

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS E IMUNO-  
HISTOQUÍMICAS DO FRONTE DE INVASÃO TUMORAL DO CARCINOMA  
ESPINOCELULAR CUTÂNEO DE CABEÇA E PESCOÇO E SUA  
IMPORTÂNCIA NO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO.**

**JULIANA CARNEIRO MELO**

**Botucatu-SP**

**Agosto-2013**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE MEDICINA

AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS E IMUNO-  
HISTOQUÍMICAS DO FRONTE DE INVASÃO TUMORAL DO CARCINOMA  
ESPINOCELULAR CUTÂNEO DE CABEÇA E PESCOÇO E SUA IMPORTÂNCIA  
NO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO

JULIANA CARNEIRO MELO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Patologia.

Orientação - Profa. Dra. Mariângela Esther Alencar Marques.

Coorientação - Profa.Dra. Luciana Abbade

Botucatu-SP

Agosto – 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: **ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE**

Melo, Juliana Carneiro.

Avaliação das características histopatológicas e imuno-histoquímicas do  
frente de invasão tumoral do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e  
sua importância no comportamento biológico / Juliana Carneiro Melo. –  
Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de  
Medicina de Botucatu

Orientador: Mariangela Esther Alencar Marques

Coorientador: Luciana Abbade

Capes: 40105008

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Imuno-histoquímica. 3. Cabeça  
– Câncer – Histopatologia. 4. Pescoço – Câncer – Histopatologia.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular; Clínica; Frente de invasão;  
Histopatologia; Imuno-histoquímica.

A Deus pelas bênçãos derramadas sobre minha família.

Aos meus pais, Teresinha e Aldo Melo, pelo amor incondicional

A minha irmã Sabrina e ao meu irmão Aldo Filho, apoio e carinho de sempre.

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dra. Mariângela Esther Alencar Marques pela valiosa orientação que me foi dada para realização desse trabalho, a minha gratidão e admiração.

À minha coorientadora, Professora Dra. Luciana Abbade, exemplo de competência e dedicação.

À Professora Márcia pelo apoio durante a realização desse trabalho.

À secretária Vânia A. Soler pela atenção e gentileza que me dispensou sempre que a procurei.

Ao meu professor de Patologia da graduação, Dr. Cláudio Gleidiston Lima da Silva, referência de seriedade e profissionalismo, que muito me marcou desde os bancos universitários pelo apoio e incentivo.

Aos técnicos Marcos, Fernando, Celene, José, Ronaldo e Eduardo, e auxiliares Milena e Cristina dos laboratórios de Imuno-histoquímica e Histologia pela colaboração e amizade inestimáveis.

Aos amigos de residência Thamy Yamashita, Alexandre Fabro, Melissa Fugimori e Amanda pelo companheirismo.

Às minhas amigas patologistas Diane Isabelle, Denise Nunes, Maria de Jesus e Ana Maria Castro, pelo apoio e amizade.

Ao Hélio Rubens Nunes, pela análise estatística.

Ao Comitê de Ética da UNESP, pelo aprimoramento deste trabalho

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro.

“Conheça todas as teorias, domine todas  
as técnicas, mas ao tratar uma alma humana,  
seja apenas outra alma humana.”

Carl Jung

## RESUMO

**Introdução:** O carcinoma espinocelular (CEC) é tumor maligno das células espinhosas da epiderme caracterizado por evolução mais rápida, maior poder invasivo e metastático em relação ao carcinoma basocelular (CBC). A área mais profunda e infiltrativa do CEC, conhecida como frente de invasão, revela células neoplásicas malignas com menor grau de diferenciação comparadas à totalidade da lesão. Estudos recentes demonstram a influência do padrão do frente de invasão tumoral no prognóstico de CEC de laringe e colo uterino. Contudo, não há estudos sobre o mesmo em relação a CEC cutâneos de cabeça e pescoço. **Objetivos:** Estudar as características clínicas, histopatológicas e perfil imuno-histoquímico do CEC de cabeça e pescoço e frente de invasão tumoral, correlacionando-o com comportamento biológico. **Métodos:** O estudo foi do tipo coorte retrospectivo, sendo selecionados os pacientes que tiveram diagnóstico de CEC de cabeça e pescoço confirmados pelo exame anatomopatológico no período de 1999 a 2009. A avaliação do frente de invasão tumoral foi realizada empregando-se imuno-histoquímica para E-caderina, ki-67 e p53. **Resultados:** O tipo de frente de invasão, bem como as expressões de E-caderina e ki-67, seja em sítio superficial ou profundo, não apresentaram associação com os critérios prognósticos histopatológicos. Os achados mostraram que a E-caderina, o p53 e o ki-67 foram mais expressos em tumores com tamanho > 2cm. Em relação a espessura do tumor, observamos que o p53 foi mais expresso na profundidade nas lesões mais espessas (índice de Breslow maior que 2mm), e que foi acompanhada também pela expressão maior do Ki-67. A expressão de p53 em sítio superficial teve associação inversa com o critério de espessura ( $p < 0,049$ ) e, em sítio profundo, teve associação direta com a intensidade do processo inflamatório local ( $p < 0,046$ ). O tipo de frente de invasão, bem como as expressões de E-caderina, ki-67 e p53, em sítios superficial e profundo, não demonstraram impacto na sobrevida livre de doença. **Conclusão:** As características do frente de invasão tumoral não se correlacionaram com prognóstico, em CEC cutâneos de cabeça e pescoço no presente estudo.

