

# RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)  
autor(a), o texto completo desta  
dissertação será disponibilizado  
somente a partir  
de 13/03/2020.



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**“Júlio de Mesquita Filho”**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Maykon Kennedy Schulz Oliveira**

**Expressão de CD10, Vimentina, Ki-67 e Ciclina D1 em carcinomas  
espinocelulares de cabeça e pescoço: avaliação clínico-patológica**

**Araraquara**

**2018**



**UNESP - Universidade Estadual Paulista**  
**Faculdade de Odontologia de Araraquara**



**Maykon Kennedy Schulz Oliveira**

**Expressão de CD10, Vimentina, Ki-67 e Ciclina D1 em carcinomas  
espinocelulares de cabeça e pescoço: avaliação clínico-patológica**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Área de Diagnóstico e Cirurgia, da Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista para título de Mestre em Diagnóstico e Cirurgia.

**Orientadora:** Prof. Dra. Andreia Bufalino

**Araraquara**

**2018**

Oliveira, Maykon Kennedy Schulz

Expressão de CD10, Vimentina, Ki-67 e Ciclina D1 em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço: avaliação clínico-patológica / Maykon Kennedy Schulz Oliveira. – Araraquara: [s.n.], 2018  
51 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Andreia Bufalino

Coorientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León

1. Neoplasias de cabeça e pescoço 2. Proliferação celular  
3. Diferenciação celular I. Título

Ficha catalográfica elaborada pela Bibliotecária Ana Cristina Jorge, CRB-8/5036  
Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara  
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação

**Maykon Kennedy Schulz Oliveira**

**Expressão de CD10, Vimentina, Ki-67 e Ciclina D1 em carcinomas  
espinocelulares de cabeça e pescoço: avaliação clínico-patológica**

**Comissão julgadora**

**Para obtenção do grau de Mestre em cirurgia e diagnóstico**

Presidente e orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Andreia Bufalino

2º Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Luciana Yamamoto de Almeida

3º Examinador: Prof. Dr. Valfrido Antônio Pereira Filho

Araraquara, 13 de março de 2018.

## **DADOS CURRICULARES**

### **Maykon Kennedy Schulz Oliveira**

NASCIMENTO: 15/09/1990 – Timóteo – MG

FILIAÇÃO: Dilson Martins de Oliveira e Eliane Schulz Moraes Oliveira

2013: Graduação em odontologia pela Universidade Paulista. São Paulo. SP.

2013: Ingresso ao programa de residência em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial pela Autarquia Hospitalar Municipal de São Paulo no Hospital Municipal Dr. Cármino Carrichio – Tatuapé.

2016: Conclusão do programa de residência.

2016: Obtenção do título de ordem de especialista pelo Colégio Brasileiro de Cirurgia Traumatologia Bucomaxilofacial.

## **Dedicatória**

Esse trabalho é dedicado aos meus queridos pais Dilson Martins de Oliveira e Eliane Schulz Moraes Oliveira, ao meu tio Marcelo Schulz que inspirou a minha formação universitária e a querida Mariana e sua família que muito me ajudou durante essa caminhada.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus, que sempre está comigo em todos os projetos, sonhos e planos. Eterna gratidão. Aos meus pais Dilson Martins de Oliveira e Eliane Schulz Moraes Oliveira pelas infinitas orações, confiança e credibilidade, meu muito obrigado. Obrigado pelo amor incondicional, amo vocês.

À minha orientadora Prof<sup>a</sup> Dra. Andreia Bufalino, pelo carinho, pela dedicação à vida acadêmica, pela paciência e por todo auxílio necessário para realização deste trabalho, muito obrigado.

Agradeço à Pró-Reitoria de Pós-Graduação da UNESP pela concessão de bolsa de mestrado no último ano, muito obrigado.

Aos queridos amigos que muito me ajudaram e incentivaram na realização deste trabalho, sem vocês não seria possível, muito obrigado.



“Não tenho palavras pra agradecer a Tua bondade, dia após dia me cercas com fidelidade, nunca me deixes esquecer que tudo o que tenho, tudo o que sou, o que vier a ser vem de Ti, Senhor. Dependo de Ti, preciso de Ti, sozinho nada posso fazer, descanso em Ti, espero em Ti, sozinho nada posso fazer. Nunca me deixes esquecer, que tudo o que tenho, tudo o que sou, o que vier a ser vem de Ti, Senhor” Diante do Trono.

