting clinical response rates in oncology. Biochem. Pharmacol. [Internet]. Elsevier Inc.; 2014;91:135–43.

9. Bult CJ, Krupke DM, Begley DA, Richardson JE, Neuhauser SB, Sundberg JP, et al. Mouse Tumor Biology (MTB): a database of mouse models for human cancer. *Nucleic Acids Res.* 2014;43:818–24.
10. Giovanella BC, Foght J. The Nude Mouse in Cancer Research. *Adv. Cancer Res.* 1985;44:69–120.
11. Kyriakides PW, Inghirami G. Are we ready to take full advantage of patient-derived tumor xenograft models? *Hematol. Oncol.* [Internet]. 2017;1–4.
12. Sano D, Myers JN. Xenograft models of head and neck cancers. *Head Neck Oncol.* [Internet]. 2009 [cited 2014 Nov 14];1:32.
13. Smith LP, Thomas GR. Animal models for the study of squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a historical perspective with review of their utility and limitations. Part A. Chemically-induced de novo cancer, syngeneic animal models of HNSCC, animal models of t. *Int. J. Cancer* [Internet]. 2006 [cited 2014 Nov 14];118:2111–22.
14. Tomayko MM, Reynolds CP. Determination of subcutaneous tumor size in athymic (nude) mice *. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1989;148–54.
15. Sun S, Zhang Z. Patient-derived xenograft platform of OSCC: a renewable human bio-bank for preclinical cancer research and a new co-clinical model for treatment optimization. *Front. Med.* 2016;10:104–10.
16. Méry B, Rancoule C, Guy JB, Espenel S, Wozny AS, Battiston-Montagne P, et al. Preclinical models in HNSCC: A comprehensive review. *Oral Oncol.* Elsevier Ltd; 2017;65:51–6.
17. Peng S, Creighton CJ, Zhang Y, Sen B, Mazumdar T, Myers JN, et al. Tumor grafts derived from patients with head and neck squamous carcinoma authentically maintain the molecular and histologic characteristics of human cancers. *J. Transl. Med.* [Internet]. *Journal of Translational Medicine*; 2013 [cited 2014 Nov 14];11:198.
18. Supsavhad W, Dirksen WP, Martin CK, Rosol TJ. Animal models of head and neck squamous cell carcinoma. *Vet. J.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2016;210:7–16.
19. Aubry K, Paraf F, Monteil J, Bessede JP, Rigaud M. Characterization of a new rat model of head and neck squamous cell carcinoma. *In Vivo* [Internet]. 2008;22:403–8.
20. Spiotto MT, Pytynia M, Liu G-FF, Ranck MC, Widau R. Animal Models to Study the

Mutational Landscape for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers. *J. Oral Maxillofac. Res.* [Internet]. 2013;4:1–14.

21. Arvai KJ, Hsu YH, Lee LA, Jones D. A transition zone showing highly discontinuous or alternating levels of stem cell and proliferation markers characterizes the development of PTEN-haploinsufficient colorectal cancer. *PLoS One.* 2015;10:1–15.

22. Hildebrand LC, Carvalho AL, Lauxen IS, Nör JE, Cerski CTS, Sant’Ana Filho M. Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.* [Internet]. 2014 [cited 2014 Oct 24];43:499–506.

23. Simple M, Suresh A, Das D, Kuriakose MA. Cancer stem cells and field cancerization of Oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;51:643–51.

24. Jimenez L, Jayakar SK, Ow TJ, Segall JE. Mechanisms of invasion in head and neck cancer. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 2015;139:1334–48.

25. Miyota S, Kobayashi T, Abé T, Miyajima H, Nagata M, Hoshina H, et al. Intraoperative assessment of surgical margins of oral squamous cell carcinoma using frozen sections: A practical clinicopathological management for recurrences. *Biomed Res. Int.* Hindawi Publishing Corporation; 2014;2014.

26. El-Fol HA, Noman SA, Beheiri MG, Khalil AM, Kamel MM. Significance of post-resection tissue shrinkage on surgical margins of oral squamous cell carcinoma. *J. Cranio-Maxillofacial Surg.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;43:475–82.

27. Anderson CR, Sisson K, Moncrieff M. A meta-analysis of margin size and local recurrence in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* [Internet]. Elsevier Ltd; 2015;51:464–9.

28. Califano J, Riet P Van Der, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Advances in Brief Genetic Progression Model for Head and Neck Cancer : Implications for. *Cancer Res.* 1996;June 1:2488–93.

29. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat. Rev. Cancer* [Internet]. Nature Publishing Group; 2011;11:9–22.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Avaliação da expressão gênica dos receptores retinóides, ALDH1 e do processo de EMT - modelo PDX em camundongos Balb C/Nude de CEC oral – pelas técnicas de RT-PCR e microdissecção a laser.

(Este artigo será submetido a revista: Journal of cancer research and clinical oncology – fator de impacto: 3,5)

Resumo

Background: Os retinóides possuem a capacidade de restaurar o crescimento e a diferenciação de células normais através da ação dos receptores retinóides nucleares (RARs e RXRs) que são os principais mediadores destas ações que ao sofrerem alterações na sua expressão podem levar ao desenvolvimento e manutenção de tumores. No estudo da carcinogênese o modelo PDX é uma importante ferramenta pois mantém a arquitetura e microambiente do tumor original melhorando a compreensão de algumas vias, entre estas o processo de EMT/MET, na diferenciação das células tronco tumorais e quais receptores nucleares podem estar influenciando nestas vias. **Objetivos:** avaliar a expressão gênica dos receptores retinóides, ALDH1 e marcadores do processo de EMT/MET por RT-PCR em PDX de carcinoma espinocelular oral em comparação com a amostra dos pacientes doadores nas passagens F(0) e F(1). **Método:** 24 camundongos Balb C/Nude, divididos em 2 grupos TG(I) – tumor graft paciente (I) e TG(II) – tumor graft paciente (II), subdivididos em 4 grupos de 3 animais: (A) – receberam PDX do centro do tumor; (B) – receberam PDX de epitélio adjacente ao tumor (margem de segurança cirúrgica); (C) receberam PDX de um animal do grupo (A); (D) receberam PDX de um animal do grupo (B). Após estas fases, as amostras coletadas serão avaliadas por RT-PCR para comparação das expressões gênicas entre a amostra original (CT e EA) com os PDX's nas passagens F(0) e F(1). **Resultados:** A expressão gênica dos parâmetros observados não diferem no tumor original e passagem F(0) significativamente diferentes em F(1) ($p < 0,05$). **Conclusões:** O PDX de primeira passagem F(0) é o que mais se assemelha com o tumor original sendo o melhor para testes terapêuticos e estudos da carcinogênese do CEC oral. **Keywords:** CECP, modelo PDX, receptores retinóides, microdissecção a laser.