**Palavras chaves:** Histopatologia; Imuno-histoquímica; Carcinoma Espinocelular, Frente de Invasão Tumoral.

## ABSTRACT

**Introduction:** The Squamous Cell Carcinoma (SCC) is a malignant epidermal tumor of squamous epithelial cells, characterized for greater aggressiveness much higher incidence of metastasis than Basal Cell Carcinoma (BCC). The deepest invading tumor area, known as invasive tumor front usually disclose less differentiated malignant cells, compared with the whole lesion. Recent studies demonstrate the influence of the invasive tumor front pattern on the prognosis of larynx and uterine cervix SCC. However, there is no studies about that on cutaneous SCC of the head and neck. **Objectives:** To study the clinical, histopathological and immunohistochemical profile of the SCC from head and neck and its invasive tumor front, correlating it with its biological behavior. **Methods:** The study was a retrospective type coorte, where the patients with histopathological diagnosis of head and neck cutaneous SCC among 1999 to 2009 were selected. The evaluation of invasive tumor front was immunohistochemistry for E-cadherin, ki-67 and p53. **Results:** The pattern of invasive tumor front, as well as E-cadherin and ki-67 expressions, at superficial and deep sites, did not present association with histopathological prognostic criteria. The findings showed that E-cadherin, p53 and Ki-67 were more highly expressed in tumors with size > 2cm. Regarding the thickness of the tumor, we observed that p53 was expressed in depth in thicker lesions (Breslow thickness greater than 2 mm), which was also accompanied by higher expression of Ki-67. p53 expression, at superficial site, had inverse association with thickness criteria ( $p < 0,049$ ) and, at deep site, had direct association with local inflammatory process intensity ( $p < 0,046$ ). The invasive tumor front, as well as E-cadherin, ki-67 and p53 expressions, at superficial and deep sites, did not demonstrate impact on free disease survival. **Conclusion:** The characteristics of invasive tumor front did not correlate with prognosis in cutaneous SCC of the head and neck regarding to the present study.

**Keywords:** Histopathology; Immunohistochemistry; Squamous Cell Carcinoma, Invasive tumor front.

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I – Revisão da Literatura

1. INTRODUÇÃO.....	10
1.1. CONCEITUAÇÃO.....	10
1.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DOS CARCINOMAS ESPINOCELULARES.....	10
1.3. ETIOLOGIA E PATOGÊNESE DO CARCINOMA ESPINOCELULAR.....	12
1.4. ASPECTOS CLÍNICOS DO CARCINOMA ESPINOCELULAR.....	14
1.5. VARIANTES HISTOPATOLÓGICAS DO CARCINOMA ESPINOCELULAR.....	14
1.6. CARCINOMA ESPINOCELULAR EM CRIANÇAS E ADULTOS JOVENS.....	17
1.7. ESTADIAMENTO E CLASSIFICAÇÃO.....	18
1.8 ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS.....	23
1.9 ASPECTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS E MOLECULARES.....	23
2. REFERÊNCIAS.....	26

### CAPÍTULO II – Artigo Científico

RESUMO.....	38
ABSTRACT.....	39
INTRODUÇÃO.....	40
MÉTODO.....	41
RESULTADOS.....	44
DISCUSSÃO.....	57
CONCLUSÃO.....	62
REFERÊNCIAS.....	65
ANEXOS .....	70

**CAPÍTULO I**  
**Revisão de Literatura**

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. CONCEITUAÇÃO**

O carcinoma espinocelular (CEC) é um tumor maligno da camada espinhosa da epiderme que faz parte de um grupo de tumores denominado cânceres de pele não-melanoma (CPNM). Esse grupo inclui tumores com ampla variabilidade em prognóstico que abrange desde aqueles com pior prognóstico, como o carcinoma de célula de Merkel, como aqueles mais frequentes e tipicamente menos agressivos, como o CEC e o carcinoma basocelular (CBC) <sup>(1,2)</sup>. Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), analisando a estimativa para o período de 2012-2013, o CPNM é tipo mais comum de neoplasia maligna no Brasil. No período anteriormente citado, estima-se 62.680 novos casos de CPNM entre homens e 71.490 em mulheres, o que corresponde a um risco estimado de 65 novos casos a cada 100 mil homens e 71 para cada 100 mil mulheres. Em relação ao seu impacto para saúde pública e das altas taxas de incidência, o CPNM permanece subnotificado pela maioria dos registros de câncer no mundo. No Brasil, é o tumor mais incidente em ambos os sexos e é bastante provável que exista um sub-registro devido ao subdiagnóstico <sup>(3,4)</sup>.

O CEC representa um significativo problema de saúde pública cuja incidência, morbidade, mortalidade e custos associados aumentam a cada ano. <sup>(4)</sup> Embora a maioria seja facilmente tratada com alta taxa de cura (90-95%), uma minoria substancial das lesões pode apresentar recorrência ou metástase <sup>(5)</sup>. Contudo, em alguns casos em que há demora no diagnóstico, esse câncer pode levar a ulcerações e deformidades físicas graves <sup>(4)</sup>.

### **1.2. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS**

O CEC é o segundo câncer de pele mais comum, após o CBC, representando cerca de 15-20% do total desses tumores <sup>(6,7)</sup>.

Estudos epidemiológicos relatam que, desde 1960, a incidência global de CEC tem aumentado anualmente a uma taxa de 3 a 8% por ano e é o câncer de maior incidência mundial, com mais de um milhão de novos casos diagnosticados nos Estados Unidos da América (EUA). Anualmente ocorre mais de 700.000 novos casos de CEC nos EUA <sup>(1,8)</sup>.

No Brasil, os dados do INCA mostram, que no período 2012-2013, o CPNM é o mais incidente em homens nas regiões Centro-Oeste (124/100 mil), Sul (80/100 mil) e Norte (38/100 mil), enquanto, nas regiões Sudeste (73/100 mil) e Nordeste (39/100 mil), é o segundo mais frequente. Nas mulheres é o mais comum em todas as regiões, com um risco estimado de 109/100 mil na região Centro-Oeste, 91/100 mil na região Sudeste, 68/100 mil na região Sul, 43/100 mil na região Norte e 42/100 mil na região Nordeste <sup>(4)</sup>.

O aumento da exposição solar, a mudança dos hábitos de vestuário, a diminuição da camada de ozônio e o envelhecimento da população (quanto mais velho o indivíduo, mais ultravioleta ele terá recebido) são as causas deste aumento brutal de incidência. <sup>(7)</sup>.

O CEC é mais frequente em homens do que em mulheres, com uma relação que pode ser maior que 3:1, geralmente em indivíduos idosos, embora possa ocorrer em pacientes jovens <sup>(8)</sup>. Maior frequência é observada em indivíduos de pele clara e olhos azuis, com ancestrais do norte da Europa <sup>(8)</sup>.

O CEC apresenta localização mais comum no terço inferior da face, orelhas, couro cabeludo, antebraços, dorso das mãos, pernas, lábio inferior, língua, assoalho da boca, glândula e vulva <sup>(9)</sup>. Em 1983, foi criado o conceito de área da máscara para denominar a área de alto risco na face na qual os CEC são mais propensos a apresentar recorrência ou metástase comparados com os que se desenvolvem no tronco ou extremidades (Figura 1) <sup>(10,11,19)</sup>.