Oliveira MKS. Expressão de CD10, Vimentina, Ki-67 e Ciclina D1 em carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço: avaliação clínico-patológica [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

## **RESUMO**

O carcinoma espinocelular (CEC) é a sexta malignidade mais comum do mundo, e na região de cabeça e pescoço representa mais de 90% das malignidades. Mesmo com os recentes avanços nos protocolos de tratamento cirúrgico, radioterápico e quimioterápico, a taxa de sobrevida de 5 anos para pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECCP) permanece reduzida. Diversos fatores podem contribuir para esse baixo índice de sobrevida e, somado a isso, ainda não existem marcadores biológicos que possam contribuir na orientação da melhor opção terapêutica dos pacientes e na previsão do seu diagnóstico. Estudos desta natureza representam uma valiosa oportunidade para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese do CECCP. Dentre estes eventos moleculares, o processo da diferenciação celular é capaz de regular a expressão de genes ligados a importantes funções celulares, incluindo o controle da proliferação celular. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a relação de marcadores de proliferação e diferenciação celular com parâmetros clínico-patológicos de amostras de CECCP por meio da imuno-histoquímica (IQ). Diante disto, nosso estudo avaliou um total de 46 amostras de CECCP. Quanto a expressão dos marcadores de proliferação celular, avaliamos Ki-67 (n=46) e Ciclina D1 (n=46). Para os marcadores de diferenciação celular, avaliamos CD10 (n=42) e Vimentina (n=41). A expressão aumentada de Ki-67 foi significativamente associada com pior prognóstico ( $p < 0.05$ ). Os outros marcadores não tiveram associação. Em conclusão, esses resultados sugerem que a expressão do Ki-67 em células tumorais dos CECCP está associada com baixa sobrevida global e pior estadiamento clínico, consequentemente associado a um prognóstico ruim.

**Palavras – chave:** Neoplasias de cabeça e pescoço. Proliferação celular. Diferenciação celular.

Oliveira MKS. Expression of CD10, Vimentin, Ki-67 and Cyclin D1 in squamous cell carcinomas of the head and neck: clinicopathological evaluation [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

## **ABSTRACT**

Squamous cell carcinoma (SCC) is the sixth most common malignancy in the world, and in the head and neck region it represents more than 90% of malignancies. Even with recent advances in surgical, radiotherapeutic and chemotherapeutic treatment protocols, the 5-year survival rate for patients with squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC) remains low. Several factors may contribute to this low survival rate and, in addition, there are still no biological markers that can contribute to the orientation of the best therapeutic option of the patients and the prediction of their diagnosis. Studies of this nature represent a valuable opportunity to clarify the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of HNSCC. Among these molecular events, the process of cell differentiation is able to regulate the expression of genes linked to important cellular functions, including the control of cell proliferation. In this context, the objective of this study was to evaluate the relationship of proliferation and cellular differentiation markers with clinical-pathological parameters of HNSCC samples by means of immunohistochemistry (IQ). In view of this, our study evaluated a total of 46 HNSCC samples. Regarding the expression of the cellular proliferation markers, we evaluated Ki-67 (n = 46) and Cyclin D1 (n = 46). For cell differentiation markers, we evaluated CD10 (n = 42) and Vimentin (n = 41). Increased Ki-67 expression was significantly associated with poorer prognosis (p <0.05). The other markers had no association. In conclusion, these results suggest that the expression of Ki-67 in CECCP tumor cells is associated with low overall survival and poorer clinical staging, consequently associated with poor prognosis.