Introdução

Estudos epidemiológicos sugerem há muito tempo uma correlação inversa entre o desenvolvimento do câncer e o consumo dietético de vitamina A ou betacaroteno. Wolbach e Howe (1925) observaram uma semelhança histológica entre o epitélio de órgãos deficientes em vitamina A e o tecido tumoral (Wolbach and Howe 1925; Das et al. 2014). Sabe-se que os retinóides desempenham um papel importante na manutenção do tecido epitelial e que a deficiência de vitamina A induz a transformação do epitélio colunar simples em uma forma pseudo-estratificada, depois em epitélio escamoso estratificado e, finalmente, em epitélio escamoso estratificado ceratinizado (Wolbach and Howe 1925; Zou et al. 1999).

O termo retinóides, geralmente se refere a todo o conjunto de compostos, incluindo metabólitos e análogos naturais e sintéticos de vitamina A (retinol). Os retinóides são reguladores fisiológicos de um grande número de processos biológicos essenciais, incluindo desenvolvimento embrionário, visão, reprodução, formação óssea, metabolismo, hematopoiese, diferenciação, proliferação e apoptose. Uma forte relação entre a vitamina A e o desenvolvimento do câncer foi estabelecida por inúmeras investigações nas últimas décadas (Reichlin 1969; Lotan 1997).

Existem duas classes de receptores retinóides intracelulares, RARs e RXRs, cada tipo de receptor retinóide nuclear inclui três subtipos: α , β e γ . Os isotipos de RARs diferentes mostraram desempenhar um papel crucial na diferenciação celular e proliferação (Sun and Lotan 2002; Lei and De Thé 2003). Especificamente, RAR β ativado por RA tem um efeito inibitório na proliferação celular através da indução de proteínas reguladoras de células, p21 e p27 na carcinogênese (Lotan 1994; Shalinsky et al. 1995). Nas células de leucemia, o crescimento e a diferenciação são modulados pela ativação de RARs e a apoptose é modulada por ativação de RXRs. A investigação é necessária para avaliar os papéis dos receptores retinóides como moduladores desses processos em tumores sólidos (Zhang et al. 1996; Ralhan et al. 2006).

Liu et. al observou que a ausência de sinalização retinóide dependente de RAR β tem sido associada ao desenvolvimento de carcinomas de mama provocando um atraso na carcinogênese (Das et al. 2014; Liu and Giguère 2014). A ausência de RAR β levou a uma remodelação do estroma durante a progressão tumoral, marcada por: diminuição da angiogênese, no recrutamento de células inflamatórias e no número de miofibroblastos e supressão da transição epitélio-mesenquimal (EMT) (Olasz et al. 2007; Liu and Giguère 2014).

A microdissecção por captura de laser (LCM) é a técnica que melhor isola células e/ou conjunto de células de regiões microscópicas sem provocar distorção em seu estado molecular. Liotta et al. (1996) desenvolveu esse sistema para análise molecular de DNA, RNA e proteínas de tumores sólidos. (DOMAZET et al., 2008; FEND F, KREMER M, QUINTANILLA-MARTINEZ L. 2000). Onde DNA e/ou RNA são facilmente extraídos e utilizados para reação em cadeia da polimerase (PCR) e análise da expressão gênica (MAITRA et al., 1999; EMMERT-BUCK et al., 1996; SIMONE et al., 1998, XU BJ. 2010).

Portanto o entendimento do comportamento dos receptores de retinóides tanto no tecido tumoral quanto no epitélio adjacente ao tumor torna-se importante para compreensão do processo de EMT/MET e da presença de células tronco tumorais.

Metodologia

Este estudo foi aprovado (16/0251 – 2016) pelos Comitês de Ética em Pesquisa e da Unidade de Experimentação Animal do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

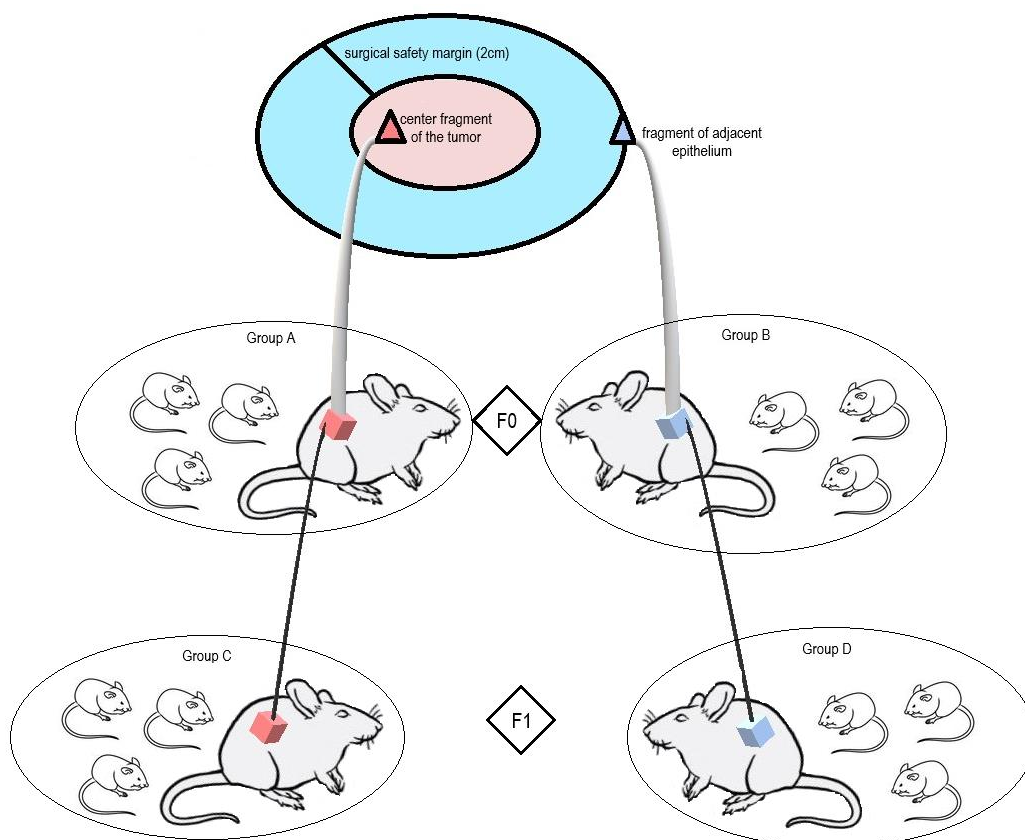
Foram selecionados dois pacientes com diagnóstico de CEC primário, com plano de tratamento cirúrgico para a ressecção do tumor como tratamento inicial. Ambos pacientes apresentavam lesões equivalentes quanto ao estadiamento clínico, ambos do sexo masculino e exposição aos fatores de risco (tabagismo e consumo de bebidas alcoólicas). Ao término da ressecção a peça foi coletada e analisada pelo patologista do HCPA que forneceu os fragmentos de centro do tumor e epitélio adjacente, sem comprometer o diagnóstico e prognóstico do paciente.