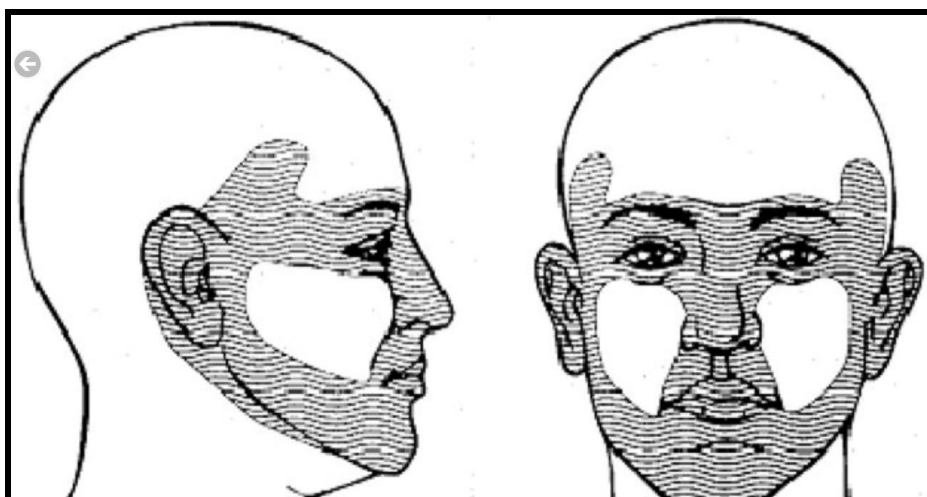


Figura 1 :Área da máscara de alto risco da face

### 1.3. ETIOLOGIA E PATOGÊNESE

A etiologia do CEC cutâneo é multifatorial, incluindo fatores individuais ou intrínsecos e fatores ambientais ou extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos temos: idade, pigmentação da pele, status imune e presença de defeito genético como xeroderma pigmentoso. Dentre os fatores ambientais ou extrínsecos, o mais importante é o dano actínico da pele secundária à exposição prolongada ao sol <sup>(12,13,14)</sup>.

A radiação ultravioleta (RUV) é o mais importante fator etiológico no desenvolvimento do CEC, principalmente nos indivíduos de pele clara e trabalhadores que atuam diretamente ao ar livre. Embora a luz solar abranja vários comprimentos de onda, a luz ultravioleta A (UVA) e a B (UVB), são as mais prejudiciais para a pele, sendo que a luz UVA é mais carcinógena do que a luz UVB, embora ambas possam levar ao surgimento do CEC. A exposição à RUV pode alterar o sinal de transdução dentro das células e também alterar o mecanismo de reparo do DNA. O gene supressor tumoral p53 tem sido implicado na geração do tumor. A RUV pode alterar a atividade dos genes nos ceratinócitos permitindo que células geneticamente alteradas evitem a apoptose. Doenças congênitas como o xeroderma pigmentoso e albinismo são doenças recessivas autossômicas com aumento de incidência de malignidade na pele <sup>(13)</sup>. Outros fatores incluem radioterapia, queimaduras anteriores, exposição ao arsênico, carcinógenos como hidrocarbonetos policíclicos (alcatrão, parafina, piche, fuligem, creosoto e antraceno) e imunossupressão <sup>(6)</sup>.

Algumas doenças virais também podem levar ao desenvolvimento dos CEC, como por exemplo, o vírus da imunodeficiência humana que têm alto risco para o desenvolvimento de CECs agressivos com aumento do risco de recorrência e metastases <sup>(15)</sup>. O papiloma vírus humano também tem sido implicado no desenvolvimento dos CECs <sup>(15)</sup>.

A inflamação crônica, úlceras de longa duração, cicatrizes e feridas são outras potenciais fontes de CECs. O epônimo úlcera de Marjolin, é utilizado quando o CEC se origina de úlceras crônicas, fístulas e cicatrizes de várias etiologias, embora queimaduras sejam a causa mais comum <sup>(11)</sup>.

A influência térmica pode produzir ceratoses térmicas e CEC. Essa lesão térmica ocorre em pessoas que trabalham demasiado perto de um fogo ou que usam aparelhos de aquecimento em contato com a pele <sup>(11)</sup>.

O desenvolvimento do CEC é frequente a partir de lesões pré-cancerosas como as ceratoses actínicas, corno cutâneo, queilite actínica e leucoplasias. Irritações crônicas pelo fumo, dentes defeituosos e aparelhos de prótese podem também estar relacionadas com a origem do CEC nas mucosas <sup>(6)</sup>.

O CEC é o principal problema cutâneo dos receptores de transplante de órgãos sólidos, que é potencializada pelo uso de medicamentos imunossupressores, ocorrendo 65 a 250 vezes mais do que na população geral. A taxa de CEC primário em receptores de transplante é alta, particularmente, naqueles com transplante renal ou cardíaco <sup>(14)</sup>. O risco relativo do CEC após transplante é mais nos homens do que nas mulheres, exceto em cânceres de lábios, e são significativamente mais agressivos do que em pacientes imunocompetentes <sup>(16,17)</sup>. Estes CEC crescem rapidamente e recorrem localmente em 13,4 % dos pacientes, geralmente durante os seis primeiros meses após a excisão e metastizam em 5-8% dos pacientes, usualmente durante o segundo ano após a excisão <sup>(16)</sup>.

O CEC, na microscopia óptica, em comparação com células escamosas normais, mostra redução dos desmossomos na superfície da célula com extensão de microvilos para dentro dos espaços intercelulares. Os desmossomos podem ser encontrados dentro de citoplasma de células tumorais, porém, esse achado não é específico do CEC, podendo ser encontrado também no ceratoacantoma, na doença de Bowen, em queratinócitos normais e proliferações epidérmicas não relacionadas <sup>(18)</sup>.

#### **1.4.ASPECTOS CLÍNICOS**

Clinicamente, a forma superficial tem início por uma pápula, quase sempre com superfície ceratósica. A primeira evidência clínica de malignidade é a induração. Observa-se grande tendência hemorrágica e a presença de crostas aderentes que recobrem áreas erosivas ou ulceradas. Há uma variedade exofítica que pode ser nodular, vegetante e úlcerovegetante. Na forma nodular o diagnóstico diferencial inclui: queratoacantoma, carcinoma basocelular (CBC), melanoma amelanótico, verruga vulgar e corno cutâneo. Neste caso, merece destaque especial o queratoacantoma, pelas dificuldades de diagnóstico clínico e histopatológico. Os tipos vegetantes e úlcero-vegetantes devem ser diferenciados do condiloma acuminado, tuberculose verrucosa, leishmaniose, paracoccidiodomicose, actinomicose e piodermite vegetante <sup>(18)</sup>.