**Keywords:** Head and neck neoplasms. Cell proliferation. Cell differentiation.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Carcinoma espinocelular da região de cabeça e pescoço e sua relação com fatores de proliferação e diferenciação celular</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2 Anticorpo de proliferação celular: Ki-67</b> .....	<b>14</b>
<b>2.3 Anticorpo de proliferação celular: Ciclina D1</b> .....	<b>15</b>
<b>2.4 Anticorpo de diferenciação celular: CD10</b> .....	<b>16</b>
<b>2.5 Anticorpo de diferenciação celular: Vimentina</b> .....	<b>17</b>
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>19</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>20</b>
<b>4.1 Aprovação do Comitê de Ética</b> .....	<b>20</b>
<b>4.2 Amostras dos CECCP parafinados</b> .....	<b>20</b>
<b>4.3 Análise histopatológica</b> .....	<b>21</b>
<b>4.4 Construção dos microarranjos teciduais (<i>Tissue microarrays</i> - TMA)</b> .....	<b>21</b>
<b>4.5 Avaliação Imunoistoquímica</b> .....	<b>22</b>
<b>4.6 Análise estatística</b> .....	<b>25</b>
<b>5 RESULTADO</b> .....	<b>26</b>
<b>5.1 Expressão imuno-histoquímica de CD10 em amostras de CECCP</b> .....	<b>26</b>
<b>5.2 Expressão imunoistoquímica de Vimentina em amostras de CECCP</b> .....	<b>29</b>
<b>5.3 Expressão imunoistoquímica do Ki-67 em amostras de CECCP</b> .....	<b>31</b>
<b>5.4 Expressão imunoistoquímica de Ciclina D1 em amostras de CECCP</b> .....	<b>34</b>
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>42</b>
<b>ANEXO</b> .....	<b>48</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A carcinogênese designa o processo de desenvolvimento de uma neoplasia, na qual uma série de alterações se acumulam como consequência da desregulação da sinalização de moléculas<sup>1</sup>. O carcinoma espinocelular (CEC) é a sexta malignidade mais comum no mundo<sup>2</sup>, e representa >90% das malignidades da região de cabeça e pescoço<sup>3</sup>. O diagnóstico histopatológico é feito de acordo com critérios propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>4</sup>, sendo que para fazer o diagnóstico seguindo classificações atualizadas, muitas vezes são necessários estudos complementares como a imuno-histoquímica (IQ)<sup>5</sup>.

Normalmente a doença se manifesta na orofaringe, hipofaringe, laringe e cavidade oral. O desenvolvimento do CECCP é resultado da interação de fatores ambientais e herança genética, sendo, portanto, multifatorial. Os fatores de risco incluem o abuso do álcool e o tabagismo<sup>6</sup>.

O CECCP é uma doença complexa que se caracteriza por heterogeneidade clínica, patológica, fenotípica e biológica<sup>7</sup>. A evolução e a progressão dessa lesão é resultado de múltiplos passos e alterações das vias celular e molecular no epitélio escamoso estratificado<sup>8</sup>. Evidências sugerem um modelo de progressão molecular de células pré-malignas, lesões instaladas e doenças invasivas (Figura 1).

Os sintomas variam, dependendo no local de origem, e pode incluir dor de garganta, disfagia, odinofagia e rouquidão. Ao exame clínico, os pacientes geralmente apresentam um sítio primário identificável e uma massa palpável em região cervical. Uma abordagem multidisciplinar é importante no tratamento desses pacientes, dada a complexidade do tratamento e as complicações agudas e de longo prazo resultantes da quimioterapia, radioterapia e cirurgia. A determinação do estágio clínico e radiográfico é crucial para o planejamento e tratamento precoce<sup>6</sup>.

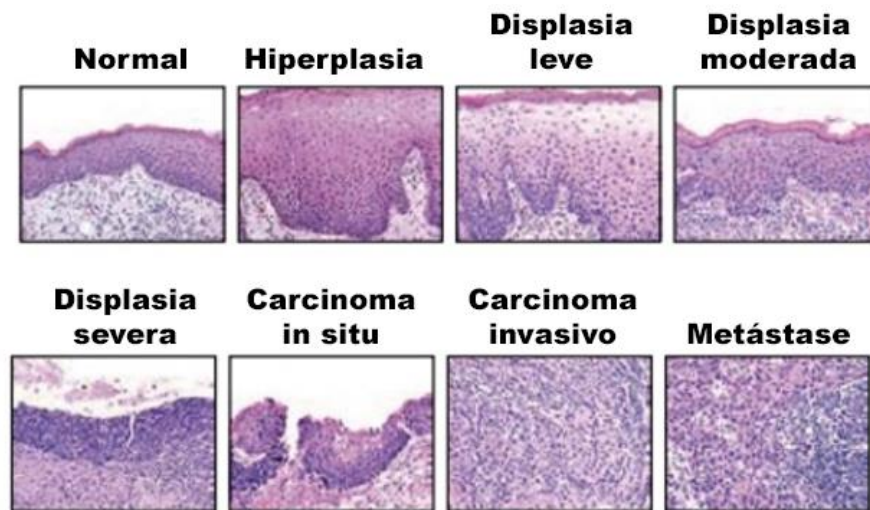
De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), no biênio 2016-2017, apontou a ocorrência de cerca de 600.000 casos novos de câncer. No ano de 2016, a estimativa foi de 11.140 casos novos de câncer oral em homens e 4.350 em mulheres. Para o câncer da laringe, foram 6.360 casos novos em homens e 990 em mulheres. O CEC oral (CECO) representa o quinto e o de laringe o oitavo tipo de câncer mais comum em incidência entre os homens<sup>9</sup>.