A amostra de centro do tumor foi removida de área não necrótica e não ulcerada, o tamanho da amostra foi determinado pelo patologista plantonista assim como a amostra de epitélio adjacente igualmente foi retirado da margem de segurança cirúrgica determinada pelo cirurgião responsável pela ressecção sendo de 2cm definida com critério clínico de área não endurecida.

Para o desenvolvimento dos PDX foram utilizados 24 Camundongos BALB/c nude, dividido em dois grupos: TG(I) – paciente (I) e TG(II) – paciente (II) e subdivididos em 4 grupos, por meio de randomização estratificada por peso. Todo o manejo das caixas e dos animais foi do tipo “convencional controlado”, empregando materiais e vestimentas submetidos a processo prévio de esterilização. A frequência de troca das caixas seguiu a rotina da Unidade de experimentação animal (UEA) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Foram criados quatro grupos experimentais: A/B que receberam enxerto coletado direto do paciente (F0) e C/D que receberam o enxerto de um dos animais dos grupos A/B (F1) – Figura.1.

Figura.1 – Esquema demonstrando as localizações dos fragmentos da peça cirúrgica, os grupos animais e as passagens realizadas.



As fases (F0) e (F1) tiveram duração de 8 semanas e após este período os animais foram eutanasiados por sobre dose anestésica (concentração igual ou superior a 5%), os sinais clínicos condizentes com óbito (ausência de movimento respiratório, ausência de batimentos cardíacos, ausência de pulsação, mucosas pálidas e perda do reflexo corneal) foram monitorados por um período adicional de 10 minutos após a parada respiratória.

Microdissecção a laser. Em um criostato foram realizados cortes de 22 micrometros de cada amostra os quais foram transferidos para uma lâmina PALM® Membrane Slides (Zeiss®, DEU) previamente esterilizada e brevemente aquecida, deixando-os secar a -20°C durante 2-3 minutos. A cada troca de amostra foi realizada a limpeza do criostato e a troca da navalha e de todos instrumentais. Foi realizada a incubação da lâmina em etanol 70%, durante 2-3 minutos, coloração com acetato de cresil violeta 1% (Sigma-Aldrich®, EUA) por 20 segundos, banhos

em etanol 70% e absoluto respectivamente. Foi realizada a incubação de cada lâmina em etanol absoluto até o procedimento de microdissecção.

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

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

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

Análise Estatística. As análises de expressão gênica e sua relação com as variáveis de estudo, foram comparados pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis, através do software SPSS versão 21 (IBM Corporation, EUA).

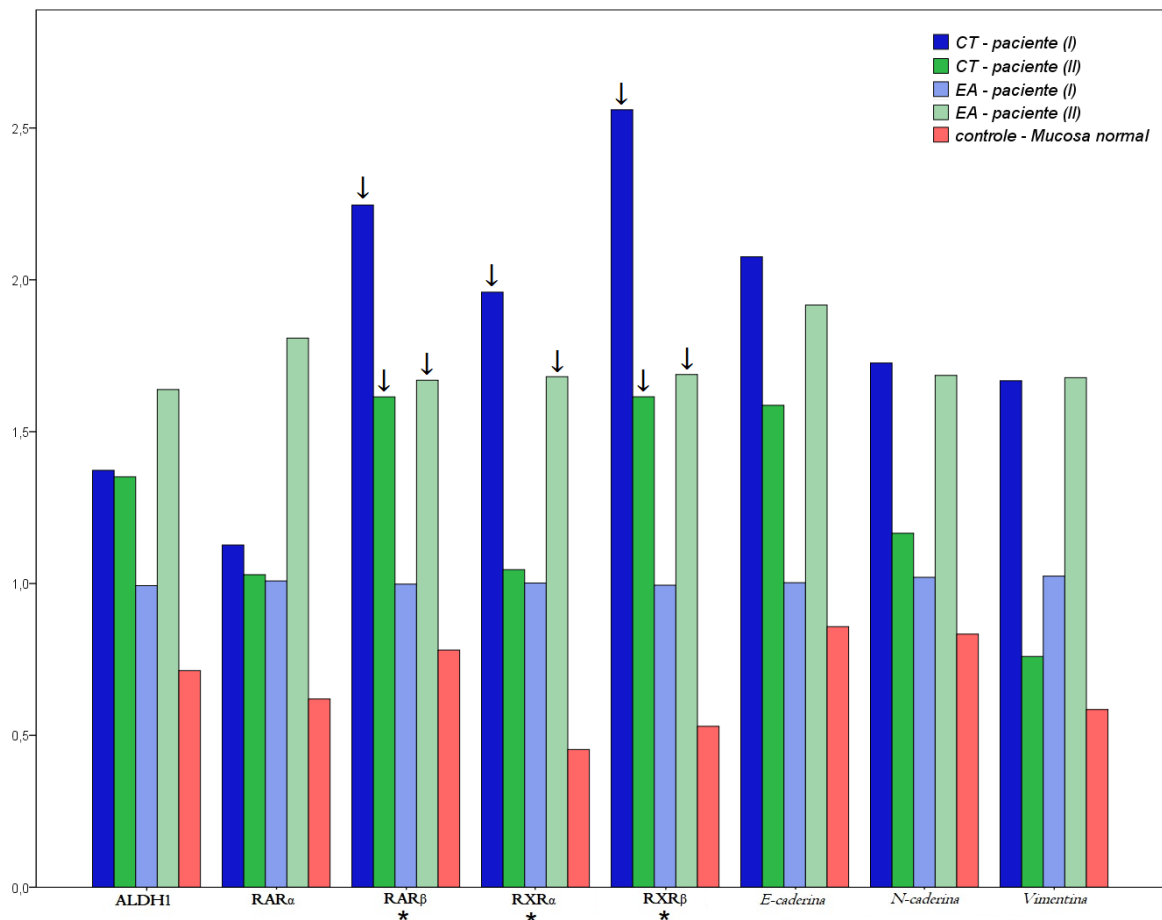
Resultados

Na tabela.1 apresentamos a caracterização da amostra perfil sociodemográfico/comportamental e características clínicas e histopatológicas dos tumores dos pacientes (I) e (II) doadores dos PDXs.

Tabela.1 - Perfil sociodemográfico/comportamental e características clínicas e histopatológicas dos tumores dos pacientes (I) e (II) doadores dos PDXs. Os critérios para classificação microscópica dos tumores e epitélio adjacente foram respectivamente Bryne et al. (1992) e WHO (2017) (Bryne et al. 1992; EI-Naggar A.K., Chan J.K.C., Grandis J.R., Takata T. 2017).

