

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

ESTUDO DO PERFIL SOCIO DEMOGRÁFICO DE PORTADORES DE  
CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO E  
IMUNOMARCAÇÃO DE CD44 E ALDH1 NESTES TUMORES E NO EPITÉLIO  
NÃO TUMORAL

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Ana Luísa Homem de Carvalho

Tese apresentada como parte dos pré-requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Patologia Bucal.

ORIENTADOR: PROF DR MANOEL SANT'ANA FILHO  
PORTO ALEGRE, AGOSTO DE 2011

***“Somos o que fazemos repetidamente. A excelência não é um feito, e sim um hábito.” (Aristóteles, 384-324 AC)***

## AGRADECIMENTOS

---

A todos aqueles que fazem parte da minha vida, me acompanham, me apóiam e torcem por mim durante todos estes anos.

Ao meu orientador e eterno chefe *Prof Manoel*: minha eterna gratidão pela confiança em mim depositada e pela oportunidade de trabalhar ao lado de uma pessoa tão brilhante e competente que me proporcionou inúmeras oportunidades.

Ao *Renato*: meu marido e grande amigo... foste o melhor parceiro durante estes anos na compreensão e apoio das minhas escolhas sempre com palavras de estímulo. Isto te faz muito especial.

A minha querida família (*mãe, irmãos, cunhados, sobrinhos*): por sempre estarem ao meu lado, torcerem por mim e acreditarem nas minhas escolhas.

A *Isabel*: não tenho palavras para te agradecer todos os momentos não só de execução deste estudo, mas por todos em que fizeste parte do meu crescimento e amadurecimento. Este trabalho também é teu.

Ao *Prof Pantelis* : também agradeço a confiança e paciência em sempre estar disposto a me auxiliar para que eu desenvolvesse um trabalho melhor;

Aos demais professores: *Manoela, Marco, Marcelo, Márcia e Vinícius* meu sincero agradecimento pelos conhecimentos compartilhados e pela sempre disposição durante estes anos.

A *Prof Anna Fossati*: trabalhar contigo foi um presente. Contigo iniciei na docência e além de trabalhar ao lado de uma pesquisadora ímpar ganhei uma grande amiga.

A *Chris e Alê* do Laboratório: muito obrigada por todo o esforço de vocês para que as coisas sempre dessem certo. Vocês são um exemplo de seriedade e competência.

Aos demais amigos do quinto andar (*Ana Carolina, Paulinha*): conhecer e conviver com vocês foi especial. Obrigada por tudo!

As *Equipes de Cirurgia e Patologia do HCPA* (*professores, residentes e demais funcionários*) agradeço às portas sempre abertas e a receptividade durante a coleta. Um agradecimento especial a *Dra Deise*.

Ao *Angiogenesis Research Laboratory* da Universidade de Michigan: agradeço a hospitalidade e oportunidade, em especial ao *Dr Jacques Nör*.

As minhas queridas colegas e amigas de doutorado (*Fernanda, Fran e Laurinha*): o bom convívio com vocês fez estes anos serem mais felizes. Trabalhar em parceria foi um aprendizado.

A *Laurinha*: minha colega, amiga e parceira de pós graduação desde 2003.... estamos aqui mais uma vez concluindo uma etapa e tenho certeza que sem ti tudo isto não seria possível.

ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA .....	06
OBJETIVOS .....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	11
ARTIGO CIENTÍFICO 1 .....	17
ARTIGO CIENTÍFICO 2 .....	30
CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	48

## ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

---

Carcinomas de cabeça e pescoço (CECP) são o sexto tipo de câncer mais comum e 95% destes tumores são do tipo espinocelulares. Na América do Sul, Argentina, sul do Brasil e Uruguai apresentam os níveis mais altos de incidência de CECP sendo as maiores taxas encontradas no sul do Brasil. <sup>1</sup> Para o ano de 2010, a estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) é de 14.120 novos casos sendo 10.330 em homens e 3.790 em mulheres. Os homens acima de 45 anos representam o grupo mais acometido por esta neoplasia sendo ela o quinto tipo mais comum de câncer nestes indivíduos. <sup>2</sup>

O uso de tabaco e o de álcool é reconhecido mundialmente como o fator de risco mais importante associado ao desenvolvimento desta doença ocorrendo um sinergismo entre ambos. Aspectos como nível socioeconômico, condição bucal e qualidade de vida têm sido relatados como também possíveis fatores de risco para o desenvolvimento do CECP. <sup>3</sup>

Mesmo com diversos estudos no campo da carcinogênese oral, a taxa de sobrevida em cinco anos para esta neoplasia é baixa não sendo registrado aumento significativo nos últimos 30 anos. <sup>4,5</sup> Um dos aspectos importantes para este fato é pelo desenvolvimento de segundos tumores primários (SPTs), recorrências locais (LRs) e de metástases. A média de SPTs é de 2% a 3% de novos casos por ano e LRs aparecem em 10% a 30% dos casos, mesmo com margens livres de tumor após a cirurgia. <sup>6,7</sup> Tanto SPTs quanto LRs não se originam de maneira independente uma vez que ambos tumores apresentam a mesma origem clonal. <sup>8,9,10</sup>

A existência de um campo “pré-neoplásico” chamado de campo de cancerização foi descrito primeiramente por Slaughter em 1957. <sup>11</sup> Em seu estudo com 783 biópsias de carcinomas espinocelulares de boca, utilizou este termo para denominar o tecido aparentemente normal que circunda os tumores, também alterado pela ação dos carcinógenos. O chamado campo de cancerização seria responsável pelo aparecimento de novos tumores (recorrências locais e segundos tumores primários) uma vez que o epitélio remanescente após a remoção cirúrgica do tumor continuaria exposto a estes carcinógenos e assim já apresentaria algumas

alterações genéticas semelhantes às tumorais podendo ou não apresentar alterações morfológicas. <sup>12-13-14</sup>

A identificação destas áreas alteradas é um importante instrumento para a melhora dos índices de sobrevida assim como a escolha de um tratamento menos agressivo. O aparecimento de STPs e LRs indica um pior curso da doença para o paciente e detectar as alterações precoces no tecido adjacente ao tumor representa a melhor alternativa para o aumento da sobrevida. <sup>12-15-16</sup>

O modelo hoje aceito para o desenvolvimento do câncer é o chamado hierárquico no qual um pequeno percentual das células é responsável por seu crescimento enquanto as demais possuem potencial replicativo limitado. <sup>17</sup> Nesta hierarquia de desenvolvimento existe no tumor um percentual de células com capacidade de auto-renovação e diferenciação sugerindo que esta pequena população celular possui características de células tipo tronco mesenquimais sendo responsáveis pelo crescimento, recorrências e metástases tumorais. <sup>18-19</sup> Diversos estudos sugerem a caracterização destas células através da evidência da enzima aldeído desidrogenase (ALDH1) e da molécula de adesão de superfície CD44. <sup>18-19-20-21-22-23-24</sup>

#### **CD44:**

As moléculas de adesão atuam na sinalização entre o interior e o exterior das células e estão envolvidas nos processos de crescimento, proliferação e migração celular. <sup>25</sup> Dentre estas moléculas, destaca-se o CD44 que pertence a um grupo polimorfo de glicoproteínas transmembrana que agem na interação célula-célula e célula-matriz. <sup>26</sup> Na organização genômica desta molécula, estão envolvidos 20 exons, mas somente os 5 primeiros e os 5 últimos são constantes. Os 10 exons restantes, localizados entre estas duas regiões, ligam-se de maneira aleatória formando múltiplas isoformas de tamanhos diferentes (CD44v). <sup>27</sup>

Uma vez que é definida como uma molécula de adesão, o CD44 mantém ligação com diversas proteínas da matriz extracelular sendo o ácido hialurônico seu ligante principal. A ligação entre ácido hialurônico e CD44 promove proliferação, migração e invasão, elementos chave na carcinogênese uma vez que em uma neoplasia existe um descontrole tanto da adesão quanto da proliferação celular. <sup>27-28</sup> Estando o CD44 relacionado também com a proliferação, sua imunomarcação é positiva nas camadas

basal e parabasal dos epitélios sadios, com ausência nas camadas superficiais.<sup>29-30-31</sup> Epitélios displásicos podem apresentar diferença neste padrão, apresentando-se mais irregular e presente nas camadas mais superficiais.<sup>33</sup>

Mediante as características acima descritas, a imunomarcção tanto do CD44s quanto das suas isoformas foram relacionadas com a progressão de alguns tumores em diversos estudos associando sua ausência com o aparecimento de metástases.<sup>32-33-34-35</sup> Em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, a principal corrente sugere que existe uma perda do CD44 no processo da carcinogênese e uma expressão heterogênea nos tumores.<sup>33</sup>