O CECCP parece estar intimamente ligado à imunossupressão e os pacientes geralmente demonstram deficiência na função do sistema imune e correlaciona-se

com resultados ruins<sup>10</sup>. Mecanismos de evasão imunológica tumoral no CECCP incluem o desenvolvimento de tolerância de células T, modulação de células inflamatórias e citocinas angiogênicas, além de queda na regulação do processamento de antígenos<sup>11</sup>. Esses mecanismos atualmente estão servindo para definir metas de imunoterapia para desenvolvimento de tratamento clínico<sup>12</sup>.

Para melhorar o prognóstico é necessário estabelecer novos marcadores que possam prever a resistência terapêutica. Isso ajudaria na otimização do tratamento dos CECCP, beneficiando os pacientes<sup>13</sup>. A maioria dos estudos de CECCP em populações brasileiras enfatizam a análise epidemiológica e correlações clinico-patológicas através de uma análise morfológica convencional<sup>14,15</sup>. Desse modo, a identificação de subgrupos de CECCP por meio de análise complementar por IQ, podem ter impacto no tratamento e prognóstico (recorrência e metástases locorregionais e à distância) fornecendo informações necessárias para melhor abordagem clínica.<sup>2</sup>

**Figura 1 – Progressão do CECCP**



Fonte: Adaptado de Haddad, Shin<sup>6</sup> p.1145.

## 7 CONCLUSÃO

- A expressão imuno-histoquímica de Ki-67 foi correlacionada com menor sobrevida global em pacientes com CECCP.
- A expressão imuno-histoquímica alterada de ciclina D1, vimentina e CD-10 não demonstraram correlação com pior prognóstico nos pacientes com CECCP incluídos neste estudo.
- A ausência de informações clínicas em prontuários médicos representa um grande desafio para o desenvolvimento de pesquisas que busca encontrar novos marcadores de prognósticos.

## REFERÊNCIAS

1. Padhi S, Saha A, Kar M, Ghosh C, Adhya A, Baisakh M, et al. Clinico-Pathological correlation of  $\beta$ -Catenin and Telomere dysfunction in head and neck squamous cell carcinoma patients. *J Cancer*. 2015; 6(2): 192-202.
2. Barber BR, Biron VL, Klimowicz AC, Puttagunta L, Côté DW, Seikaly H. Molecular predictors of locoregional and distant metastases in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2013; (16): 42-53.
3. Grégoire V, Lefebvre JL, Licitra L, Felip E. Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS-ESMO-ESTRO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*. 2010; 21(5): 184-6.
4. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization. Classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumors. Lyon: IARC Press; 2005.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Diretrizes diagnósticas e terapêuticas do câncer de cabeça e pescoço. 2015. [acesso 27 jan 2018]. Disponível em: <[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2015/prt0516\\_17\\_062015.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/sas/2015/prt0516_17_062015.html)>.
6. Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. *N Eng J Med*. 2008; 359(11): 1143-54.
7. Braakhuis BJ, Tabor MP, Kummer JA, Leemans CR, Brakenhoff RH. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res*. 2003; 63(8): 1727-30.
8. Wang X, Fan M, Chen X, Wang S, Alsharif MJ, Wang L, et al. Intratumor genomic heterogeneity correlates with histological grade of advanced oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2006; 42(7): 740-4.
9. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2016. [acesso 20 dez 2017]. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/wcm/dncc/2015/estimativa-2016.asp>>.
10. Ferris RL. Immunology and immunotherapy of head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2015; 33(29): 3293-304.
11. Duffy SA, Taylor JM, Terrell JE, Islam M, Li Y, Fowler KE, et al. Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer*. 2008; 113(4): 750-7.
12. Hanna GJ, Liu H, Jones RE, Bacay AF, Lizotte PH, Ivanova EV, et al. Defining an inflamed tumor immunophenotype in recurrent, metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol*. 2017; 67(1): 61-9.
13. Fukusumi T, Ishii H, Konno M, Yasui T, Nakahara S, Takenaka Y, et al. CD10 as a novel marker of therapeutic resistance and cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2014; 111(3): 506-14.