Os fatores clínicos de risco aplicados ao CEC são :tamanho do tumor, localização, estado da borda do tumor, se o tumor é primário ou recorrente, imunossupressão e se o tumor desenvolveu-se em áreas previamente irradiadas <sup>(19)</sup>.

As metástases do CEC cutâneo podem ocorrer, após meses ou anos, e são mais frequentes nos CECs das mucosas, no dorso das mãos, em cicatrizes de úlceras crônicas, queimaduras, radiodermite e osteomielite crônica. Nos carcinomas de lábio, glândula ou vulva, a ocorrência de metástases ganglionares é precoce. As metástases são mais frequentes nos tumores maiores que 2 cm de diâmetro (30%), mais profundos com 4mm (45%), histologicamente indiferenciados com envolvimento perineural (47%) e, principalmente, se ocorrerem em imunossuprimidos <sup>(1)</sup>.

Os CEC que se originam em áreas expostas ao sol (0,5%) sobre ceratoses actínicas, corno cutâneo, doença de Bowen, poroceratose de Mibelli e carcinoma verrucoso, raramente desenvolvem metástases <sup>(18)</sup>.

A evolução do CEC é variável, podendo ser relativamente rápida quando ocorrem metástases nos gânglios regionais, vísceras e ossos com prognóstico reservado nestes casos. As metástases se disseminam mais por via linfática do que por via hematogênica <sup>(1)</sup>.

## **1.5.VARIANTES HISTOPATOLÓGICAS DOS CARCINOMAS ESPINOCELULARES**

Os CECs convencionais são caracterizados por lóbulos ou cordões de queratinócitos atípicos, originando-se da epiderme e invadindo a derme em ilhas pequenas e largas ou infiltrando a derme. Infiltrado inflamatório mononuclear em variáveis graus de intensidade podem ser vistos dentro ou ao redor do tumor e a elastose solar pode ser observada dentro da derme. Os CEC bem diferenciados são frequentemente caracterizados por pérolas córneas e queratinização de células individuais com o mínimo de atipia celular. Pode ocorrer ulceração ou apresentar superfície hiperkeratótica. Em campo de grande aumento, observa-se pontes intercelulares entre os queratinócitos. Lesões mais pobremente diferenciadas podem ter menos queratinização, atipia nuclear mais proeminente, numerosas figuras de mitose e ocasionais queratinócitos <sup>(18)</sup>. Com a progressão do tumor, podem ocorrer invasão profunda no tecido celular subcutâneo, fáscia e músculo. O envolvimento perineural é incomum, mas quando ocorre aumenta o risco de recorrência e metástase do CEC. Há

estudos que mostram que esse envolvimento está associado a menor sobrevida global e menor sobrevida livre de doença e que em 40 % dos casos, podem ocorrer sintomas clínicos associados como: dor, paralisia facial, picadas, parestesia, diplopia e visão turva (19,20).

O CEC acantolítico, também denominado adenoide ou tubular é observado mais frequentemente em áreas expostas ao sol na cabeça e pescoço de pacientes idosos. À microscopia, exibem o padrão convencional do CEC com diferenciação escamosa associada à acantólise com aparência pseudoglandular. A perda da coesão entre as células tumorais alveolares ou tubulares são caracteristicamente vistas com queratinócitos dentro do lúmen. As células atípicas podem ser largas, multinucleadas ou bizarras ou figuras de mitoses podem estar presentes. O diagnóstico diferencial dessa variante clínica é feita com o adenocarcinoma écrino, adenocarcinoma, adenocarcinoma metastático e angiossarcoma epitelióide (6).

O CEC verrucoso é um CEC de baixo grau, com pequeno potencial metastático, primeiramente descrito em 1948. Essa variante é de crescimento lento, primeiramente exofítico, verrucoso e depois penetra profundamente no tecido, podendo causar metástases regionais, tardiamente (5,8).

O CEC bowenoide é caracterizado pela desordem arquitetural em toda a espessura da epiderme, com perda da polaridade e ausência da maturação de queratinócitos. A doença *in situ* está localizada na junção dermoepidérmica intacta e quando os queratinócitos neoplásicos invadem a derme, resultam em CEC bowenoide invasivo. As características observadas nesse tipo de CEC são: hiperqueratose, parakeratose e acantose, caracteristicamente vistas no bowenoide; além de queratinócitos atípicos com mitoses, alargamento nuclear e células vacuoladas. Os queratinócitos atípicos podem se estender para baixo ao longo do epitélio folicular ao nível das glândulas sebáceas. Infiltrado inflamatório mononuclear é, frequentemente, presente em derme superior, consistindo de linfócitos, dendrócitos dérmicos e ocasionais plasmócitos (5,22).

O CEC produtor de mucina é uma variante rara associada a um curso clínico mais agressivo do que a maioria dos CEC cutâneos. Número variável de células produtoras de mucina tem sido encontrado dentro de tumores com aparência de CEC cutâneo. Essas células, normalmente, aparecem largas e pálidas com positividade para as colorações histoquímicas PAS e Mucicarmim (22).

O CEC de células fusiformes é uma variante relativamente incomum do CEC, podendo manifesta-se como tumor exofítico ou massa ulcerada em áreas expostas ao sol em pacientes idosos. Este subtipo é pobremente diferenciado, sendo caracterizado por proliferação de células fusiformes pleomórficas que infiltra o tecido conjuntivo. Essas células atípicas podem se arranjar em ninhos e pode infiltrar a derme com células isoladas e frequentemente sem conexão com a epiderme. A extensão profunda em tecido celular subcutâneo e fáscia é comum e podem ocorrer numerosas figuras de mitose e células gigantes multinucleadas pleomórficas. A evidência histológica de queratinização pode ser infrequente ou ausente. Por essa razão, o CEC de células fusiformes pode se distinguir de outros tumores de células fusiformes incluindo fibroxantoma atípico, histiocitoma fibroso maligno, melanoma de células fusiformes e dermatofibrossarcoma protuberans, necessitando de estudo imuno-histoquímico para diferenciação diagnóstica <sup>(24)</sup>.