Uma vez que os epitélios adjacentes aos tumores aparentemente constituem a origem das recorrências locais e segundos tumores primários, a ausência da imunomarcção de CD44 neste tecido tem sido relacionada com os eventos iniciais da carcinogênese.<sup>15</sup> Evidenciar esta molécula nos epitélios adjacentes pode ser útil tanto no diagnóstico precoce como na melhora da sobrevida. Este aspecto contribui para um melhor entendimento dos mecanismos que levarão ao desenvolvimento do fenótipo maligno.<sup>36</sup>

### **ALDH1:**

A família da enzima aldeído desidrogenase (ALDH) consiste de 19 genes em localizações cromossômicas distintas.<sup>37</sup> Muitos genes codificadores da ALDH em mamíferos já foram identificados assim como suas isoformas e 17 destas já foram descritas.<sup>38</sup> A isoforma predominante desta enzima é ALDH1 que converte a vitamina A em ácido retinóico, fundamental na homeostase e desenvolvimento dos mamíferos.<sup>39</sup> Atua nos estágios iniciais da diferenciação e por isto foi evidenciada como um marcador de células que exibem propriedades de auto-renovação tanto em processos fisiológicos quanto em patológicos.<sup>23</sup>

Em tecidos epiteliais, a presença da ALDH1 é observada principalmente nas camadas basal e parabasal, mas podem ocorrer variações desta imunomarcção dentre os tecidos de mesma origem como nos epitélios de revestimento.<sup>40</sup>

A primeira evidência de que a presença de ALDH1 estaria relacionada com células indiferenciadas foi em células tronco hematopoiéticas e a partir desta constatação é que ALDH1 tem sido identificada como um possível marcador de células com características de células tronco mesenquimais.<sup>41-42-43</sup>

Uma vez que há evidências de na população tumoral existir um pequeno percentual de células responsáveis pela progressão e manutenção do tumor, a imunomarcção de ALDH1 foi estudada por alguns grupos como um marcador prognóstico em tumores epiteliais, sendo as células imunopositivas aquelas com características de células tronco tumorais. Entretanto, em tecidos epiteliais com imunomarcção positiva em mais de 10% das células, a presença da ALDH1 não poderia ser considerada válida para a evidenciação das células tipo tronco tumorais tanto nos tumores quanto nos epitélios não tumorais correspondentes.<sup>40</sup>

A idéia de que existem células com características de células tronco mesenquimais na população tumoral permite melhor entender a progressão dos tumores bem como o desenvolvimento de terapêuticas mais adequadas.<sup>23</sup> A primeira evidência da existência de células do tipo tronco tumorais em tumores sólidos foi em um estudo em tumores de mama e desde então estudos em diversos tumores sólidos, incluindo os CECP, têm utilizado a ALDH1 como um possível marcador de células com características de células do tipo tronco tumorais.<sup>22-44</sup>

## **OBJETIVOS**

---

1. Identificar o perfil sócio demográfico dos portadores de CECF e observar as características clínicas e histopatológicas do tumor;
2. Classificar os epitélios não neoplásicos a carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço quanto a sua morfologia, quanto a imunomarcção de CD44 e ALDH1 e compará-las com as características e imunomarcções do tumor;

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

1. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer  
*Oral Oncology* 2009;**45**: 309–16
2. Estimativa 2010: Incidência de Cancer no Brasil, Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde, <http://www.inca.gov.br>. Acessado em julho de 2011
3. Scully C, Bagan JV; Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Diseases* 2009; **15**: 388–99
4. Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, van der Wal JE, Snow GB; Leemans RC, Braakhuis JM. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am J Pathol* 2002;**161**(3):1051-60
5. Kokko LL, Hurme S, Maula SM, Alanen K, Grénman R, Kinnunen I, Ventelä S. Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011;**47**(6):510-6.
6. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer*. 1994;**73**(1):187-90
7. Braakhuis BJM, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck* 2002; **24**:198–06

8. Wang SJ, Bourguignon LY. Role of hyaluronan-mediated CD44 signaling in head and neck squamous cell carcinoma progression and chemoresistance. *Am J Pathol.* 2011 **178**(3):956-63
9. Scholes AG, Woolgar JA, Boyle MA, Brown JS, Vaughan ED, Hart CA, Jones AS, Field JK. Synchronous oral carcinomas: independent or common clonal origin? *Cancer Res.* 1998 **1;58**(9):2003-06
10. Bedi GC, Westra WH, Gabrielson E, Koch W, Sidransky D. Multiple head and neck tumors: evidence for a common clonal origin. *Cancer Res.* 1996 **1;56** (11):2484-87
11. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953 **6**(5):963-68
12. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996 **56**(11):2488-92
13. Tabor MP, Brakenhoff RH, van Houten VM, Kummer JA, Snel MH, Snijders PJ, Snow GB, Leemans CR, Braakhuis BJ. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications. *Clin Cancer Res.* 2001 Jun;**7**(6):1523-32
14. Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, Kummer JA, Leemans CR, Braakhuis BJ. Genetically altered fields as origin of locally recurrent head and neck cancer: a retrospective study. *Clin Cancer Res.* 2004 **1;10**(11):3607-13
15. González-García R, Naval-Gías L, Román-Romero L, Sastre-Pérez J, Rodríguez-Campo FJ. Local recurrences and second primary tumors from squamous cell

carcinoma of the oral cavity: a retrospective analytic study of 500 patients. *Head Neck*. 2009 Sep;**31**(9):1168-80

16. van der Waal I, de Bree R. Second primary tumours in oral cancer. *Oral Oncol*. 2010 Jun;**46**(6):426-28.

17. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F., & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001 **414**:105–11

18. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 2007;**104**:973–78

19. Harper LJ; Piper K; Common J; Fortune F; Mackenzie IC. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2007 **36**: 594–03

20. Oliveira LR; Oliveira-Costa JP; Araújo IM; Soave DF; Zanetti JS; Soares FA; Zucoloto S; Ribeiro-Silva A. Cancer stem cell immunophenotypes in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011 **40**: 135–42

21. Ha PK, Chang SS, Glazer CA, Califano JA, Sidransky D. Molecular techniques and genetic alterations in head and neck cancer. *Oral Oncol*. 2009 **45**(4-5):335-39

22. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003 **100**:3983-88

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

24. Joshua B, Kaplan MJ, Doweck I, Pai R, Weissman IL, Prince ME, Ailles LE. Frequency of cells expressing CD44, a Head and Neck cancer stem cell marker: Correlation with tumor aggressiveness. *Head Neck*. 2011 Feb 14.
25. Lyons AJ, Jones J. Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007 **36**(8):671-79
26. Georgolios A, Batistatou A, Charalabopoulos A, Manolopoulos L, Charalabopoulos K. The role of CD44 adhesion molecule in oral cavity cancer. *Exp Oncol*. 2006 **28**(2):94-8
27. Oliveira DT, Sherriff M, Odell EW. Expression of CD44 variant exons by primary and metastatic oral squamous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1998; **27**:303–7
28. Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, Etzer ME. Essentials of glycobiology 2009; Cold Spring Harbor (NY): Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cap 15, 37 e 44.
29. Stoll C, Baretton G, Soost F, Terpe HJ, Domide P, Löhns U. Prognostic importance of the expression of CD44 splice variants in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol*. 1999 **35**(5):484-89
30. Hirvikoski P, Tammi R, Kumpulainen E, Virtaniemi J, Parkkinen JJ, Tammi M, Johansson R, Agren U, Karhunen J, Kosma VM. Irregular expression of hyaluronan and its CD44 receptor is associated with metastatic phenotype in laryngeal squamous cell carcinoma. *Virchows Arch*. 1999 **434**(1):37-44
31. Sato S, Miyauchi M, Takekoshi T, Zhao M, Kudo Y, Ogawa I, Kitagawa S, Fujita M, Takata T. Reduced expression of CD44 variant 9 is related to lymph node metastasis and poor survival in squamous cell carcinoma of tongue. *Oral Oncol*. 2000 **36**(6):545-9.