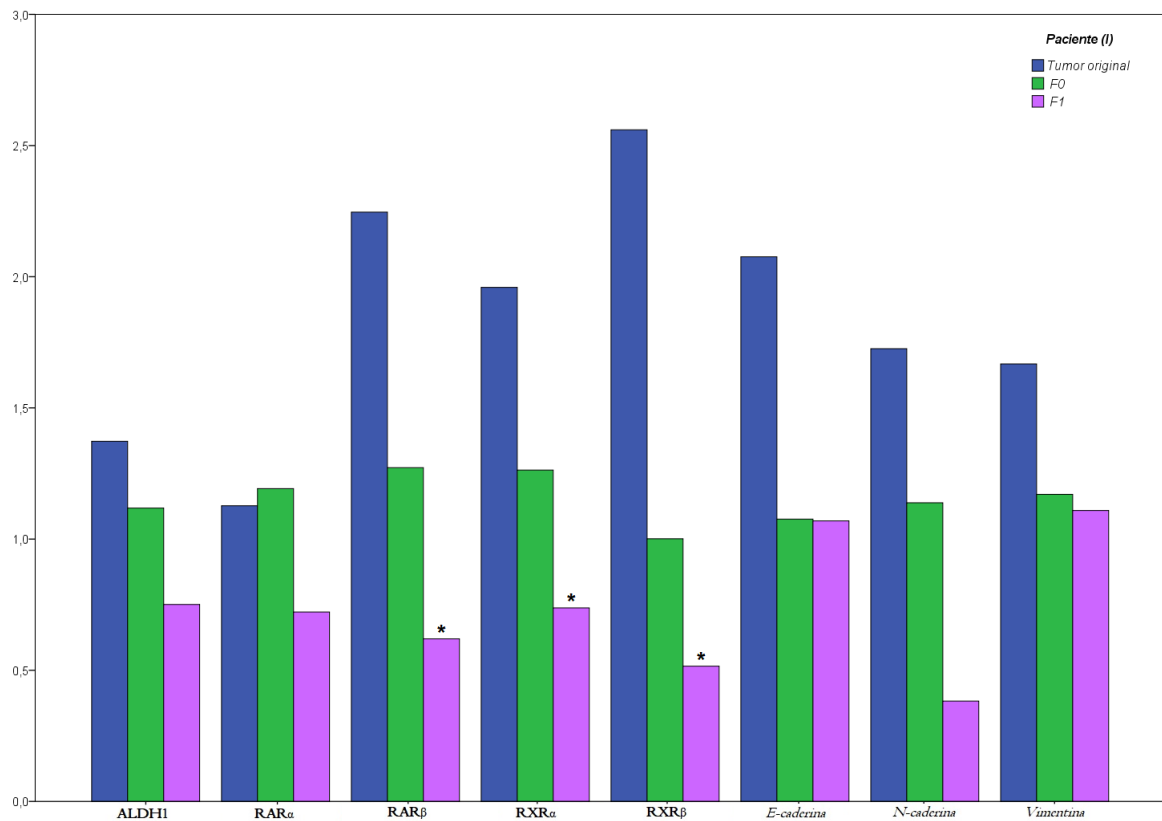
	PACIENTE 1	PACIENTE 2
Idade	65 anos	53 anos
Sexo	masculino	masculino
Fumante	sim	sim
Alcool	sim	não (parou a 5 anos)
Localização do tumor	assoalho de boca	assoalho de boca
Tamanho do tumor	T2	T2
Metástase regional	não	não

Figura-1: Expressão gênica dos receptores retinóides, ALDH1 e do processo de EMT comparando as amostras de CT (tumor original), EA (epitélio adjacente original) do paciente(I) e paciente(II) com a mucosa de controle. * $p < 0,05$



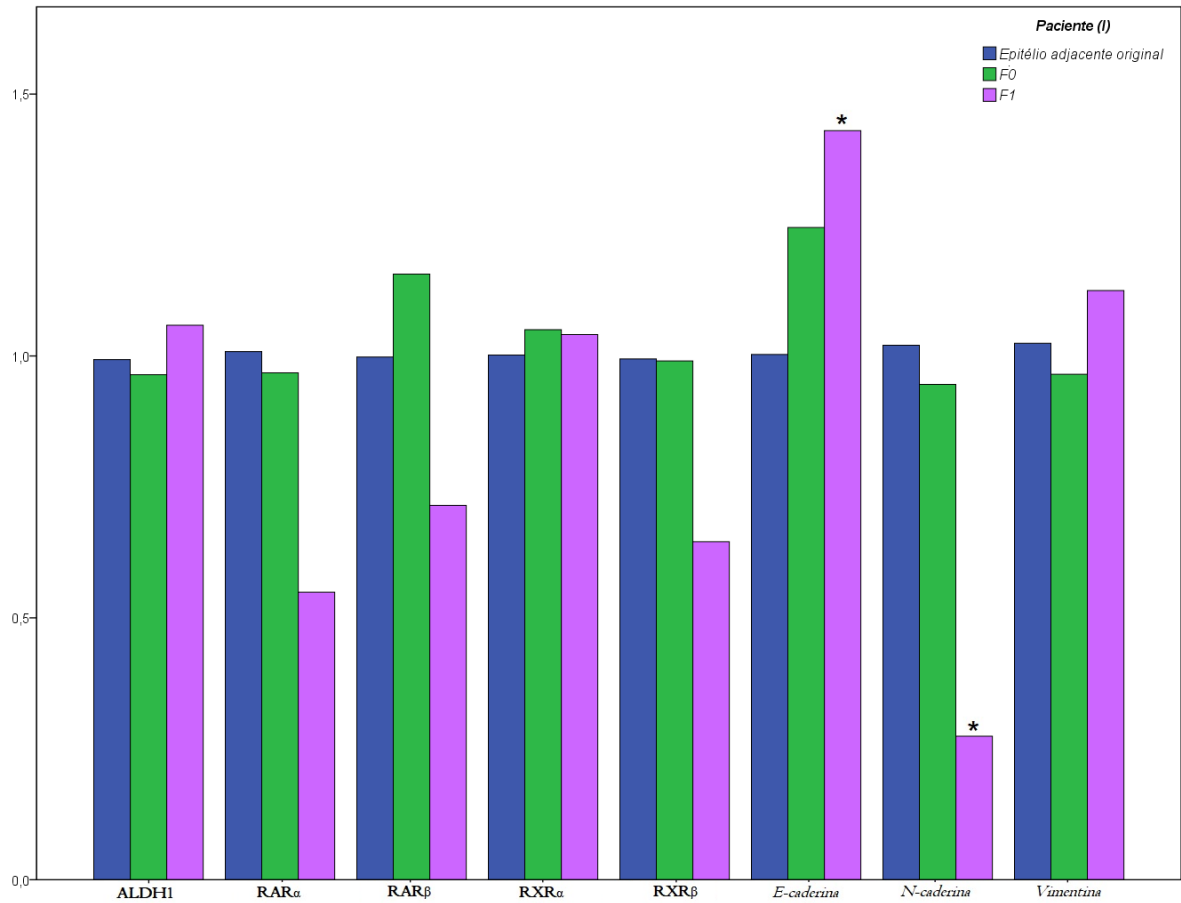
A figura 1 mostra as características de expressão gênica de todos os parâmetros avaliados neste estudo nos pacientes, em relação a mucosa de controle. As diferenças observadas foram em relação ao RAR β , superexpresso no CT do paciente (I) e no CT e EA do paciente (II) (* $p < 0,05$). RXR α estava superexpresso no CT do paciente (I) e no EA do paciente (II) (* $p < 0,05$). RXR β estava superexpresso no CT do paciente (I) e no CT e EA do paciente (II) (* $p < 0,05$). Os demais parâmetros examinados não mostraram qualquer alteração.