14. Andrade AL, Ferreira SJ, Ferreira SM. Immunoexpression of EGFR and EMMPRIN in a series of cases of head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2015; 211(10): 776-81.
15. Pires FR, Ramos AB, Oliveira JB. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. *Journal Appl. Oral Sci*. 2013; 21(5): 460-7.
16. Mechtersheimer G, Möller P. Expression of the common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10) in mesenchymal tumors. *Am J Pathol*. 1989; 134(5): 961-5.
17. Iwaya K, Ogawa H, Izumi M, Kuroda M, Mukai K. Stromal expression of CD10 in invasive breast carcinoma: a new predictor of clinical outcome. *Virchows Arch*. 2002; 440(6): 589-93.
18. Lau SK, Prakash S, Geller SA, Alsabeh R. Comparative immunohistochemical profile of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma, and metastatic adenocarcinoma. *Hum Pathol*. 2002; 33(12): 1175-81.
19. McCluggage WG, Oliva E, Herrington CS, McBride H, Young RH. CD10 and calretinin staining of endocervical glandular lesions, endocervical stroma and endometrioid adenocarcinomas of the uterine corpus: CD10 positivity is characteristic of, but not specific for, mesonephric lesions and is not specific for endometrial stroma. *Histopathology*. 2003; 43(2): 144-50.
20. Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol*. 2010; 23(2): 213-24.
21. Ramaekers FC, Haag D, Kant A, Moesker O, Jap PH, Vooijs GP. Coexpression of keratin and vimentin-type intermediate filaments in human metastatic carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci*. 1983; 80(9): 2618-22.
22. Gilles C, Polette M, Piette J, Delvigne AC, Thompson EW, Foidart JM, et al. Vimentin expression in cervical carcinomas: association with invasive and migratory potential. *J Pathol*. 1996; 180(2): 175-80.
23. Gilles C, Polette M, Zahm JM, Tournier JM, Volders L, Foidart JM, et al. Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. *J Cell Sci*. 1999; 112 (24): 4615-25.
24. Paccione RJ, Miyazaki H, Patel V, Waseem A, Gutkind JS, Zehner ZE, et al. Keratin down-regulation in vimentin-positive cancer cells is reversible by vimentin RNA interference, which inhibits growth and motility. *Mol Cancer Ther*. 2008; 7(9): 2894-903.
25. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, Worden FP, Prince ME, Tran HH, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol*. 2008; 26(19): 3128-37.