32. Mostaan LV, Khorsandi MT, Sharifian SM, Shandiz FH, Mirashrafi F, Sabzari H, Badiie R, Borghei H, Yazdani N. Correlation between E-cadherin and CD44 adhesion molecules expression and cervical lymph node metastasis in oral tongue SCC: Predictive significance or not. *PatholResPract* 2011
33. Bánkfalvi A, Krassort M, Buchwalow IB, Végh A, Felszeghy E, Piffkó J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and beta-catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. *J Pathol.* 2002 **198**(3):343-51
34. Rautava J, Soukka T, Inki P, Leimola-Virtanen R, Saloniemi I, Happonen RP, Heikinheimo K. CD44v6 in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. *Oral Oncol.* 2003 **39**(4):373-79
35. Carinci F, Stabellini G, Calvitti M, Pelucchi S, Targa L, Farina A, Pezzetti F, Pastore A. CD44 as prognostic factor in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Craniofac Surg.* 2002 **13**(1):85-89
36. Wang SJ, Bourguignon LYW. Role of hyaluronan-mediated CD44 signaling in head and neck squamous cell carcinoma progression and chemoresistance. *The American Journal Pathol* 2011 **178**(3): 956-63
37. Black WJ, Stagos D, Marchitti SA., Nebert DW, Tipton KF, Bairoch A, Vasiliou V. Human aldehyde dehydrogenase genes: alternatively spliced transcriptional variants and their suggested nomenclature. *Pharmacogenet Genomics.* 2009 **19**(11) 893–02
38. Sládek NE. Human aldehyde dehydrogenases: potential pathological, pharmacological, and toxicological impact. *J Biochem Mol Toxicol.* 2003;**17**(1):7-23
39. Ma I, Allan AL. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev.* 2011 **7**(2):292-06
40. Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q, Li C, Wang LP, Roby KF, Orsulic S, Connolly DC, Zhang Y, Montone K, Bützow R, Coukos G, Zhang L. Distinct expression

levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *Plos One*. 2010 **21**;5(4):e10277

41. Kastan MB, Schlaffer E, Russo JE, Colvin OM, Civin CI, Hilton J. Direct demonstration of elevated aldehyde dehydrogenase in human hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1990 **15**;75(10):1947-50

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

43. Krishnamurthy S, Dong Z, Vodopyanov D, Imai A, Helman JI, Prince ME, Wicha MS, Nör JE. Endothelial cell-initiated signaling promotes the survival and self-renewal of cancer stem cells. *Cancer Res*. 2010 **1**;70(23):9969-78.

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

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

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

Ana Luísa Carvalho<sup>1\*</sup>; Laura de Campos Hildebrand<sup>1\*</sup>; Alex Nogueira Hass<sup>2</sup>; Isabel da Silva Lauxen<sup>1</sup>; Manoel Sant'Ana Filho<sup>1</sup>.

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

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

RESUMO

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

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

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

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

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

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

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

## INTRODUÇÃO

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

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

O consumo de álcool e tabaco representa um dos principais fatores de risco para estes tumores<sup>5-9</sup> e geralmente são consumidos juntos. Esta associação aumenta significativamente o risco para o desenvolvimento do câncer, uma vez que uma das características do álcool é a sua capacidade de modificar a permeabilidade da mucosa facilitando a penetração de substâncias carcinogênicas presentes no fumo.<sup>7,10</sup> A higiene oral também é relatada como possível fator de risco.<sup>1,2,9</sup> As desigualdades sociais podem ser consideradas como fator de risco para o desenvolvimento do tumor, uma vez que o baixo nível sócioeconômico está relacionado a hábitos que afetam o comportamento e estilo de vida.<sup>2,11</sup>

O diagnóstico precoce é possível a partir de um correto exame da boca e orofaringe, entretanto, a maioria dos tumores ainda é diagnosticada num momento tardio, quando a doença está em estágio avançado.<sup>4,6</sup> Tal fato contribui para as baixas taxas de sobrevida em cinco anos, assim como para um tratamento mais agressivo.<sup>2,6,12,13</sup>

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

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

## MATERIAIS E MÉTODOS

### ***Amostra do Estudo:***

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

### ***Entrevista:***

Todos os pacientes foram informados dos objetivos e métodos da pesquisa e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA (GPPG nº09-315). Os pacientes foram entrevistados para obtenção de dados sócio demográficos e comportamentais. Foram obtidas

informações como sexo, idade, cor da pele, estado civil e educação, além de hábitos de higiene bucal, fumo, consumo de bebidas alcoólicas, percepção das condições bucais, nível sócio-econômico, história médica e odontológica.

#### ***Exame Clínico:***

Os pacientes foram examinados para obtenção de informações como uso de próteses dentárias removíveis (prótese total/parcial, superior/inferior) e suas condições dentárias (CPOD).<sup>20</sup> Nos prontuários do hospital, foram coletadas as informações referentes às características clínicas do tumor como o pTNM<sup>16</sup> e a terapêutica utilizada em cada caso. Os pacientes receberam tratamento para o tumor de acordo com protocolo do HCPA:

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

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

#### ***Gradação Histopatológica:***

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

#### ***Análise Estatística:***

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

A exposição ao fumo foi calculada de maneira combinada para os pacientes fumantes atuais e ex-fumantes. O nível de exposição ao fumo foi calculado por meio da multiplicação do número de maços de cigarros consumidos por dia pelo número de anos de hábito ( $n^\circ$  maços/dia X  $n^\circ$  anos de hábito X 365 dias). A exposição ao fumo foi categorizada de acordo com tertil de cigarros-ano em: pacientes que nunca fumaram (0 cigarros-ano), nível 1 (1-8887 cigarros-ano), nível 2 (8888-18250 cigarros-ano) e nível 3 (> 18.250 cigarros-ano).

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

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

## RESULTADOS

A média de idade dos pacientes foi de 57,6 anos sendo a maioria dos indivíduos homens (80,8%), brancos (83,3%), fumantes atuais ou ex-fumantes (94,8%) e com história de consumo moderado ou severo de bebidas alcólicas (82%). Outras características comuns aos pacientes avaliados foram o baixo nível sócio

econômico (56,4%), poucos anos de estudo (80,8%) e mais de 1 ano sem consulta odontológica (66,7%). O tratamento mais freqüente para o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço foi a intervenção cirúrgica associada ou não à radioterapia (83,6%). Outras informações referentes aos pacientes incluídos no estudo estão descritas na tabela 1.

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

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

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

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

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

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

\*Apenas indivíduos com dentes

Tabela 3. Características clínicas e histopatológicas dos tumores.

Variável	n	%
Tamanho		
T1	22	28.2
T2	25	32
T3	14	17.9
T4	17	21.8
Metástase regional		
N0	46	59
N1	20	27
N2	7	9
N3	5	6.4
Metástase		
M0	78	100
M1	0	0
Localização		
Língua	21	26.9
Assoalho	10	12.8
Lábio	10	12.8
Palato	11	14.1
Mucosal jugal	5	6.4
Pescoço	21	27
Gradação histopatológica		
Não graduados		
In situ	5	6.4
2	8	10.2
3	18	23.1
4	27	34.6
Sem Informação	8	10.2
<b>Total</b>	<b>78</b>	<b>100.0</b>

## DISCUSSÃO

A incidência do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) está decrescendo ao longo dos últimos anos<sup>4</sup>, entretanto ainda representa o sexto tipo de câncer mais comum no mundo.<sup>6</sup> O CECP é uma lesão mais comumente encontrada em

indivíduos do sexo masculino, acima dos 50 anos de idade. As características clínicas dos pacientes avaliados neste estudo foram semelhantes ao perfil relatado na literatura.<sup>4,6,19</sup> No presente estudo, os indivíduos mais acometidos pela neoplasia além do fato de serem homens, com média de idade de 57,6 anos, eram de cor de pele branca. A predominância de indivíduos de pele clara neste estudo é devido ao fato da pesquisa ter sido realizada em um centro de referência do sul do Brasil, onde a população é predominantemente branca.

No presente estudo, a maior parte dos pacientes avaliados apresentou exposição moderada e severa para fumo (68%) e álcool (82%), evidenciando a relação entre o câncer de boca e o consumo combinado destes dois fatores. Apesar de haver um declínio na prevalência do tabagismo na população adulta brasileira <sup>23</sup>, 94,8% dos pacientes avaliados neste estudo eram fumantes ou ex-fumantes. Este declínio do hábito de fumar ainda não apresentou um reflexo na incidência do CECP, o que talvez seja observado nas próximas décadas.

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

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

As modalidades de tratamento para o CECP são a cirurgia, radioterapia e quimioterapia com avanços significativos em todas estas modalidades.<sup>13</sup> Entretanto, a ressecção cirúrgica é a terapia mais indicada para o tratamento definitivo. A combinação de cirurgia com radioterapia apresenta melhora nas taxas de sobrevivência em 5 anos.<sup>1,17</sup> No presente estudo, o tratamento mais freqüente foi a intervenção cirúrgica associada ou não à radioterapia (83,6%) conforme preconizado

pela literatura. O acompanhamento dos pacientes em 18 meses mostrou que 69,3% estavam livres de doença, demonstrando ser esta a melhor indicação terapêutica para o CECP.

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

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

Segundo a literatura, a graduação histopatológica determina o comportamento tumoral que irá refletir no prognóstico dos pacientes, uma vez que tumores indiferenciados apresentam maior índice de recidiva e desenvolvimento de metástases.<sup>21</sup> A maioria dos casos avaliados neste estudo apresentaram classificação histopatológica nos graus 3 e 4 (66,4%), entretanto 69,2% estão livres de doença após 18 meses. Isto demonstra que a população celular é heterogênea e o comportamento do tumor não pode ser determinado somente por um ou outro parâmetro isoladamente e sim pelo somatório destes.