Figura-2: Expressão gênica dos receptores retinóides, ALDH1 e do processo de EMT comparando a amostra de CT (tumor original), com os PDX F(0) e F(1). * $p < 0,05$



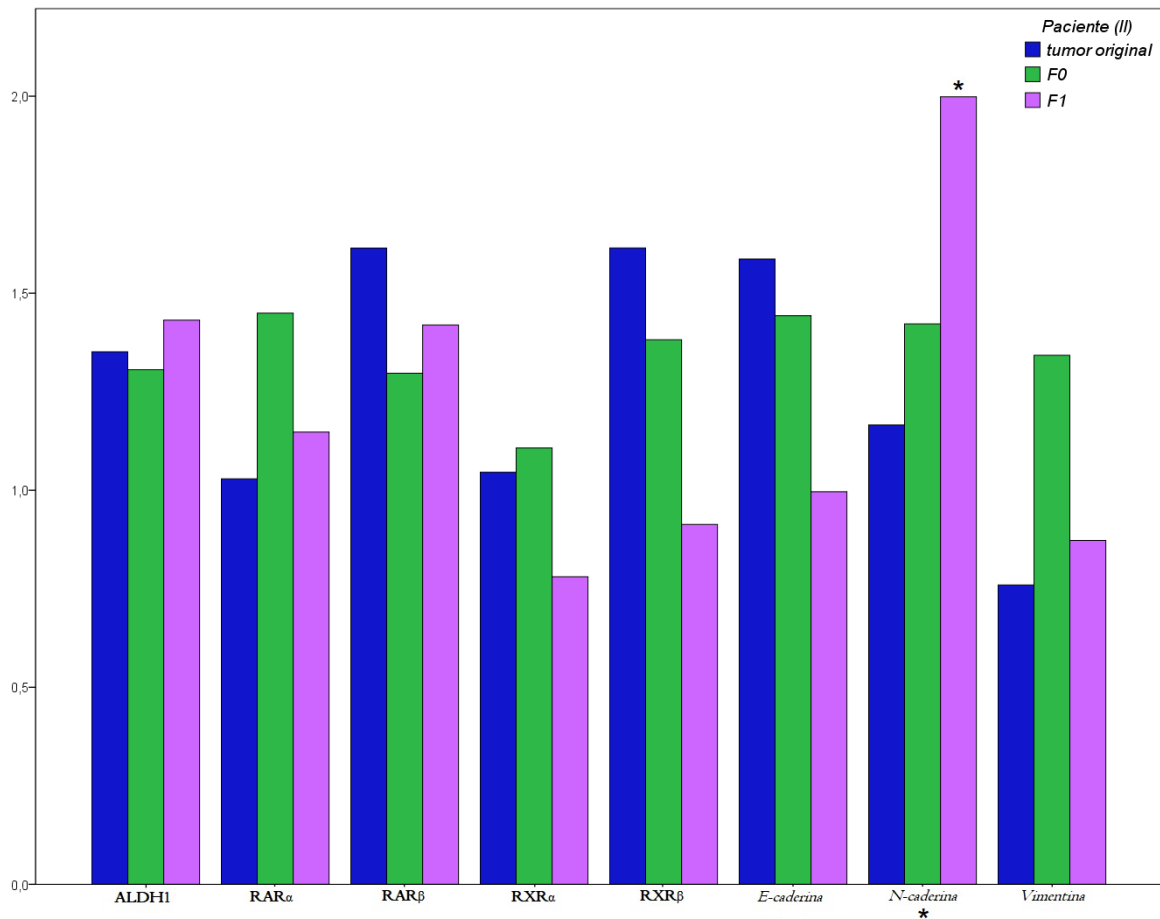
Na figura 2, observa-se que no PDX proveniente do CT do paciente (I), a expressão dos receptores RAR α , RXR α e RXR β diminui significativamente do tumor original e primeira passagem F(0) para a segunda passagem F(1) (* $p < 0,05$). Os demais parâmetros examinados não mostraram qualquer alteração.

Figura-3: Expressão gênica dos receptores retinóides, ALDH1 e do processo de EMT comparando a amostra de epitélio adjacente original, com os PDX passagens F(0) e F(1) do paciente(I). * $p < 0,05$



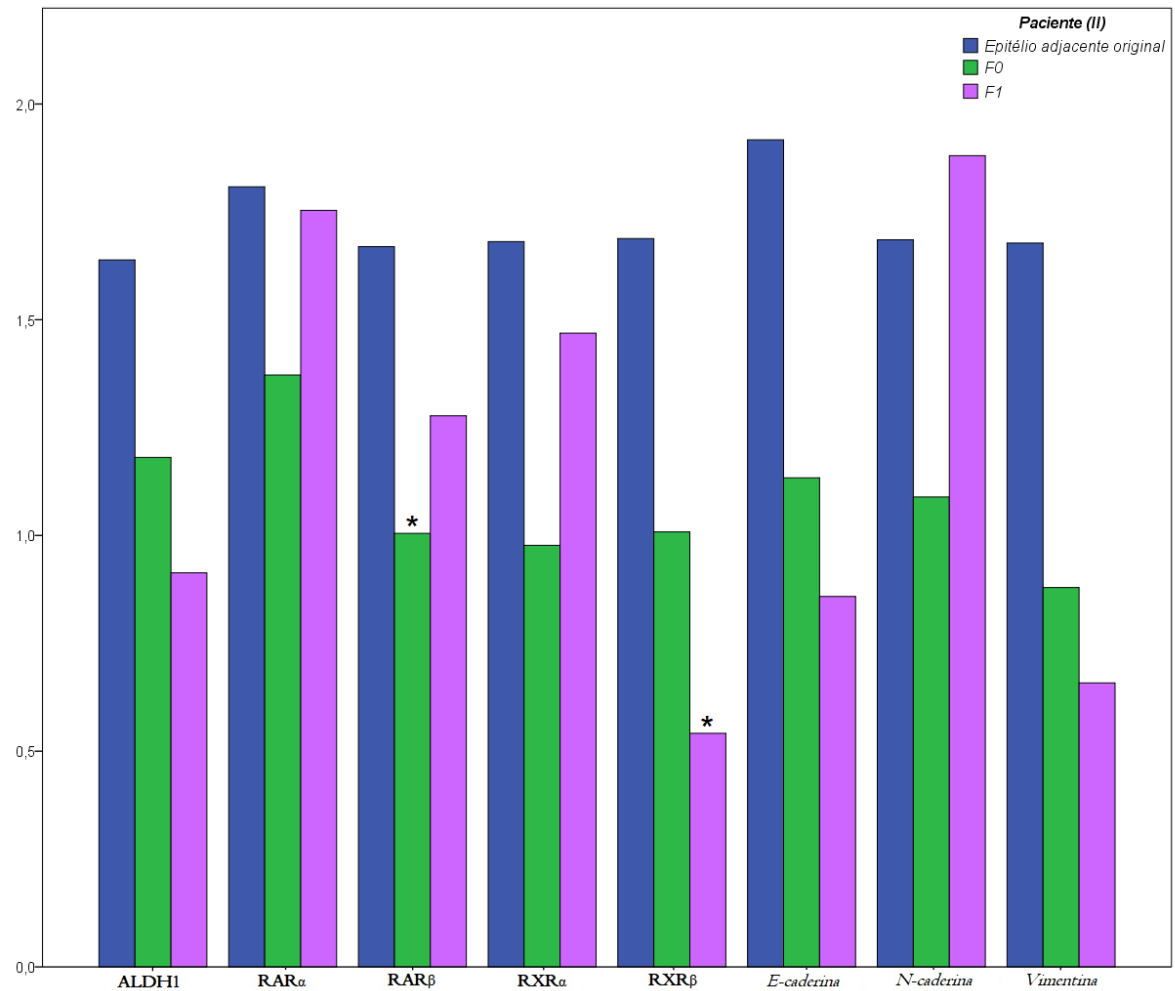
Na figura 3, observa-se que na amostra de epitélio adjacente do paciente (I), aumento na expressão gênica de E-caderina e diminuição da expressão gênica de N-caderina entre as passagens F(0) e F(1) (* $p < 0,05$). Os demais parâmetros examinados não mostraram qualquer alteração.