26. Honeycutt KA, Chen Z, Koster MI, Miers M, Nuchtern J, Hicks J, et al. Deregulated minichromosomal maintenance protein MCM7 contributes to oncogene driven tumorigenesis. *Oncogene*. 2006; 25(29): 4027-32.
27. Szelachowska J, Dziegiel P, Jelen-Krzyszewska J, Jelen M, Matkowski R, Pomiecko A, et al. Mcm-2 protein expression predicts prognosis better than Ki-67 antigen in oral cavity squamocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2006; 26(3): 2473-8.
28. Kotelnikov VM, Coon JS 4th, Mundle S, Kelanic S, LaFollette S, Taylor S IV, et al. Cyclin D1 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck and in oral mucosa in relation to proliferation and apoptosis. *Clin Cancer Res*. 1997; 3(1): 95-101.
29. Poi MJ, Knobloch TJ, Sears MT, Uhrig LK, Warner BM, Weghorst CM, et al. Coordinated expression of cyclin-dependent kinase-4 and its regulators in human oral tumors. *Anticancer Res*. 2014; 34(7): 3285-92.
30. Bullwinkel J, Baron-Lühr B, Lüdemann A, Wohlenberg C, Gerdes J, Scholzen T. Ki-67 protein is associated with ribosomal RNA transcription in quiescent and proliferating cells. *J Cell Physiol*. 2006; 206(3): 624-35.
31. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000; 182(1): 311–22.
32. Chatzkel J, Lewis JS Jr, Ley JC, Wildes TM, Thorstad W, Gay H, et al. Correlation of Ki-67 proliferative antigen expression and tumor response to induction chemotherapy containing cell cycle-specific agents in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol*. 2017; 11(3): 338-45.
33. Mahjabeen I, Kayani MA. Loss of mitochondrial tumor suppressor genes expression is associated with unfavorable clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma: data from retrospective study. *PLoS One*. 2016; 11(1): 1-12.
34. Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehülsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol*. 1999; 35(6): 583-9.
35. Urru SAM, Gallus S, Bosetti C, Moi T, Medda R, Sollai E, et al. Clinical and pathological factors influencing survival in a large cohort of triple-negative breast cancer patients. *BMC Cancer*. 2018; 18(1): 1-11.
36. Lundberg AS, Weinberg RA. Control of the cell cycle and apoptosis. *Eur J Cancer*. 1999; 35(14): 1886-94.
37. Chen QM, Luo G, Li BQ, Samaranayake LP. Expression of p16 and CDK4 in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinoma: a semi-quantitative immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med*. 1999; 28(4): 158-64.
38. Luo J, Yan R, He X, He J. Constitutive activation of STAT3 and cyclin D1 overexpression contribute to proliferation, migration and invasion in gastric cancer cells. *Am J Transl Res*. 2017; 9(12): 5671-7.

39. Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. *Mol Cancer*. 2007; 2(6): 24-8.
40. Wang J, Lian Y, Gu Y, Wang H, Gu L, Huang Y, et al. Synergistic effect of farnesyl transferase inhibitor lonafarnib combined with chemotherapeutic agents against the growth of hepatocellular carcinoma cells. *Oncotarget*. 2017; 8(62): 105047-60.
41. Liu Q, Cao Y, Zhou P, Gui S, Wu X, Xia Y. Panduratin A inhibits cell proliferation by inducing G0/G1 phase cell cycle arrest and induces apoptosis in breast cancer cells. *Biomol Ther*. 2018 Jan 5 [Epub ahead of print].
42. Shipp MA, Look AT. Hematopoietic differentiation antigens that are membrane-associated enzymes: cutting is the key! *Blood*. 1993; 82(4): 1052-70.
43. Mishra D, Singh S, Narayan G. Role of B cell development marker CD10 in cancer progression and prognosis. *Mol Biol Int*. 2016; 2016: 4328697.
44. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006; 444(7120): 756-60.
45. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2008; 100(9): 672-9.
46. Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, Wolf GT, Kaplan MJ, Dalerba P, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci*. 2007; 104(3): 973-8.
47. Chen YC, Chen YW, Hsu HS, Tseng LM, Huang PI, Lu KH, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a putative marker for cancer stem cells in head and neck squamous cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 385(3): 307-13.
48. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Tsakmaki V, Danielidis V, Sivridis E. Cancer stem cell phenotype relates to radio-chemotherapy outcome in locally advanced squamous cell head-neck cancer. *Br J Cancer*. 2012; 106(5): 846-53.
49. Mokhtari M, Ameri F. Diagnostic value of CD-10 marker in differentiating of papillary thyroid carcinoma from benign thyroid lesions. *Adv Biomed Res*. 2014; 3(206): 1-19.
50. Ivaska J, Pallari HM, Nevo J, Eriksson JE. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. *Exp Cell Res*. 2007; 313(10): 2050-62.
51. Keeling MC, Flores LR, Dodhy AH, Murray ER, Gavara N. Actomyosin and vimentin cytoskeletal networks regulate nuclear shape, mechanics and chromatin organization. *Sci Rep*. 2017; 7(1): 5219.
52. Zhou J, Tao D, Xu Q, Gao Z, Tang D. Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015; 8(3): 3150-4.