Em geral, o diagnóstico do CECP é realizado em estágios tardios, quando os tumores apresentam dimensões maiores e conseqüentemente presença de metástases regionais, determinado um prognóstico ruim para os pacientes.<sup>4,6,17</sup>

Entretanto, no presente estudo, 60,2% dos casos foram classificados como T1 e T2 e 59% sem metástases cervicais. Estes dados podem ser explicados por alguns fatores, tais como: melhora no treinamento dos profissionais de saúde para o diagnóstico destas lesões; instrução do auto-exame em campanhas de prevenção de câncer de boca; e melhor acesso à serviços de referência em saúde.

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

#### AGRADECIMENTOS

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

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Silver HJ, Guimaraes CCG, Pedruzzi P et al. Predictors of functional decline in locally advanced head and neck cancer patients from south Brazil. *Head Neck* 2010; 32:1217-1225.
2. Cancela MC, Voti L, Guerra-Yi M, Chapuis F, Mazuir M, Curado MP. Oral cavity cancer in developed and in developing countries: population-based incidence. *Head Neck* 2010; 32: 357-367.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer – Rio de Janeiro: INCA, 2009.
4. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2011; 61: 69-90.
5. World Health Organization, Globocan. Acesso em Julho 2011: <http://www-dep.iarc.fr/WHODb/WHODb.htm>
6. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009; 45: 309-16.
7. Squier CA, Kremer MJ, Wertz PW. Effect of ethanol on lipid metabolism and epithelial permeability barrier of skin and oral mucosa in the rat. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 595-599.

8. Szyman´ska K, Hung RJ, Wunsch-Filho V et al. Alcohol and tobacco, and the risk of cancers of the upper aerodigestive tract in Latin America: a case-control study. *Cancer Causes Control* 2011; 22: 1037-1046.
9. Wunsch-Filho VW. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol* 2002; 38: 737-746.
10. Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis* 2001; 7: 349-354.
11. Boing AF, Antunes JL, de Carvalho MB, de Góis Filho JF, Kowalski LP, Michaluart P Jr. How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk? *J Epidemiol Community Health* 2011; 65:709-714.
12. Guha N, Boffetta P, Wünsch Filho V et al. Oral health and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck and esophagus: results of two multicentric case-control studies. *Am J Epidemiol* 2007; 166: 1159-1173.
13. Rapidis AD, Gullane P, Langdon JD, Lefebvre JL, Scully C, Shah JP. Major advances in the knowledge and understanding of the epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis, management and prognosis of oral cancer. *Oral Oncol* 2009; 45: 299-300.
14. Edge SB, Compton CC. The AJCC the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *An Surg Oncol* 2010; 17: 1471-1474.
15. van der Schroeff MP, Jong RJB. Staging and prognosis in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2009; 45: 356-360.
16. Takes RP, Rinaldo A, Silver CE et al. Future of the TNM classification and staging system in head and neck cancer. *Head Neck* 2010; 32: 1693-1711.
17. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell cancer overview. *Oral Oncol* 2009; 45: 301-308.
18. Araújo Júnior RF, Barboza CAG, Clebis NK, Moura SAB, Costa ALL. Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical classification in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13: E344-E347.

19. Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol* 2010; 20: 2-9.
20. WHO. Caries prevalence: DMFT and DMFS. Acesso em Julho 2011: <http://www.whocollab.od.mah.se/expl/orhdmft.html>.
21. Bryne M, Koppang H, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 432-437.
22. Associação Brasileira de Empresas de pesquisa (ABEP). Critério de classificação econômica Brasil. Acesso em Julho 2011: <http://www.abep.org/novo/ContentID=302>.
23. Monteiro CA, Cavalcante TM, Moura EC, Claro RM, Szwarcwald CL. Population-based evidence of a strong decline in the prevalence of smokers in Brazil (1989–2003). *Bull World Health Organ* 2007; 85: 527–534.
24. Conway DI, Petticrew M, Marlborough H, Berthiller J, Hashibe M, Macpherson LM. Socioeconomic inequalities and oral cancer risk: a systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Int J Cancer* 2008; 122: 2811–2819.
25. Holmes Jr L, des Vignes-Kendrick M, Slomka J, Mahabir S, Beeravolu S, Emani SR. Is dental care utilization associated with oral cavity cancer in a large sample of community-based United States residents? *Community Dent Oral Epidemiol* 2009; 37: 134–142.
26. Brasil. Ministério da Saúde. SB Brasil 2010. Pesquisa Nacional de Saúde Bucal. Acesso em Julho 2011: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacaonova\\_281210.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/apresentacaonova_281210.pdf)
27. Susin C, Oppermann RV, Haugejorden O, Albandar JM. Tooth loss and associated risk indicators in an adult urban population from south Brazil. *Acta Odontologica Scandinavica*, 2005; 63: 85–93.

## ARTIGO 2

---

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

## **ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO DE CD44 E ALDH1 E DAS CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE EPITÉLIOS ADJACENTES A CARCINOMAS ESPINOCELULARES DE CABEÇA E PESCOÇO**

**Ana Luísa Homem de Carvalho<sup>1</sup>; Laura Campos Hildebrand<sup>1</sup>; Isabel da Silva Lauxen<sup>1</sup>; Jacques Eduardo Nör<sup>2</sup>; Manoel Sant'Ana Filho<sup>1</sup>.**

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

2. Angiogenesis Laboratory Research, Universidade de Michigan, USA

**RESUMO:** Foram estudados os aspectos morfológicos e imunomarcção de CD44 e ALDH1 de 47 epitélios adjacentes a carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (CECP) e os resultados comparados aos tumores correspondentes. A morfologia do epitélio foi caracterizada em epitélio morfológicamente inalterado, hiperplasia epitelial, acantose, hiperqueratose e displasia epitelial. Foram também avaliados aspectos clínicos tumorais (TNM) e graduação histopatológica segundo Bryne,1992. Houve correlação direta entre as imunomarcações de CD44 entre tumor e epitélio ( $p \leq 0,018$ ) e de ALDH1 ( $p \leq 0,002$ ). Tumores classificados com graus 3 e 4 mostraram imunomarcção positiva para o ALDH1 nos epitélios adjacentes (67%), independente da morfologia. Correlação inversa foi encontrada entre imunomarcção de CD44 no epitélio adjacente e metástases nodais (N) ( $p \leq 0,025$ ).

A imunomarcção positiva de ALDH1 no epitélio adjacente aos tumores classificados como grau 3 e 4 pode ser um indicador de agressividade do tecido adjacente independente de sua morfologia. A correlação direta entre imunomarcção de CD44 entre epitélio e tumor poderia evidenciar alterações epiteliais semelhantes às encontradas no CECB. A presença de metástases regionais (N) foi correlacionada a imunomarcção negativa de CD44 nos epitélios adjacentes, evidenciando a perda de CD44 como um evento inicial da carcinogênese.

**Palavras-chave:** carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço; epitélio adjacente ao tumor; CD44; ALDH1.

### **INTRODUÇÃO**

Carcinomas de cabeça e pescoço são o sexto tipo de câncer mais freqüente e 95% destes tumores são do tipo espinocelulares<sup>1</sup>. No Brasil, para o ano de 2010, a

estimativa do Instituto Nacional do Câncer (INCA) é de 14.120 novos casos sendo 10.330 em homens e 3.790 em mulheres <sup>2</sup>.

A etiologia dos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (CECP) é multifatorial e é determinada por processos que variam da escala molecular até a ambiental. <sup>3</sup> A taxa de sobrevida em cinco anos para esta neoplasia varia entre 50% e 60% e, apesar dos avanços no tratamento não houve modificação desta taxa nos últimos 30 anos. <sup>4,5,6</sup>

Um importante aspecto para a baixa sobrevida é o desenvolvimento de segundos tumores primários (SPTs) aqueles que se desenvolvem usualmente a mais de 2 centímetros do tumor primário em um período superior há 3 anos e de recorrências locais (LRs), assim denominadas quando se desenvolvem a menos de 2 centímetros do tumor inicial num período inferior há 3 anos. Mesmo com margens livres de tumor após a cirurgia, o desenvolvimento de SPTs e LRs varia de 2% a 10% ao ano. <sup>7,8</sup>

Estes eventos não ocorrem de maneira independente considerando que os tumores apresentam a mesma origem clonal. <sup>9,10</sup> Podem ser explicados pela existência de um campo “pré-neoplásico” chamado de campo de cancerização, descrito primeiramente por Slaughter em 1957 <sup>11</sup> em um estudo com 783 biópsias de carcinomas espinocelulares de boca, onde encontrou alterações morfológicas no tecido que circunda o tumor e concluiu que o campo de cancerização também sofre ação dos agentes carcinogênicos sendo responsável pelo aparecimento de novos tumores e de recorrências locais.

As alterações morfológicas não são obrigatórias e muitas vezes tecidos morfológicamente inalterados já apresentam alterações genéticas semelhantes às tumorais. <sup>12</sup> Em função disto, o epitélio adjacente não pode ser ignorado uma vez que sua análise é um importante instrumento para a prevenção de recorrências, de novos tumores e para o diagnóstico.