O CEC adenoescamoso é uma forma rara de CEC que mostra tanta diferenciação escamosa como formação glandular verdadeira. Superficialmente, o tumor mostra diferenciação escamosa e na profundidade da derme e subcutâneo e desenvolvimento glandular verdadeiro com produção de sialomucina <sup>(9,25)</sup>.

Variantes histológicas menos usuais incluem: CEC de células claras, CEC papilar, CEC pigmentar, CEC anel de sinete e CEC desmoplásico <sup>(23)</sup>.

O CEC de células claras também denominado carcinoma hidrópico, foi, primeiramente, descrito em 1980 como uma variante com extensa mudança hidrópica. Todos os casos têm sido reportados na região de cabeça e pescoço, sendo a mandíbula o sítio mais comum. Clinicamente, surgem como nódulo ou massa que pode, ocasionalmente, estar ulcerada, podem ser confundidos com uma variedade de neoplasias de células claras, incluindo neoplasias sebáceas e adiposas <sup>(23)</sup>.

O CEC papilar é uma variante não usual, caracterizada clinicamente como massas pedunculadas de crescimento exofítico e, microscopicamente, com frondes papilares com core fibrovascular. As células adjacentes ao core estromal são menores com citoplasma basofílico escuro. As células mais próximas da superfície externa mostram tanto citoplasma eosinofílico abundante quanto claro. Há também atipia nuclear, figuras de mitose, espaço denso infiltrado inflamatório constituído por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos <sup>(9)</sup>.

O CEC anel de sinete aparece clinicamente como placa ou nódulo ulcerado. A histologia demonstra células com núcleo deslocado para a periferia, comprimindo o conteúdo citoplasmático, invadindo a derme<sup>(5,9)</sup>.

O CEC pigmentado mostra mistura de células escamosas queratinizantes com melanócitos dendríticos produtores de mucina. É importante realizar diagnóstico diferencial com CBC pigmentado, melanoma maligno com hiperplasia pseudoepiteliomatosa e pilomatrixoma<sup>(5)</sup>.

O CEC desmoplásico, variante nova, descrita em 1989, comumente ocorre em áreas expostas de cabeça e pescoço, mais frequente na região do pavilhão auricular. À histologia, observa-se proeminente padrão de crescimento trabecular, células epiteliais atípicas colunares e marcada reação estromal desmoplásica circundando as células atípicas<sup>(5)</sup>.

O CEC de novo é uma variante particularmente agressiva e não tem correlação com a exposição solar, sendo mais frequentemente encontrada em membros inferiores. Essa variante geralmente emerge de úlceras de longa duração, cicatrizes de queimaduras, descritas em 1827 por Marjolin, ou osteomielite, podendo também ser visto em condições inflamatórias crônicas como o lupus eritematoso sistêmico e epidermólise bolhosa distrófica. Histologicamente é semelhante a um CEC bem diferenciado, com área central atrófica e ulcerada e ilhas de células tumorais aparecendo na epiderme ou borda de úlcera, porém com ausência de elastose solar na derme. Essas lesões são extremamente agressivas, com probabilidade de metástases para linfonodos regionais cerca de 54 % dos casos. A incidência de recorrência é também dramaticamente aumentada e o prognóstico é pior, com taxa de sobrevida de 5 anos em 52-75% dos casos<sup>(28)</sup>.

Em relação, aos subtipos histológicos, temos que o CEC adenoide (ou acantolítico) e o CEC adenoescamoso (ou produtor de mucina) são marcadores para aumento do risco de recorrência e metástase<sup>(25,26,27)</sup>.

## **1.6. CARCINOMA ESPINOCELULAR EM CRIANÇAS E ADULTOS JOVENS**

O CEC é raro em crianças e pode causar muitos problemas de diagnóstico para patologistas pediátricos, em virtude da falta de experiência. Considerando o aumento da prevalência desses tumores em jovens, as biópsias iniciais devem ser consideradas

suspeitas em pacientes com história de imunossupressão, tumores com história prévia de radioterapia ou predisposição genética a malignidades<sup>(29)</sup>.

Pacientes com CEC na faixa etária menor de 40 anos, é geralmente vista como fator de risco para comportamento agressivo, no entanto, a Rede Nacional de abrangência do Câncer (NCCN,2013), decidiu que a tenra idade não é um fator de risco<sup>(19)</sup>.

## **1.7. ESTADIAMENTO E CLASSIFICAÇÃO**

Nos últimos 20 anos, o Comitê Conjunto Americano de Estadiamento de Câncer (AJCC), que é responsável por estabelecer critérios para estadiamento de todos os cânceres, tem incluído o CEC dentro de um grupo denominado cânceres de pele não melanoma. Na última edição do referido comitê (7ª edição), foi criado um sistema de estadiamento à parte, para o CEC de cabeça e pescoço, baseado nas características prognósticas de alto risco, observadas nesse tipo do tumor em estudos realizados por diferentes serviços.

De acordo com os centros terciários, aproximadamente 5% dos CEC metastatizam para linfonodos regionais. A taxa de metástase aumenta, dependendo da clínica e características patológicas do tumor, para 10 a 20% nos tumores de alto risco. Os fatores de alto risco para metástases incluem: tamanho do tumor primário maior de 2 cm, espessura do tumor (Breslow) maior que 2mm, Clark Nível IV ou maior, invasão perineural, grau histológico menos diferenciado e sítios anatômicos que são mais propensos a terem recorrência<sup>(1)</sup>.

Na 6ª edição, foi utilizado o sistema de estadiamento TNM classificando os pacientes baseados nos tumores primários (T), linfonodos regionais (N) e metástases a distância (M). Embora o grau histológico tenha sido reconhecido como significativo e incluído na caracterização, não estava incluído no estadiamento final, porque a importância do grau não era bem estabelecida para todos os tipos de TPNM. Na 7ª edição, o grau histológico passou a fazer parte do estadiamento final. Outras alterações implementadas na nova edição, foram: a) o tamanho do tumor utilizado para definir o tumor primário que era de 2-5cm na edição anterior, passou a ser considerado 2cm, isso porque estudos têm demonstrado que com o referido tamanho os tumores tem maior probabilidade de metastizar para linfonodos; b)em relação a espessura e nível de invasão, foram utilizados os parâmetros Breslow e Clark, análogos aos utilizados no

estadiamento dos melanomas, sendo considerado o Breslow maior que 2mm e o Clark nível IV ou maior, como características de alto-risco, uma vez que estudos recentes mostram que tanto a espessura quanto a profundidade de invasão, correlacionam-se com o maior risco de metástases, c) em relação ao envolvimento do osso foi considerado como T3 quando era observado invasão do osso temporal, maxilar, mandibular ou orbital e considerado como T4 a invasão da base do crânio, do esqueleto axial e apendicular ambas não incluídas na 6ª edição <sup>(1)</sup>.

