

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

---

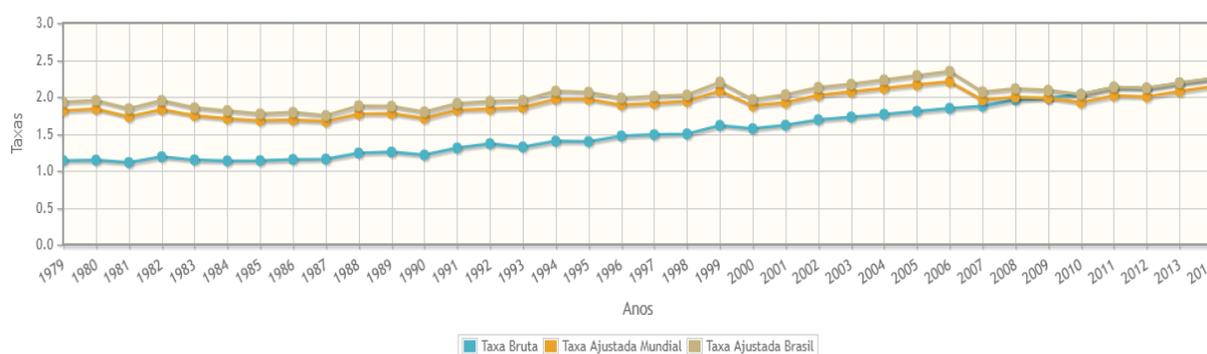
- 9-cis-RA – ácido 9 cis retinóico
- ALDH – aldeído desidrogenase
- ATRA – ácido trans-retinóico
- CEC – carcinoma espinocelular
- CECP – carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço
- CTT – células tronco tumorais
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- EMT – Transição epitélio-mesenquima
- EMT-TF – fatores 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

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

## 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 $\alpha$ -RAR $\alpha$*  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 $\alpha$*  sobre *RXR $\alpha$*  (KUROKAWA et al., 1994) não foi observado com *RAR $\beta$*  (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* $\beta$  e *RXR* $\alpha$  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- $\alpha$* ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) e receptores retinóides X (*RXR- $\alpha$* ,  $\beta$ ,  $\gamma$ )(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 $\beta$  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  $\alpha$  e  $\beta$ ) 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 $\alpha$ , RAR $\beta$ , RXR $\alpha$  e RXR $\beta$ ) 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;

## 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  $\beta$  is associated with inhibition of keratinization in human head and neck squamous carcinoma cells. **Differentiation**, [s. l.], v. 64, p. 123–132, 1999.