As células malignas apresentam uma hierarquia de desenvolvimento e recentemente foram descritas células com características de células tronco mesenquimais dentre a população tumoral que têm como característica a capacidade de auto-renovação. <sup>13-14</sup> Tais células seriam as responsáveis pelo crescimento, recorrências e metástases de tumores malignos e foram identificadas em CECP pela

imunomarcção do CD44 que é uma molécula de adesão celular relacionada com a progressão de alguns tumores e identificada como um marcador destas células em tumores epiteliais e da enzima aldeido desidrogenase 1 (ALDH1), recentemente identificada em células com características de células tronco mesenquimais em CECP.  
15-16-17-18-19-20-21-22

O objetivo deste estudo foi avaliar os aspectos morfológicos assim como a imunomarcção de CD44s e ALDH1 em 47 epitélios adjacentes a carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço e compará-los com os tumores correspondentes.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Obtenção da amostra

Foram coletadas amostras de 47 tumores primários e epitélios adjacentes a estes tumores (não neoplásicos) de pacientes com diagnóstico de CECP. Todos os pacientes foram submetidos a tratamento no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil no período de outubro de 2009 a outubro de 2010. Além do tratamento cirúrgico, alguns pacientes foram submetidos a tratamentos adjuvantes (radioterapia, quimioterapia) de acordo com o protocolo do referido hospital. Os dados clínicos (TNM) relacionados ao tumor foram obtidos por meio de registro dos prontuários. Todos os pacientes assinaram o consentimento livre e esclarecido aprovado pelo comitê de ética e pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GP 09-315).

### 2. Morfologia do Epitélio e Gradação Histopatológica

A gradação histopatológica dos tumores e a análise da morfologia do epitélio adjacente foram realizadas por dois patologistas (AC e LH) em lâminas coradas por hematoxilina-eosina (HE) em um microscópio óptico em um aumento de 400x. A gradação dos tumores foi realizada segundo os critérios de Bryne (1992) <sup>23</sup> em graus de 2 a 4. A morfologia do tecido epitelial foi classificada em: epitélio morfológicamente inalterado, hiperplasia epitelial, acantose, hiperqueratose e displasia epitelial.

### 3. Imunoistoquímica

Foram obtidos cortes de 3µm de cada bloco de parafina previamente selecionados que incluísse área de epitélio não neoplásico e de tumor. A técnica de

imunoistoquímica para ambos os marcadores foi realizada segundo protocolo do Angiogenesis Research Laboratory da Faculdade de Odontologia da Universidade de Michigan.

Para os dois anticorpos, a recuperação antigênica foi desenvolvida com a Dako retrieval solution citrate pH 6.0 (Dako, Carpinteria, CA, USA) em banho-maria, a 95°C, por 40 minutos. Foi utilizado o anticorpo anti-CD44s (clone EPR1013Y, coelho, Abcam, Washington D.C., USA) na concentração de 1:100 e o anticorpo anti-ALDH1 (clone 44, camundongo, BD Transduction Laboratories, Franklin Lakes, NJ, USA) na concentração de 1:50. Para o controle negativo utilizou-se soro não imune da mesma espécie animal de desenvolvimento do anticorpo primário. O sistema de detecção empregado foi o Mach 3™ para anti-corpo primário de camundongo ou coelho, marcado com *Horseradish peroxidase* (Biocare Medical, Concord, CA, USA). Como cromógeno foi utilizada a diaminobenzidina (DAB). As laminas foram contra-coradas com hematoxilina de Mayer e montadas.

Tanto para os tumores quanto para os epitélios, foram consideradas positivas para CD44 as células que apresentaram coloração marrom nas membranas celulares independente da intensidade (figuras 1C e 2C). Para o ALDH1, foram consideradas positivas (ALDH+) células que apresentaram coloração marrom no citoplasma também independente da intensidade tanto nos tumores quanto nos epitélios (figuras 1A e 2A).

#### **4. Quantificação da Imunoistoquímica**

##### **CD44 e ALDH1 no tumor:**

A quantificação tanto para ALDH1 quanto para CD44 foi realizada na zona de invasão tumoral previamente selecionada e dividida em dois grupos de acordo com os seguintes escores: escore 1: sem imunomarcção (CD44- e ALDH1-) correspondendo a menos de 5% das células marcadas (figuras 1A e 1D); escore 2: imunomarcção positiva (CD44+ e ALDH1+) mais de 5% das células marcadas (figura 2B e 2C..).

##### **CD44 e ALDH1 no epitélio:**

A quantificação foi realizada em toda a extensão do tecido e foram utilizados os mesmos escores acima descritos. Foi considerada CD44+ em epitélios

morfologicamente inalterados marcação na membrana das células das camadas basal e parabasal sem expressão nas camadas superficiais. <sup>24</sup> (figura 2C)

## RESULTADOS

Dos 47 tumores analisados, 31 casos (65,9%) localizavam-se na boca e 16 (34%) em pescoço. Na boca, o sítio mais acometido foi a língua (09 casos) seguido do lábio inferior (07 casos), assoalho (06 casos), palato (05 casos) e mucosa jugal (04 casos).

Metástases nodais (N+) foram observadas em 14 casos (29,8%) e a ausência destas (N0) em 33 casos (70,2%). Quanto ao tamanho dos tumores (T), 32 classificaram-se como T1 e T2 (68,1%) e 15 como T3 e T4 (31,9%), de acordo com a classificação da American Joint Comitee. <sup>25</sup> Quanto á graduação histopatológica, 5 tumores foram classificados com grau 2 (10,6%), 40 com graus 3 e 4 (85,1%) e 2 como carcinoma in situ (4,2%).

De acordo com a morfologia dos epitélios adjacentes, 5 casos (10,6%) foram classificados como epitélio morfologicamente inalterado, 15 (32%) como hiperplasia epitelial, 14 (30%) como hiperkeratose, 2 (4,2%) como acantose e 9 (19,1%) como displasia epitelial. Dados clínicos, aspectos morfológicos tumorais e do epitélio adjacente podem ser observados na tabela 1.

**Tabela 1:** Características clínicas e morfológicas de 47 tumores e epitélios adjacentes.

	N	%
--	---	---

<b>Localização</b>		
<i>Pescoço</i>	16	34%
<i>Boca</i>	31	65,9%
<i>Língua</i>	09	29%
<i>Lábio inferior</i>	07	22,5%
<i>Assoalho</i>	06	19,3%
<i>Palato</i>	05	16,1%
<i>Mucosa Jugal</i>	04	12,9%
<b>Tamanho do Tumor</b>		
<i>T1-T2</i>	32	68,1%
<i>T3-T4</i>	15	31,9%
<b>Presença de metástase nodais</b>		
<i>N0</i>	33	70,2%
<i>N+</i>	14	29,8%
<b>Classificação Morfológica do Epitélio</b>		
<i>Epitélio morfológicamente inalterado</i>	07	14,8
<i>Hiperplasia Epitelial</i>	15	31,9
<i>Acantose</i>	02	4,2
<i>Hiperceratose</i>	14	29,7
<i>Displasia</i>	09	19,1
<b>Gradação Histopatológica do Tumor</b>		
<i>Grau 2</i>	05	10,6%
<i>Graus 3 e 4</i>	40	85,1%
<i>Carcinoma in situ</i>	02	4,2%
<b>Total</b>	<b>47</b>	<b>100.0</b>

#### **ALDH1 e CD44 no tumor:**

Quanto á imunomarcção de ALDH1, 24 casos (51,1%) foram classificados como ALDH1- e 23 casos (48,9%) foram classificados como ALDH1+. Nos tumores classificados com graus 3 e 4, observou-se ALDH1+ em 21 casos (52,5%) e ALDH- em 19 casos (47,5%).

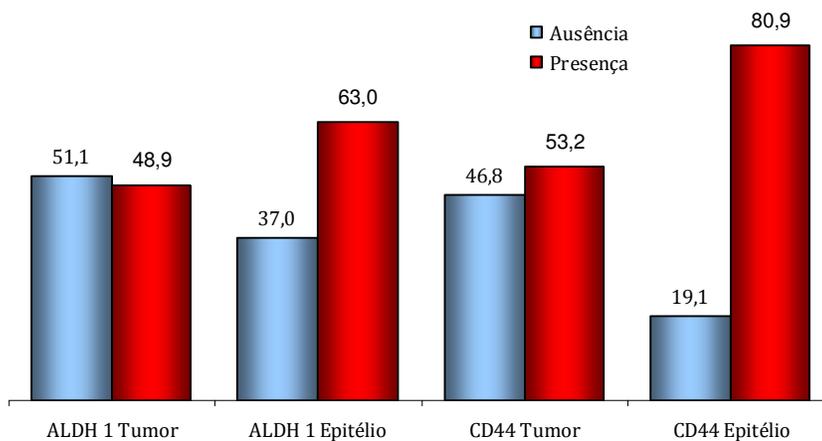
A imunomarcção de CD44 mostrou-se negativa em 22 casos (46,8%) e positiva em 25 casos (53,1%). Nos tumores mais indiferenciados (graus 3 e 4), CD44+ foi evidenciado em 33 casos (82,5%) e CD44- em 07 casos (17,5%).