Em relação ao sítio anatômico, a orelha e lábio têm sido correlacionados com aumento da taxa de recorrência e potencial metastático. Em relação aos linfonodos regionais e metástases os parâmetros não mudaram <sup>(1)</sup>.

Tabela 1 – Comparação entre as definições para 6ª. e 7ª. edições do sistema de estadiamento - tumor (T) – para carcinoma de células escamosas cutâneo, da *American Joint Committee on Câncer*

	6a. Edição	7a. Edição
<b>TX</b>	Tumor primário não pode ser avaliado	Tumor primário não pode ser avaliado
<b>T0</b>	Sem evidência de tumor primário	Sem evidência de tumor primário
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Tumor ≤ 2cm em sua maior dimensão	Tumor ≤ 2cm em sua maior dimensão com <2 características de alto-risco*
<b>T2</b>	Tumor > 2cm, mas não > 5cm, em sua maior dimensão	Tumor > 2cm em sua maior dimensão com ou sem 1 característica de alto-risco adicional*, ou qualquer tamanho com ≥2 características de alto-risco*
<b>T3</b>	Tumor > 5cm em sua maior dimensão	Tumor com invasão da maxila, mandíbula, órbita ou osso temporal
<b>T4</b>	Tumor invade estruturas extradérmicas profundas	Tumor com invasão do esqueleto (axial ou apendicular) ou invasão perineural da base do crânio

\* Características de alto-risco incluem profundidade (espessura >2mm; Clark ≥ IV). Invasão perineural; localização (sítio primário em orelha, sítio primário em lábio); e diferenciação (pouco diferenciado ou indiferenciado).

Tabela 2 – Comparação entre as definições para 6ª. e 7ª. edições do sistema de estadiamento - linfonodo (N) – para carcinoma de células escamosas cutâneo, da *American Joint Committee on Cancer*.

	<b>6a. Edição</b>	<b>7a. Edição</b>
<b>NX</b>	Linfonodos regionais não podem ser avaliados	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
<b>N0</b>	Sem metástase em linfonodos regionais	Sem metástase em linfonodos regionais
<b>N1</b>	Metástase em linfonodos regionais	Metástase em linfonodo ipsilateral único, $\leq 3$ cm em sua maior dimensão
<b>N2</b>	---	Metástase em linfonodo ipsilateral único, $> 3$ cm, mas $> 6$ cm, em sua maior dimensão; ou em múltiplos linfonodos ipsilaterais, nenhum $> 6$ cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum $> 6$ cm em sua maior dimensão.
<b>N2a</b>	---	Metástase em linfonodo ipsilateral único, $> 3$ cm, mas $> 6$ cm, em maior dimensão
<b>N2b</b>	---	Metástase em múltiplos linfonodos ipsilaterais, nenhum $> 6$ cm em sua maior dimensão
<b>N2c</b>	---	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum $> 6$ cm em sua maior dimensão
<b>N3</b>	---	Metástase em linfonodo $> 6$ cm em sua maior dimensão

Tabela 3 – Comparação entre as definições para 6<sup>a</sup>. e 7<sup>a</sup>. edições do sistema de estadiamento–metástase (M) – para carcinoma de células escamosas cutâneo, da *American Joint Committee on Cancer*

	<b>6a. Edição</b>	<b>7a. Edição</b>
<b>MX</b>	Metástase a distância não pode ser avaliado	Metástase a distância não pode ser avaliado
<b>M0</b>	Sem evidência de metástase a distância	Sem evidência de metástase a distância
<b>M1</b>	Metástase a distância presente	Metástase a distância presente

Tabela 4 – Comparação entre os estadiamentos por grupo para carcinoma de células escamosas cutâneo, relativo às 6<sup>a</sup>. e 7<sup>a</sup>. edições da *American Joint Committee on Câncer*

<b>Estágio</b>	<b>6a. Edição</b>			<b>7a. Edição</b>		
	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>0</b>	In situ	N0	M0	In situ	N0	M0
<b>I</b>	T1	N0	M0	T1	N0	M0
<b>II</b>	T2	N0	M0	T2	N0	M0
	T3	N0	M0			
<b>III</b>	T4	N0	M0	T3	N0 ou N1	M0
	Qualquer T	N1	M0	T1 ou T2	N1	M0
<b>IV</b>	Qualquer T	Qualquer N	M1	T1, 2 ou 3	N1	M0
				Qualquer T	N3	M0
				T4	Qualquer N	M0
				Qualquer T	Qualquer N	M1

Tabela 5 – Mudanças da Classificação do tumor (T) para carcinoma de células escamosas cutâneo, relativo às 6<sup>a</sup>. e 7<sup>a</sup>. edições da *American Joint Committee on Cancer*.

<b>Fatores</b>	<b>6<sup>a</sup> edição</b>	<b>7<sup>a</sup> edição</b>	<b>Comentários</b>
Limite de tamanho	T1 ≤ 2 cm 2 cm < T2 < 5 cm T3 ≥ 5 cm	Somente 2 cm Como cut off de Tamanho	Pequena evidência Da suporte 5cm como Importante tamanho
Grau Histopatológico	Não incluído (separado do sistema G não foi considerado no estadiamento)	Pior diferenciação é um dos fatores de alto Risco; G eliminado)	Estudos mostram que A baixa diferenciação é o principal fator prognóstico do CEC
Espessura e Nível de invasão	Somente T4 accounts Com invasão extradérmica	Clark Nível IV e ou espessura > 2mm são Caraterísticas de alto Risco	Tanto o nível de invasão quanto a espessura são fatores de risco significantes
Localização	Não incluído Excluídos, pálpebra e Lábio	Sítio primário orelha e lábio como fatores de alto risco incluído Lábio	Certos sítios anatômicos correlacionam-se com aumento da recorrência e potencial metastático.
		Um dos fatores de Alto risco	Correlacionam-se com aumento da recorrência local e metástases
Envolvimento do Osso facial e cranial	Não incluído	Invasão do osso temporal, maxilar, mandibular e orbital (T3)	Correlacionam-se com estadiamento de carcinoma de cabeça e pescoço.
Invasão da base do Crânio	Não incluído	T4	Estudos com doenças de pior prognóstico
Invasão do Esqueleto axial e Apendicular	Não incluído	T4	Correlacionam com pior prognóstico
Pálpebra	Não incluído	Estadiamento incluído TNM carcinoma Oftálmico	CEC de pálpebra é comum