Figura-4: Expressão gênica dos receptores retinóides, ALDH1 e do processo de EMT comparando a amostra do tumor original, com os PDX das passagens F(0) e F(1) do paciente(II). * $p < 0,05$



Na figura 4, observa-se que a amostra do tumor original (CT) do paciente (II), a expressão gênica de N-caderina aumenta significativamente na primeira (F0) e segunda passagens (F1) em relação ao tumor original (* $p < 0,05$). Os demais parâmetros examinados não mostraram qualquer alteração.

Figura-5: Expressão gênica dos receptores retinóides, ALDH1 e do processo de EMT comparando a amostra de epitélio adjacente original, com os PDX nas passagens F(0) e F(1) do paciente(II). * $p < 0,05$



Na figura 5, observa-se que a expressão dos receptores RAR β em F0 mostrou diminuição estatisticamente significativa em relação ao EA original e F1, (* $p < 0,05$). Enquanto o receptor RXR β diminuiu significativamente em F1 em relação ao original e F0 (* $p < 0,05$). Os demais parâmetros examinados não mostraram qualquer alteração.

Discussão

Observamos que a técnica do PDX em camundongos Balb C/Nude para CEC oral foi adequada e efetiva apresentando expansão e crescimento tumoral para a análise da expressão gênica através de RT-PCR com seleção das áreas por microdissecção a laser (Espina et al. 2005; Huggett et al. 2005; Xu 2010; Bult et al. 2014).

De acordo com a literatura a vantagem do modelo PDX é a possibilidade da manutenção dos padrões do tumor original entre as primeiras passagens. Observamos que PDX/F(0) e o tumor original são estatisticamente iguais nos parâmetros estudados e na segunda passagem F(1) o tumor começa a perder características em sua expressão gênica portanto mudanças nucleares e conseqüentemente distanciamento do tumor original (Giovanella and Foght 1985; Teicher and Teicher 2006; Guo et al. 2016; Szadvari et al. 2016; Zarzosa et al. 2017).

Encontramos na literatura que a manutenção do tumor original se mantém até 5^a ou 6^a passagens, observamos que aumentando o rigor na seleção de células para extração de RNA pela técnica de microdissecção a laser o tumor original estatisticamente fica diferente em F(1) (Law et al. 2009; Sano and Myers 2009; Peng et al. 2013; Jackson and Thomas 2017).

Pelos parâmetros escolhidos para avaliar a expressão gênica que foram os receptores retinóides, processo de EMT e ALDH1 as diferenças estatísticas que mais chamaram a atenção foi dos receptores de retinóides, concordando com alguns achados da literatura quanto a sua importância na participação das vias que promovem crescimento e desenvolvimento tumoral, principal característica exigida pela técnica de PDX (Shalinsky et al. 1995; Klaassen et al. 2001; Olasz et al. 2007; Moreb et al. 2017).

De acordo com nossos achados em relação a expressão gênica dos receptores retinóides concordarem com dados da literatura nos diversos tipos de CEC e a viabilidade/efetividade da técnica alcançada, aumentar o número de pacientes se faz necessário para analisar a existência de um padrão de expressão gênica e conseqüentemente a influência no comportamento clínico, viabilizando assim possibilidades de estudos terapêuticos através desta via de receptores retinóides e ácido retinóico (Sabichi et al. 1998; Lei and De Thé 2003; Elizondo et al. 2009; Das et al. 2014; Di Masi et al. 2015).

O PDX de centro do tumor comparado com o PDX de epitélio adjacente (margem de segurança cirúrgica) foi estatisticamente diferente na expressão gênica dos receptores retinóides. Era esperado que os PDX de epitélio adjacente não formassem tumores, mas houve formação e observamos mais uma vez a participação dos receptores retinóides neste processo de crescimento e desenvolvimento tumoral. Estes achados indicam a heterogeneidade entre tumores (pacientes diferentes) e intra tecidual (centro do tumor e epitélio adjacente/campo cancerização) (Wagner 1991; Zätterström et al. 1992; Leemans et al. 2011; Ben-David et al. 2017; Forte et al. 2017; Gengenbacher et al. 2017).

Conclusão

A avaliação da expressão gênica de amostras de CEC oral pela técnica de RT-PCR por microdissecção a laser para avaliação da semelhança entre o tumor original e os PDX's formados foi efetiva, sugerindo que a passagem F(0) seria a melhor para estudos de carcinogênese e principalmente ensaios terapêuticos. Com os dados obtidos e os padrões observados sugerimos novos estudos com aumento da amostra.