#### **ALDH1 e CD44 no epitélio:**

Nos epitélios adjacentes, 17 casos (37%) apresentaram ALDH1- e 30 casos (63%) ALDH1+. A imunomarcção de ALDH1 nos epitélios correspondentes aos tumores classificados com graus 3 e 4 foi positiva em 27 casos (67,5%). Quanto ao CD44, 9 casos (19,1%) classificaram-se como CD44- e 38 (80,9%) como CD44+. Nos tumores graduados como 3 e 4, CD44+ foi evidenciado em 32 casos (80%) e CD44- em 8 casos (20%).

Os dados pertinentes a presença e a ausência de CD44 e ALDH1 nos tumores e nos epitélios podem ser observados gráfico 1.

**Gráfico 1.** Distribuição dos 47 casos de acordo com CD44-/ALDH1- e CD44+/ALDH1+



Os aspectos morfológicos do tecido epitelial (morfológicamente inalterado, hiperplasia epitelial, acantose, hiperqueratose e displasia epitelial) e as imunomarcções correspondentes a cada aspecto podem ser evidenciadas na tabela 2.

**Tabela 2:** Classificação morfológica do epitélio de acordo com a presença e ausência de ALDH1 e CD44.

<i>Variável</i>	<i>Ausência</i>		<i>Presença</i>		n
	CD44-	ALDH1-	CD44+	ALDH+	
Epitélio morfológicamente inalterado	01	02	06	05	07
Hiperplasia epitelial	01	08	14	07	15
Hiperkeratose	06	05	08	09	14
Acantose	0	0	02	02	02
Displasia	01	06	08	03	09

Os dados foram analisados através de tabelas, gráficos e estatísticas descritivas. Para a verificação de correlação significativa entre os escores das variáveis utilizou-se a análise de correlação de Spearman. Os resultados da análise de correlação podem ser observados na tabela 3. Através dos resultados desta análise de correlação verificou-se que as correlações que apresentaram resultados significativos foram: CD44 tumor X CD44 epitélio ( $r_s=0,343;p=0,018$ ) e ALDH1 epitélio X ALDH1 tumor ( $r_s=0,438;p=0,002$ ): correlação direta significativa, ou seja, quanto maior o escore tanto de CD44 quanto de ALDH1 no tumor, maior tende a ser o escore de CD44 no epitélio adjacente ( $r_s=0,343;p=0,018$ ) e vice-versa; CD44 epitélio X N ( $r_s=-0,326;p=0,025$ ): correlação inversa significativa, ou seja, quanto maior os escore de CD44 no epitélio, menor tende a ser o escore de metástases nodais (N).

Para o teste acima citado o nível de significância máximo assumido foi de 5% ( $p\leq 0,05$ ) e o software utilizado para a análise estatística foi o SPSS versão 10.0.

**Tabela 3.** Correlação entre as variáveis CD44 e ALDH1 em tumores e nos epitélios adjacentes

<i>Correlação</i>	<i>Coefficiente de Correlação de Spearman</i>	
	<i>r<sub>s</sub></i>	<i>p</i>
CD44 tumor X CD44 epitélio	0,343	0,018*
CD44 epitélio X morfologia do epitélio	-0,265	0,072 (ns)
CD44 epitélio X N	-0,326	0,025*
CD44 epitélio X ALDH1 epitélio	-0,150	0,319 (ns)
ALDH1 epitélio X ALDH1 tumor	0,438	0,002**
ALDH1 epitélio X N	0,146	0,332 (ns)
ALDH1 epitélio X CD44 epitélio	-0,150	0,319 (ns)
CD44 epitélio X T	-0,214	0,148 (ns)

(ns) = não significativo; \* significativo  $p \leq 0,05$ ; \*\* significativo  $p \leq 0,01$

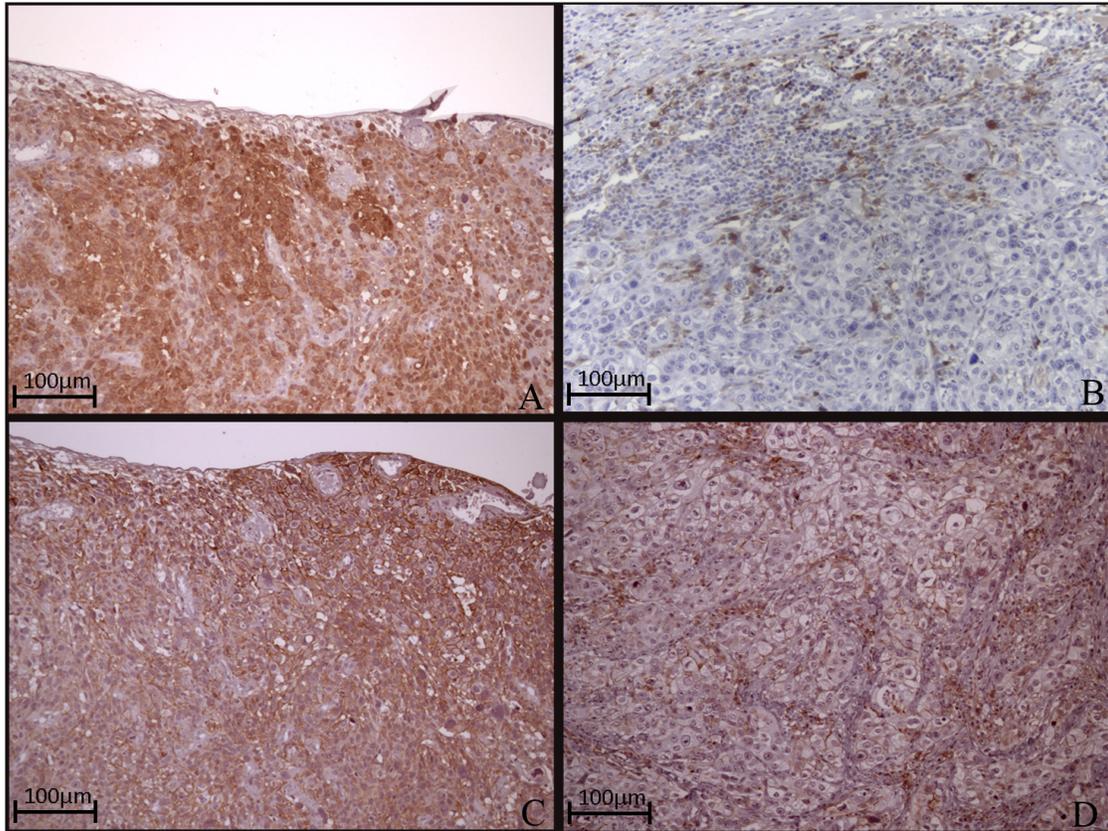


Figura 1: Imunomarcção de ALDH1 e CD44 em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço 1A: Imunomarcção positiva-ALDH1+; 1B:Imunomarcção negativa- ALDH1-; 1C: Imunomarcção positiva-CD44+; 1D: Imunomarcção negativa- CD44-. Aumento de 20x