## 1.8. ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS

Ao exame histopatológico, observa-se no CEC uma proliferação celular com ninhos de células epiteliais atípicas, com aspecto da camada espinhosa e córnea, com vários níveis de queratinização, formando as pérolas córneas e invadindo a derme em graus variados. Admite-se que quanto maior o grau de diferenciação, menor a tendência invasiva, e, desse modo, melhor o prognóstico. Na classificação de Broders, no grau I, a maioria das células é bem diferenciada, enquanto que no grau IV predominam as células indiferenciadas ou anaplásicas <sup>(30)</sup>.

As regiões mais profundas infiltrativas do CEC, conhecidas como frente de invasão tumoral (FIT), revelam, frequentemente, a presença de células neoplásicas malignas com menor grau de diferenciação e com um maior grau de dissociação, comparadas às demais regiões da mesma lesão. A graduação da intensidade das alterações morfológicas encontradas nessas regiões tem sido utilizada para estadiamento morfológico das malignidades, em especial, do CEC. <sup>(31)</sup> Há estudos que mostram que o FIT nos CEC em comparação com outras partes do mesmo, pode refletir melhor o prognóstico <sup>(33,34)</sup>.

O crescimento tumoral do FIT pode mostrar os seguintes padrões: expansivo e infiltrativo. O primeiro caracterizado pela presença de ilhas tumorais largas, com margens bem definidas que se projetam para a profundidade, sendo associado a melhor prognóstico e o segundo caracterizado por cordões ou células tumorais irregulares e escassas, com margens pobremente definidas, estando associado com curso clínico mais agressivo <sup>(30)</sup>.

A graduação do FIT é baseada na avaliação de parâmetros histológicos qualitativos: grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltração linfocitária <sup>(27)</sup>.

## 1.9. ASPECTOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS E MOLECULARES

Os CECs possuem abundância de citoqueratinas com proteínas de filamento intermediário com peso molecular em torno de 40 a 68 KD. As células dessas neoplasias são bem diferenciadas e sintetizam citoqueratinas de alto peso molecular, em contraste com tumores pobremente diferenciados que expressam citoqueratinas de baixo peso molecular. Desse modo, para a identificação dos queratinócitos, utilizam-se

anticorpos primários direcionados contra citoqueratinas de alto peso molecular como a citoqueratina 13 e panqueratinas<sup>(30)</sup>.

Os métodos imuno-histoquímicos são de considerável valor na diferenciação entre CEC pouco diferenciado e outros tumores mesenquimais dérmicos como o fibroxantoma atípico, histiocitoma fibroso maligno e melanoma maligno<sup>(36)</sup>.

Em contraste com o CEC, além da não expressão da citoqueratina, o fibroxantoma atípico e o histiocitoma fibroso maligno imunoexpressam vimentina e o melanoma apresenta positividade para a proteína S-100 e Melan-A<sup>(30)</sup>.

Quando há dúvida entre CEC e Linfoma, a positividade do antígeno leucocitário comum (LCA-CD45) afasta a hipótese do primeiro<sup>(30)</sup>.

O antígeno de membrana epitelial (EMA) é encontrado na maioria dos CECs e sua expressão difusa é usualmente expressa em tumores pobremente diferenciados (Broders grau 3 e 4)<sup>(36)</sup>.

Todos os CECs apresentam negatividade para a proteína S-100, cromogranina, sinaptofisina, CD99, CD57, HMB45, antiMelan-A e Ber-Ep4<sup>(36)</sup>.

Os marcadores imuno-histoquímicos, além do propósito de diagnóstico, têm sido utilizados para avaliar o potencial de transformação maligna e a evolução do CEC cutâneo. Vários estudos têm comparado a expressão de alguns marcadores em lesões in situ e invasivas, bem como com lesões metastáticas, levando a acreditar que alterações na expressão dos mesmos podem estar correlacionadas com aumento do potencial de malignidade. Entre os marcadores mais promissores estão o Ki-67 e o p53<sup>(31)</sup>.

Proteínas envolvidas com atividade de proliferação celular são importantes no processo tumorigênico, pois a expressão das mesmas pode indicar o grau de agressividade do tumor<sup>(88)</sup>. Atualmente, um dos marcadores mais utilizados na detecção de proliferação em várias neoplasias é o Ki-67. Além disso, a proteína p53 também participa no controle da proliferação e transformação e tem sido amplamente estudada<sup>(94)</sup>. Em relação ao FIT tumoral, há trabalhos com amostras de CEC oral que relatam expressão mais elevada do ki-67 e do p53 em áreas mais invasivas do tumor<sup>(82)</sup>, bem como associação com alto grau histológico quando essa mesma região foi avaliada<sup>(88)</sup>.

Moléculas de adesão celular, como as caderinas, fazem parte de uma classe de proteínas responsáveis pela regulação da adesão entre células epiteliais e pelo controle da morfogênese normal do tecido, incluindo segregação de subtipos celulares e a diferenciação e suporte da arquitetura tecidual. A expressão reduzida da E-caderina foi observada em vários tipos tumorais, incluindo os CECs<sup>(82)</sup>. Quando FIT foi avaliado,

uma expressão mais baixa foi encontrada em comparação com áreas mais superficiais de amostras de CEC oral <sup>(32,79,80)</sup>. Além disso, a expressão no FIT foi associada a uma pior sobrevida nesses pacientes <sup>(70)</sup>.