Referências

- Ben-David U, Ha G, Tseng YY, et al (2017) Patient-derived xenografts undergo mouse-specific tumor evolution. *Nat Genet* 49:1567–1575 . doi: 10.1038/ng.3967
- Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjærheim Å (1992) Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 166:375–381 . doi: 10.1002/path.1711660409
- Bult CJ, Krupke DM, Begley DA, et al (2014) Mouse Tumor Biology (MTB): a database of mouse models for human cancer. *Nucleic Acids Res* 43:818–824 .
- Das BC, Thapa P, Karki R, et al (2014) Retinoic acid signaling pathways in development and diseases. *Bioorg Med Chem* 22:673–683 . doi: 10.1016/j.bmc.2013.11.025
- Di Masi A, Leboffe L, De Marinis E, et al (2015) Retinoic acid receptors: From molecular mechanisms to cancer therapy. *Mol Aspects Med* 41:1–115 . doi: 10.1016/j.mam.2014.12.003
- EI-Naggar A.K., Chan J.K.C., Grandis J.R., Takata T. SPJ (Eds). (2017) World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours, 4th edn.
- Elizondo G, Medina-Díaz IM, Cruz R, et al (2009) Retinoic acid modulates retinaldehyde dehydrogenase 1 gene expression through the induction of GADD153-C/EBPβ interaction. *Biochem Pharmacol* 77:248–257 . doi: 10.1016/j.bcp.2008.10.011
- Espina V, Milia J, Wu G, et al (2005) Laser capture microdissection. *Methods Mol Biol* 319:213–29 . doi: 10.1007/978-1-59259-993-6_10
- Forte E, Chimenti I, Rosa P, et al (2017) EMT/MET at the crossroad of stemness, regeneration and oncogenesis: The Ying-Yang equilibrium recapitulated in cell spheroids. *Cancers (Basel)* 9:1–15 . doi: 10.3390/cancers9080098
- Gengenbacher N, Singhal M, Augustin HG (2017) Preclinical mouse solid tumour models: status quo, challenges and perspectives. *Nat Rev Cancer*. doi: 10.1038/nrc.2017.92
- Giovanella BC, Foght J (1985) The Nude Mouse in Cancer Research. *Adv Cancer Res* 44:69–120

- Guo S, Qian W, Cai J, et al (2016) Molecular pathology of patient tumors, patient-derived xenografts, and cancer cell lines. *Cancer Res* 76:4619–4626 . doi: 10.1158/0008-5472.
- Huggett J, Dheda K, Bustin S, Zumla A (2005) Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* 6:279–284 . doi: 10.1038/sj.gene.6364190
- Jackson SJ, Thomas GJ (2017) Human tissue models in cancer research: looking beyond the mouse. *Dis Model Mech* 10:939–942 . doi: 10.1242/dmm.031260
- Klaassen I, Brakenhoff RH, Smeets SJ, et al (2001) Metabolism and growth inhibition of four retinoids in head and neck squamous normal and malignant cells. *Br J Cancer* 85:630–635 . doi: 10.1054/bjoc.2001.1952
- Law JH, Whigham AS, Wirth PS, et al (2009) Human-in-mouse modeling of primary head and neck squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 119:2315–2323 . doi: 10.1002/lary.20607
- Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH (2011) The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 11:9–22 . doi: 10.1038/nrc2982
- Lei M, De Thé H (2003) Retinoids and retinoic acid receptor in cancer. *Eur J Cancer, Suppl* 1:13–18 . doi: 10.1016/S1359-6349(03)00010-7
- Liu X, Giguère V (2014) Inactivation of RAR β inhibits Wnt1-induced mammary tumorigenesis by suppressing epithelial-mesenchymal transitions. *Nucl Recept Signal* 12:e004 . doi: 10.1621/nrs.12004
- Lotan R (1997) Roles of retinoids and their nuclear receptors in the development and prevention of upper aerodigestive tract cancers. *Environ Health Perspect* 105 Suppl:985–8
- Lotan R (1994) Suppression of squamous cell carcinoma growth and differentiation by retinoids. *Cancer Res* 54:1987s–1990s
- Moreb JS, Ucar-Bilyeu DA, Khan A (2017) Use of retinoic acid/aldehyde dehydrogenase pathway as potential targeted therapy against cancer stem cells. *Cancer Chemother Pharmacol* 79:295–301 . doi: 10.1007/s00280-016-3213-5
- Olasz J, Juhász A, Remenár É, et al (2007) RAR2 suppression in head and neck squamous cell carcinoma correlates with site, histology and age. *Oncol Rep* 18:105–112
- Peng S, Creighton CJ, Zhang Y, et al (2013) Tumor grafts derived from patients with head and neck squamous carcinoma authentically maintain the molecular and histologic characteristics of human cancers. *J Transl Med* 11:198 . doi: 10.1186/1479-5876-11-198
- Ralhan R, Chakravarti N, Kaur J, et al (2006) Clinical significance of altered expression of retinoid receptors in oral precancerous and cancerous lesions: Relationship with cell cycle regulators. *Int J Cancer* 118:1077–1089 . doi: 10.1002/ijc.21483

- Sabichi AL, Hendricks DT, Bober MA, Birrer MJ (1998) Retinoic Acid Receptor Expression and Growth Inhibition of Gynecologic Cancer Cells by the Synthetic Retinoid N - (4-Hydroxyphenyl) Retinamide. *J Natl Cancer Inst* 90:597–605
- Sano D, Myers JN (2009) Xenograft models of head and neck cancers. *Head Neck Oncol* 1:32 . doi: 10.1186/1758-3284-1-32
- Shalinsky DR, Bischoff ED, Gregory ML (1995) Retinoid-induced Suppression of Squamous Cell Differentiation in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Xenografts (Line 1483) in Athymic Nude Mice. *Cancer Res* 55:3183–3191
- Sun SY, Lotan R (2002) Retinoids and their receptors in cancer development and chemoprevention. *Crit Rev Oncol Hematol* 41:41–55 . doi: 10.1016/S1040-8428(01)00144-5
- Szadvari I, Krizanova O, Babula P (2016) Athymic Nude Mice as an Experimental Model for Cancer Treatment Cancer diseases and their treatment. *Physiol Res* 65:441–453
- Teicher BA, Teicher BA (2006) Tumor models for efficacy determination. *Mol cancer Ther* 5:2435–2443 . doi: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0391
- Wagner W (1991) The heterogeneity of solid human xenotransplant tumours. *J Cancer Res Clin Oncol* 117:568–574
- Wolbach SB, Howe PR (1925) Tissue changes following deprivation of fat-soluble a vitamin. *J Exp Med* XLII:753–777
- Xu BJ (2010) Combining laser capture microdissection and proteomics: Methodologies and clinical applications. *Proteomics - Clin Appl* 4:116–123 . doi: 10.1002/prca.200900138
- Zarzosa P, Navarro N, Giralt I, et al (2017) Patient-derived xenografts for childhood solid tumors: a valuable tool to test new drugs and personalize treatments. *Clin Transl Oncol* 19:44–50 . doi: 10.1007/s12094-016-1557-2
- Zätterström UK, Braakhuis BJ, Wennerberg J, et al (1992) Growth of xenografted squamous cell carcinoma of the head and neck--possible correlation with patient survival. *APMIS* 100:976–80
- Zhang L, Nadzan AM, Heyman RA, et al (1996) Discovery of novel retinoic acid receptor agonists having potent antiproliferative activity in cervical cancer cells. *J Med Chem* 39:2659–2663 . doi: 10.1021/jm960285j
- Zou CP, Hong WK, Lotan R (1999) Expression of retinoic acid receptor β is associated with inhibition of keratinization in human head and neck squamous carcinoma cells. *Differentiation* 64:123–132

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Quanto a taxa de sucesso na enxertia encontramos na literatura uma variação de 11% e 90% que pode ser atribuída a seleção do fragmento na peça cirúrgica e quanto ao estadiamento do tumor, quanto mais indiferenciado, maior e com características metastáticas melhor a taxa de enxertia (RAMASWAMY et al., 2003; ZÄTTERSTRÖM et al., 1992).