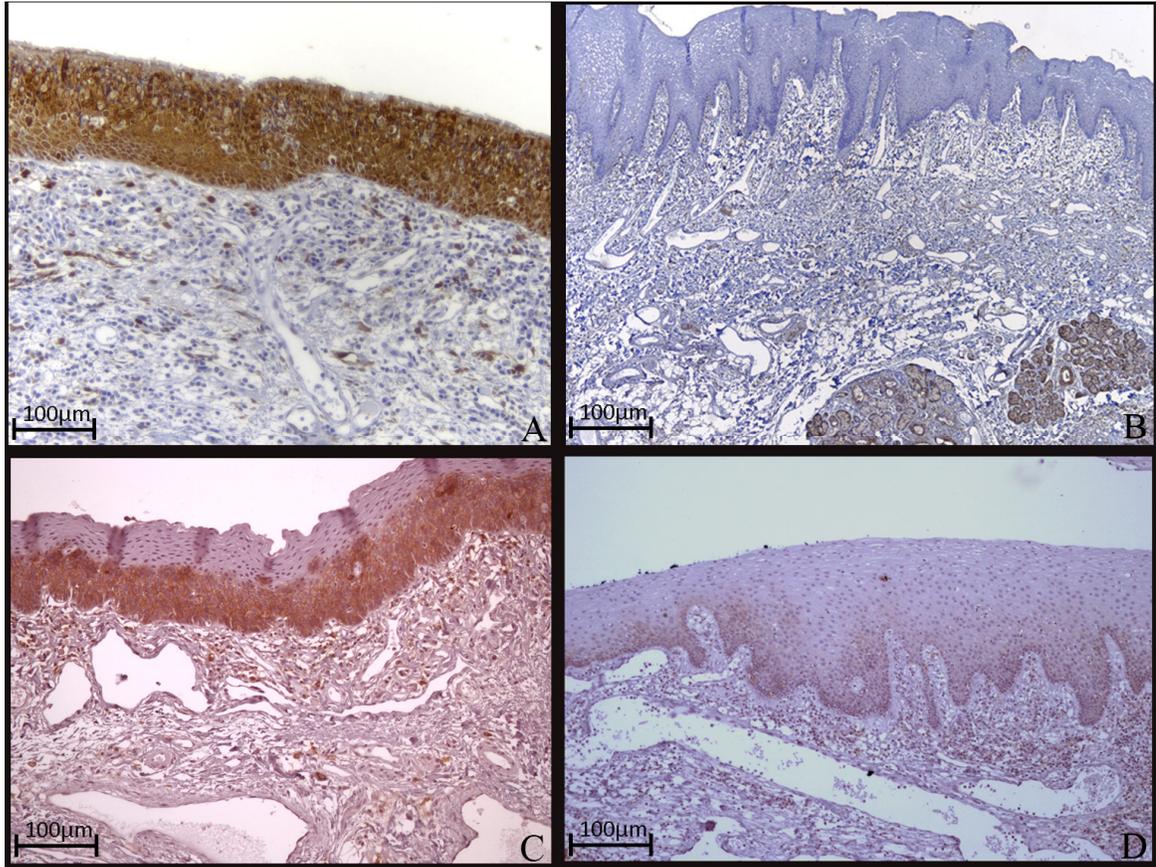


Figura 2: Imunomarcção de ALDH1 e CD44 em epitélios adjacentes a carcinomas de cabeça e pescoço. 1A: Imunomarcção positiva-ALDH1+; 1B:Imunomarcção negativa- ALDH1-; 1C: Imunomarcção positiva-CD44+; 1D: Imunomarcção negativa- CD44-. Aumento de 20x

## DISCUSSÃO

A identificação de possíveis fatores prognósticos em CECP tem sido buscada em diversos estudos com moléculas envolvidas na progressão tumoral. Alterações morfológicas e moleculares no epitélio adjacente a estes tumores podem ser consideradas como evento inicial da carcinogênese na qual há um descontrole tanto na adesão quanto na proliferação celular.<sup>26</sup>

Slaughter<sup>11</sup> foi o primeiro a evidenciar a existência do campo de cancerização. Diversos autores concordam que o tecido localizado próximo ao tumor, também exposto a carcinógenos, seria o responsável pelo aparecimento de novos tumores e recorrências, principais aspectos para um prognóstico desfavorável. Estudar o campo de cancerização representa a real preocupação com a sobrevida, uma vez que ele é o responsável pelas recorrências e, por isto, deveria ser tão estudado quanto os tumores. Talvez a dificuldade metodológica na obtenção do tecido sadio durante o procedimento cirúrgico explique a escassez de estudos.

Nos epitélios adjacentes coletados neste estudo, observou-se ALDH1+ em 63% dos casos. Segundo Ginestier et al. e<sup>27</sup> Deng et al.<sup>28</sup> células ALDH1+ podem ser consideradas células com características de células tronco em tecidos nos quais sua imunomarcagem é baixa, o que difere do encontrado. A evidenciação de ALDH1+ nos tumores também foi considerada alta, uma vez que 48,9% dos casos foram positivos. Tal afirmação vai ao encontro aos nossos achados que encontraram em 5 dos 7 casos de epitélio morfológicamente inalterado ALDH1+.

Houve correlação positiva entre ALDH1+ nos epitélios e nos tumores correspondentes, ou seja: se ALDH1+ no epitélio, ALDH1+ também no tumor. Isto mostra a semelhança de comportamento entre o tumor e o tecido adjacente o que mais uma vez evidencia que existem alterações neste tecido. Nos 40 tumores classificados com graus 3 e 4 (85%), houve predomínio de ALDH+ nos epitélios adjacentes, observado em 27 casos (67,5%). Tal achado pode sugerir que ALDH1+ no epitélio adjacente estaria relacionada com a indiferenciação do tumor correspondente, relacionando a presença do ALDH1 com uma maior agressividade tumoral podendo este marcador no epitélio adjacente ser um indicador de possíveis recidivas.

Quando se analisou a imunomarcção de ALDH1 e a morfologia do epitélio, a imunomarcção distribuiu-se de maneira aleatória (tabela 2). ALDH1+ foi evidenciada tanto em epitélios morfologicamente inalterados como nos distúrbios (ex: displasia), mostrando que ALDH1+ não refletiu na mudança da arquitetura do epitélio. O fato de existir ALDH1+ em epitélios não tão agressivos indica que eles podem apresentar alterações que os levariam á malignidade

A imunomarcção do CD44+ em um epitélio morfologicamente inalterado se dá nas camadas basal e suprabasal não sendo evidenciada nas camadas mais superficiais.<sup>27-29-30</sup> Tal informação concorda com os nossos achados que mostraram CD44+ (80,9%) nas camadas basal e suprabasal e CD44- nas camadas mais superficiais do epitélio, indicando que o CD44 vai sendo perdido á medida que o epitélio segue seu processo fisiológico de descamação no qual a adesão célula-célula vai sendo perdida.

De acordo com a tabela 2, 8 dos 9 casos de displasias epiteliais apresentaram CD44+ uma vez que esta imunomarcção foi evidenciada nas camadas mais superficiais. A presença de CD44 estimula motilidade e proliferação celular e sua presença nas camadas mais superficiais contraria o processo fisiológico de maturação epitelial. A associação entre a morfologia epitelial displásica e imunomarcção de CD44 nas camadas mais superficiais do epitélio podem ser um instrumento preditivo na maior risco para a malignidade nas lesões morfologicamente não displásicas. A imunomarcção também se apresentou mais irregular o que já foi relatado na literatura.<sup>21</sup> Por esta razão, o epitélio adjacente não pode ser considerado como controle positivo em estudos sem que as alterações morfológicas sejam consideradas.

24

Houve correlação direta entre imunomarcção positiva de CD44 nos tumores e epitélios podendo-se sugerir que o epitélio adjacente apresenta alterações já presentes no tumor indicando comportamento similar entre epitélio e neoplasia, facilitando o desenvolvimento de recorrências.

Em nosso estudo 19,1% dos epitélios adjacentes apresentaram CD44-, o que também foi correlacionado aos tumores. Alguns estudos associam CD44- com mau prognóstico de CECP.<sup>20-31</sup> Bánkalfi et al.<sup>21</sup> em um estudo com 92 casos de carcinoma espinocelular de língua, encontrou CD44- em metástases regionais (N) quando

comparadas ao tumor primário, evidenciando a relação de CD44 com a agressividade tumoral. O CD44 estabiliza sua conexão com a matriz extracelular pela ligação com o ácido hialurônico e a perda desta ligação faz com que a célula se solte e ganhe motilidade <sup>13</sup>. Tal aspecto explicaria a correlação inversa entre metástases regionais e CD44.

Nossos achados vão ao encontro a afirmação acima quando encontramos também correlação inversa entre a presença de metástases regionais (N) e CD44- nos epitélios adjacentes ao CECP. Conforme dito anteriormente, a presença de metástases regionais indica que houve destacamento das células com perda das propriedades adesivas, acarretando em um curso clínico desfavorável.

A perda de CD44 no epitélio que dará origem ao tumor poderia indicar tumores mais agressivos, uma vez que produziram mais metástases regionais (N). Como já dito anteriormente, a progressão tumoral depende da perda da função do CD44, indicando uma baixa capacidade de ancoragem das células com a matriz extracelular. Isto poderia explicar a relação inversa entre imunomarcção negativa de CD44 e potencial metastático dos tumores, o que também foi evidenciado por González-Moles et al. em seu estudo com 32 epitélios adjacentes a carcinomas espinocelulares de língua. A imunomarcção de CD44 no epitélio correlacionou-se a do tumor mostrando que o comportamento do epitélio adjacente reflete o comportamento tumoral o que concorda com nossos achados.

A presença de metástases regionais (N) é um dado crucial na diminuição da sobrevida e sua presença faz com que esta diminua de 55% para 30%. <sup>31</sup> A imunomarcção de CD44 no epitélio adjacente ao tumor é um indicativo de melhor ou pior curso de doença, possibilitando também um melhor controle do paciente durante o acompanhamento.

Alterações tanto na molécula de adesão CD44 quanto na ALDH1 em epitélios adjacentes a CECP podem refletir no comportamento tumoral. Tais alterações precedem às morfológicas e devem ser comparadas com as características clínicas e morfológicas tumorais. O estudo do epitélio adjacente pode contribuir na prevenção de recorrências, de segundos tumores primários e de metástases e estratégias para o monitoramento deste tecido devem ser estudadas.