53. Maguer-Satta V, Besançon R, Bachelard-Cascales E. Concise review: neutral endopeptidase (CD10): a multifaceted environment actor in stem cells, physiological mechanisms, and cancer. *Stem Cells*. 2011; 29(3): 389-96.
54. Pérez I, Varona A, Blanco L, Gil J, Santaolalla F, Zabala A, et al. Increased APN/CD13 and acid aminopeptidase activities in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2009; 31(10): 1335-40.
55. Curry J, Johnson J, Tassone P, Vidal MD, Menezes DW, Sprandio J, et al. Metformin effects on head and neck squamous carcinoma microenvironment: window of opportunity trial. *Laryngoscope*. 2017; 127(8): 1808-15.
56. Mandal M, Myers JN, Lippman SM, Johnson FM, Williams MD, Rayala S, et al. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. *Cancer*. 2008; 112(9): 2088-100.
57. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*. 2005; 17(5): 548-58.
58. Christiansen JJ, Rajasekaran AK. Reassessing epithelial to mesenchymal transition as a prerequisite for carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res*. 2006; 66(17): 8319-26.
59. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Curr Opin Cell Biol*. 2003; 15(6): 740-6.
60. Cortegoso AVB, Laureano NK, Silva ADD, Danilevicz CK, Magnusson AS, Visioli F, et al. Cell proliferation markers at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: comparative analysis in relation to clinicopathological parameters of patients. *J Appl Oral Sci*. 2017; 25(3): 318-23.
61. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983; 31(1): 13-20.
62. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB-1 and MIB-3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 1992; 168(4): 357-63.
63. Pereira CH, Morais MO, Martins AF, Soares MQ, Alencar Rde C, Batista AC, et al. Expression of adhesion proteins (E-cadherin and  $\beta$ -catenin) and cell proliferation (Ki-67) at the invasive tumor front in conventional oral squamous cell and basaloid squamous cell carcinomas. *Arch Oral Biol*. 2016; 61(1): 8-15.
64. Piffkó J, Bánkfalvi A, Ofner D, Kusch F, Böcker W, Joos U, et al. In situ assessment of cell proliferation at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Virchows Arch*. 1996; 429(4-5): 229-34.

65. Piffkò J, Bàngfalvi A, Ofner D, Bryne M, Rasch D, Joos U, et al. Prognostic value of histobiological factors (malignancy grading and AgNOR content) assessed at the invasive tumour front of oral squamous cell carcinomas. *Br J Cancer*. 1997; 75(10): 1543-6.
66. Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. The relationship of proliferating cell density at the invasive tumour front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2004; 33(4): 204-8.
67. Watanabe S, Watanabe R, Oton-Leite AF, Alencar Rde C, Oliveira JC, Leles CR, et al. Analysis of cell proliferation and pattern of invasion in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Sci*. 2010; 52(3): 417-24.
68. Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, Esteban F, Bravo M. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: why Ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncol*. 2010; 46(7): 525-30.
69. Motokura T, Arnold A. Cyclin D and oncogenesis. *Curr Opin Genet Dev*. 1993; 3(1): 5-10.
70. Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic markers in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck*. 2001; 23(2): 147-59.
71. Dhingra V, Verma J, Misra V, Srivastav S, Hasan F. Evaluation of Cyclin D1 expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Clin Diagn Res*. 2017; 11(2): 1-4.
72. Zhien F, Ping Z, Lizhen W, Wantao C. Prognostic value of cyclin D1 expression in head and neck squamous cell carcinoma assessed by tissue microarrays. *Chi J Oral Maxillofac Surg*. 2012; 10(1): 277-82.
73. Das SN, Khare P, Singh MK, Sharma SC. Correlation of cyclin D1 expression with aggressive DNA pattern in patients with tobacco-related intraoral squamous cell carcinoma. *Indian J Med Res*. 2011; 133(1): 381-6.
74. Guerra ES, Paula EC, Oliveira JC, Junior DP, Araujo VC, Araujo NS. Cyclin D1 and p16 immunohistochemical expression in oral squamous cell carcinoma: correlation with TMN classification and location. *Rev Bras Cancerol*. 2005; 51(1): 31-7.