Mostramos em nosso trabalho uma taxa de sucesso de 67% em tumores T2 com fragmentos de centro do tumor e do epitélio adjacente (margem de segurança cirúrgica), o tempo de implantação desde remoção da peça cirúrgica – análise do patologista plantonista/seleção dos fragmentos – e implantação no animal foi de 1h30min sugerindo e corroborando a importância deste tempo na taxa de sucesso. Em relação as perdas (33%), a maioria ocorreu por perda do fragmento onde os animais provocaram a deiscência de sutura e consequente perda dos PDX (MACBRIDE; HERMANS, 2016; SANO; MYERS, 2009).

A expressão gênica dos receptores retinóides das duas amostras coletadas apesar de não ter significância estatística apresentaram o mesmo padrão de redução gradual ao longo das passagens. A alteração histopatológica de acordo com a literatura mais plausível foi a diminuição do estroma humano, relacionando assim a progressão do tumor – com expansão das células epiteliais tumorais, outra característica notada foi a ceratinização do tumor (OUBAYOUN et al., 1985; REISS; PITMAN; SARTORELLI, 1985; TA et al., 1990; ZOU; HONG; LOTAN, 1999).

A margem de segurança cirúrgica nas duas amostras mostrou-se ineficiente, mesmo com um N inadequado pois foi calculado com outros objetivos, despertou a atenção pois os PDX de epitélio adjacente das duas amostras desenvolveram tumores. Na análise histopatológica destes epitélios adjacentes em uma amostra observamos a presença de invasão de ilhas de células tumorais e um epitélio de mucosa com características neoplásicas, já na outra amostra a análise histopatológica gerou mais discussões pois apresentava um epitélio com displasia mais leve e na profundidade pequenas ilhas de células neoplásicas (ANDERSON; SISSON; MONCRIEFF, 2015; MIYOTA et al., 2014; WEINSTOCK; ALAVA; DIERKS, 2014).

A heterogeneidade biológica das células malignas também pode influenciar os efeitos de margens próximas e as implicações para o tratamento (EL-FOL et al., 2015; HINNI; ZARKA; HOXWORTH, 2013; WOLF, 2012). Apesar de surgir da mesma célula progenitora o CEC de diferentes sítios dentro da cavidade oral tem propensões divergentes para a invasão em tecidos adjacentes. Por exemplo, o carcinoma do triângulo retromolar certamente tem uma

maior tendência de invasão do que um carcinoma do palato duro (JOHNSON et al., 1997; MISTRY; QURESHI; KUMARAN, 2005; WEINSTOCK; ALAVA; DIERKS, 2014). Esses fatores corroboram com os achados de nosso experimento e sugerem a importância ao planejar as ressecções e orientar adequadamente as amostras para avaliação patológica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDERSON, Caroline Rachael; SISSON, Katherine; MONCRIEFF, Marc. A meta-analysis of margin size and local recurrence in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 51, n. 5, p. 464–469, 2015.

EL-FOL, Hossam Abdelkader et al. Significance of post-resection tissue shrinkage on surgical margins of oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, [s. l.], v. 43, n. 4, p. 475–482, 2015.

HINNI, Michael L.; ZARKA, Matthew A.; HOXWORTH, Joseph M. Margin mapping in transoral surgery for head and neck cancer. **Laryngoscope**, [s. l.], v. 123, n. 5, p. 1190–1198, 2013.

JOHNSON, R. E. et al. Quantification of surgical margin shrinkage in the oral cavity. **Head & neck**, [s. l.], v. 19, n. 4, p. 281–6, 1997.

MACBRIDE, Megan M.; HERMANS, Els. **Xenograft Host Selection : Important Factors for Experimental Success**TACONIC INSIGHTS ONCOLOGY AND IMMUNO-ONCOLOGY. [s.l: s.n.].

MISTRY, Rajesh C.; QURESHI, Sajid S.; KUMARAN, C. Post-resection mucosal margin shrinkage in oral cancer: Quantification and significance. **Journal of Surgical Oncology**, [s. l.], v. 91, n. 2, p. 131–133, 2005.

MIYOTA, Shun et al. Intraoperative assessment of surgical margins of oral squamous cell carcinoma using frozen sections: A practical clinicopathological management for recurrences. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2014, 2014.

OUBAYOUN, Jean Pierre et al. Cytokeratin patterns of human oral epithelia: Differences in cytokeratin synthesis in gingival epithelium and the adjacent alveolar mucosa. **Differentiation**, [s. l.], v. 30, n. 2, p. 123–129, 1985.

RAMASWAMY, Sridhar et al. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 49–54, 2003.

REISS, M.; PITMAN, S. W.; SARTORELLI, A. C. Modulation of the terminal differentiation of human squamous carcinoma cells in vitro by all-trans-retinoic acid. **J.Natl.Cancer Inst.**, [s. l.], v. 74, n. 0027–8874 (Print), p. 1015–1023, 1985.

SANO, Daisuke; MYERS, Jeffrey N. Xenograft models of head and neck cancers. **Head & neck oncology**, [s. l.], v. 1, p. 32, 2009.

TA, B. M. et al. Keratinocyte transglutaminase in human skin and oral mucosa: cytoplasmic localization and uncoupling of differentiation markers. **J.Cell Sci.**, [s. l.], v. 95 (Pt 4), n. 0021–9533 (Print), p. 631–638, 1990.

WEINSTOCK, Y.Etan; ALAVA, Ibrahim; DIERKS, Eric J. Pitfalls in determining head and neck surgical margins. **Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 151–162, 2014.

WOLF, Gregory T. Surgical Margins in the Genomic Era. **Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, [s. l.], v. 138, n. 11, p. 1001, 2012.

ZÄTTERSTRÖM, U. K. et al. Growth of xenografted squamous cell carcinoma of the head and neck--possible correlation with patient survival. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, [s. l.], v. 100, n. 11, p. 976–80, 1992.

ZOU, C. P.; HONG, W. K.; LOTAN, R. Expression of retinoic acid receptor β is associated with inhibition of keratinization in human head and neck squamous carcinoma cells. **Differentiation**, [s. l.], v. 64, p. 123–132, 1999.