## AGRADECIMENTOS:

Aos Serviços de Otorrinolaringologia e Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, RS, Brasil, ao Laboratório JJ Barbachan da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e ao Angiogenesis Laboratory Research da Universidade de Michigan, EUA.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

1. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer  
*Oral Oncology* 2009;45: 309–16
2. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil, Instituto Nacional de Câncer, Ministério da Saúde, <http://www.inca.gov.br>. Acessado em julho de 2011.
3. Grizzi F, Di Ieva A, Russo C, Frezza EE, Cobos E, Muzzio PC, Chiriva-Internati M. Cancer initiation and progression: an unsimplifiable complexity. *Theor Biol Med Model* 2006; 17: 3-37
4. Tabor MP, Brakenhoff RH, Ruijter-Schippers HJ, van der Wal JE, Snow GB; Leemans RC, Braakhuis JM. Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion. *Am J Pathol* 2002;161(3):1051-60
5. Kokko LL, Hurme S, Maula SM, Alanen K, Grénman R, Kinnunen I, Ventelä S. Significance of site-specific prognosis of cancer stem cell marker CD44 in head and neck squamous-cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011;47(6):510-16
6. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, van der Waal I, Snow GB. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer*. 1994;73(1):187-90
7. colocar SPT!
8. Braakhuis BJM, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck* 2002; 24:198–06.
9. Fialkow PJ. Clonal origin of human tumors. *Biochim Biophys Acta*. 1976 12; 458(3):283-21

10. Califano J, Westra WH, Meininger G, Corio R, Koch WM, Sidransky D. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. *Clin Cancer Res.* 2000 6(2):347-52
11. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer.* 1953 6(5):963-68
12. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, Corio R, Lee D, Greenberg B, Koch W, Sidransky D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996 56(11):2488-92
13. Okamoto A, Chikamatsu K, Sakakura K, Hatsushika K, Takahashi G, Masuyama K. Expansion and characterization of cancer stem-like cells in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2009 45(7):633-39
14. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 2007 104:973–78
15. Harper LJ; Piper K; Common J; Fortune F; Mackenzie IC. Stem cell patterns in cell lines derived from head and neck squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2007 36: 594–03
16. Oliveira LR; Oliveira-Costa JP; Araújo IM; Soave DF; Zanetti JS; Soares FA; Zucoloto S; Ribeiro-Silva A. Cancer stem cell immunophenotypes in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011 40: 135–42
17. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci* 2003 100:3983–88
18. Sayed SI, Dwivedi RC, Katna R, Garg A, Pathak KA, Nutting CM, Rhys-Evans P, Harrington KJ, Kazi R. Implications of understanding cancer stem cell (CSC) biology in head and neck squamous cell cancer. *Oral Oncol.* 2011 47(4):237-43
19. Joshua B, Kaplan MJ, Doweck I, Pai R, Weissman IL, Prince ME, Ailles LE. Frequency of cells expressing CD44, a Head and Neck cancer stem cell marker: Correlation with tumor aggressiveness. *Head Neck.* 2011 Feb 14.

20. Mostaan LV, Khorsandi MT, Sharifian SM, Shandiz FH, Mirashrafi F, Sabzari H, Badiie R, Borghei H, Yazdani N. Correlation between E-cadherin and CD44 adhesion molecules expression and cervical lymph node metastasis in oral tongue SCC: Predictive significance or not. *PatholResPract* 2011
21. Bánkfalvi A, Krassort M, Buchwalow IB, Végh A, Felszeghy E, Piffkó J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and beta-catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. *J Pathol.* 2002 198(3):343-51
22. Ma I, Allan AL. The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Rev.* 2011 7(2):292-06
23. Bryne M, Koppang H, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 432-437
24. González-Moles MA, Bravo M, Ruiz-Avila I, Esteban F, Bascones-Martínez A, González-Moles S. Adhesion molecule CD44 expression in non-tumour epithelium adjacent to tongue cancer. *Oral Oncol.* 2004 40(3):281-86
25. UICC
26. Georgolios A, Batistatou A, Charalabopoulos A, Manolopoulos L, Charalabopoulos K. The role of CD44 adhesion molecule in oral cavity cancer. *Exp Oncol.* 2006 28(2):94-8
27. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007 1(5):555-67
28. Deng S, Yang X, Lassus H, Liang S, Kaur S, Ye Q, Li C, Wang LP, Roby KF, Orsulic S, Connolly DC, Zhang Y, Montone K, Bützow R, Coukos G, Zhang L. Distinct expression levels and patterns of stem cell marker, aldehyde dehydrogenase isoform 1 (ALDH1), in human epithelial cancers. *Plos One.* 2010 21;5(4):e10277
29. Stoll C, Baretton G, Soost F, Terpe HJ, Domide P, Löhrs U. Prognostic importance of the expression of CD44 splice variants in oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 1999 35(5):484-89
30. Sato S, Miyauchi M, Takekoshi T, Zhao M, Kudo Y, Ogawa I, Kitagawa S, Fujita M, Takata T. Reduced expression of CD44 variant 9 is related to lymph node metastasis

and poor survival in squamous cell carcinoma of tongue. *Oral Oncol.* 2000 36(6):545-49

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

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

A presença do campo de cancerização em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço (CECP) pode dar origem a novos tumores e recorrências locais, aspectos responsáveis pela baixa sobrevida dos pacientes portadores desta neoplasia. A maioria da literatura referente ao CECP preocupa-se em estudar o comportamento tumoral e não do epitélio adjacente sendo que as características do tecido peritumoral podem refletir o comportamento desta neoplasia. A partir desta evidência, buscamos métodos de estudo para melhor evidenciar alterações prévias às morfológicas no campo de cancerização de CECP.

A população celular tumoral apresenta uma hierarquia de desenvolvimento e um pequeno percentual destas células é responsável pelo crescimento, recorrências e metástases tumorais. Estas células foram descritas como células com características de células tronco tumorais. A imunomarcagem da enzima aldeído desidrogenase (ALDH1) poderia identificar células com estas características em tumores sólidos. A identificação através da imunistoquímica da molécula de adesão CD44 tem sido bastante estudada em CECP e sua presença ou ausência estaria relacionada com a progressão tumoral.

A partir disto, obtivemos acesso a pacientes com diagnóstico primário de CECP dos quais foram identificados o perfil sócio demográfico, características clínicas tumorais e condições bucais. O perfil dos pacientes acometidos por esta neoplasia assemelha-se ao de outras populações. O diagnóstico do tumor foi realizado mais precocemente (tumores pequenos), o que difere da literatura que evidencia um diagnóstico tardio. Este achado evidencia uma melhora ao acesso a serviços de saúde assim como profissionais mais capacitados para realizar o diagnóstico do CECP.

Uma vez que as recorrências e os novos tumores desenvolvem-se a partir do tecido remanescente, é plausível pensar que este tecido se comporte de maneira semelhante ao tumor. A partir desta conclusão, pensamos em uma metodologia de estudo tanto para os tumores quanto para os epitélios adjacentes. Tivemos acesso aos pacientes com diagnóstico de CECP com indicação cirúrgica para remoção do tumor primário. Da peça, foram coletados 3 fragmentos sendo um do centro do tumor, um da zona de invasão e outro do tecido remanescente não tumoral. A coleta destes fragmentos foi realizada de maneira que não houvesse interferência no diagnóstico histopatológico. Foram realizadas imunomarcações de CD44 e ALDH1 em 47 epitélios peritumorais e estas características comparadas com as dos tumores correspondentes. A morfologia do epitélio adjacente foi classificada em epitélio morfologicamente inalterado, hiperplasia epitelial, acantose, hiperqueratose e displasia epitelial.

A imunomarcação positiva de ALDH1 nos epitélios adjacentes relacionou-se a tumores mais agressivos, uma vez que estes epitélios foram associados a CECP mais indiferenciados. A presença de ALDH1 no epitélio pode refletir o comportamento tumoral independente da sua morfologia estando relacionada com a indiferenciação tumoral.

Por ser uma molécula de adesão, a imunomarcação de CD44 no epitélio adjacente ao tumor é um indicativo de melhor ou pior curso de doença, possibilitando também um melhor controle do paciente durante o acompanhamento. Nossos achados concordaram com esta afirmação uma vez que encontramos correlação inversa entre presença metástases regionais (N) e imunomarcação de CD44 no epitélio adjacente, independente da morfologia relacionando a perda do CD44 com o início da carcinogênese. A presença de CD44+ nas camadas mais superficiais de um epitélio displásico pode ser um instrumento preditivo na maior risco para a malignidade nas lesões morfologicamente não displásicas.

Diversos estudos evidenciam a presença de células com características de células tronco tumoral em tumores sólidos utilizando tanto ALDH1 quanto CD44 como marcadores desta população. No entanto, em nosso estudo não podemos

concluir que a marcação imunoistoquímica de ALDH1 e CD44 evidenciou tais células sendo necessárias outras técnicas para que se possa fazer tal afirmação.

Novas perspectivas para o estudo deste tecido devem ser levadas em consideração durante o monitoramento dos pacientes. A busca por marcadores no campo de cancerização que evidenciem características que podem levar à malignidade antes do aparecimento das alterações morfológicas é um aspecto relevante na prevenção destes tumores.