Ao considerar exclusivamente os trabalhos com CEC cutâneo, somente três estudos avaliaram o FIT, embora em nenhum deles esse tenha sido o foco da investigação. Fundyler et al. (2004) observaram expressão proteica elevada da MMP-2, com marcação intensa de infiltrados inflamatórios e áreas de neovascularização na região do fronte <sup>(94)</sup>. Enquanto Dang et al. (2006) avaliaram a tenascina C, uma outra proteína de matriz extracelular, e observaram a sua expressão elevada em células neoplásicas basais do fronte na junção derme-epiderme <sup>(83)</sup>. Já no estudo de Bowden et al. (2002), a expressão proteica elevada de VEGF, um fator de crescimento endotelial vascular, não foi associada a região do fronte <sup>(98)</sup>.

Com base na escassez de relatos abordando o FIT para CEC cutâneo, este estudo propõe avaliar a expressão proteica de marcadores atualmente utilizados na caracterização de neoplasias, como Ki-67, p53 e E-caderina na região mais profunda desses tumores em comparação com áreas mais superficiais.

## 2. BIBLIOGRAFIA\*

1. Farasat S, Yu SS, Neel VA, Nehal KS, Lardaro T, Mihm MC et al. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous squamous cell carcinoma: Creation and rationale for inclusion of tumor (T) characteristics. *J Am Acad Dermatol.* 2011;64 : 1051-1059.
2. Rogers HW, Weinstock MA, Harris AR, Hinckley MR, Feldman SR, Fletcher AB, Coldiron BM. Incidence Estimate of Nonmelanoma Skin Cancer in the United States, 2006. *Arch Dermatol.* 2010 ; 146(3):283-287.
3. Carneiro, VF, Figueiredo, GL, Soares, P.G.O.N. Carvalho, E de A, Ferrera, KN, Júnior, WFF, Moreira, RCL, Miyato, S, Cintia ,CA. Carcinoma Espinocelular cutâneo bem diferenciado: apresentação atípica *Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações* 2012; 10 ( 2) : 52-58.
4. Ministério da Saúde /Instituto Nacional do Câncer (INCA) [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)
5. Hawrot A, Alam M, Ratner SD. Squamous Cell Carcinoma. *Curr Probl Dermatol.* 2003;15: 85-134.
6. Elder DE, Elenitsas R, Johnson BL, Murphy GF, Xu X. *Lever's Histopathology of the Skin.* Lippincot and Williams & Wilkins. 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia, 2009.
7. Calonje JE, Brenn T, Lazar AJ, McKee PH. *Pathology of the Skin.* Hardcover, 2006
8. Karia PS, Han J, Schmults CD. Cutaneous squamous cell carcinoma: estimated incidence of disease, nodal metastasis, and deaths from disease in the United States, 2012. *J Am Acad Dermatol.* 2013 68(6):957-966.
9. Goldman GD. Cutaneous squamous cell carcinoma: a practical approach. *Semin Cutan Med Surg.* 1998;17(2):80-95
10. Swanson NA. Mohs surgery. Technique, indications, applications, and the future. *Arch Dermatol* 1983;119:761-773. 30. Centers for Medicare and Medicaid Services. Billing and Coding Guidelines for Mohs Micrographic Surgery
11. Swanson NA, Johnson TM. Management of basal and squamous cell carcinoma. In: Cummings C, ed. *Otolaryngology Head and Neck Surgery.* New York: Mosby Yearbook; 1998:486-501.
12. Raymond E, Campana K, Moy RL. Biology of curaneous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 1992;26:1-26.

13. Markey AC. Etiology and pathogenesis of squamous cell carcinoma. *Clin Dermatol.* 1995;13:537-543.
14. Garcia-Zuazaga J, Olbricht SM. Cutaneous squamous cell carcinoma. *Adv Dermatol.* 2008; 24:33-57.
15. Gurudutt VV, Genden EM. Cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Skin Cancer* 2011; 2011:502723.
16. Euvrard S, Kanitakis J, Claudy A. Skin cancers after organ transplantation. *N Engl J Med* 2003; 348:1681-1691.
17. Lott DG, Manz R, Koch C, Lorenz RR. Aggressive behavior of nonmelanotic skin cancers in solid organ transplant recipients. *Transplantation* 2010; 90:683-687.
18. Sampaio SAP, Rivitti EA. Tumores Epiteliais Malignos. In: *Dermatologia.* São Paulo:Artes Médicas Ltda, 2007:1163-9.
19. Connolly et al. Appropriate Use Criteria for Mohs Micrographic Surgery: A Report of the American Academy of Dermatology, American College of Mohs Surgery, American Society for Dermatologic Surgery Association and the American Society for Mohs Surgery *Dermatol Surg* 2012;38:1582–1603.
20. Kyrgidis A, Tzellos TG, Kechagias N, et al. Cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) of the head and neck: risk factors of overall and recurrence-free survival. *Eur J Cancer* 2010;46:1563-1572
21. Galloway TJ, Morris CG, Mancuso AA, et al. Impact of radiographic findings on prognosis for skin carcinoma with clinical perineural invasion. *Cancer* 2005;103:1254-1257
22. Schwartz RA. Premalignant keratinocytic neoplasms. *J Am Acad Dermatol,* 1996;35:223-42.
23. Maguire B, Smith NP. Histopathology of cutaneous squamous cell carcinoma. *Clin Dermatol.* 1995;13:559-568.
24. Rinker MH, Fenske NA, Scalf LA, Glass LF. Histologic variants of squamous cell carcinoma of the skin. *Cancer Control.* 2001;8:354-363
25. Yanofsky VR, Mercer SE, Phelps RG. Histopathological variants of cutaneous squamous cell carcinoma: a review. *J Skin Cancer.* 2011; Article ID 210813, doi:10.1155/2011/210813.

26. Banks ER, Cooper PH. Adenosquamous carcinoma of the skin: a report of 10 cases. *J Cutan Pathol* 1991;18:227-234.
27. Barr RJ. Classification of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 1991;18:225-226.
28. Nappi O, Pettinato G, Wick MR. Adenoid (acantholytic) squamous cell carcinoma of the skin. *J Cutan Pathol* 1989;16:114-121.
29. Chow CW, Tabrizi SN, Tiedemann K, Waters KD. Squamous cell carcinomas in children and young adults: a new wave of a very rare tumor? *J Pediatr Surg.* 2007; 42(12):2035-2039.
30. Connolly et al. Appropriate Use Criteria for Mohs Micrographic Surgery: A Report of the American Academy of Dermatology, American College of Mohs Surgery, American Society for Dermatologic Surgery Association and the American Society for Mohs Surgery *Dermatol Surg* 2012;38:1582–1603.
31. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasain A. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. IARC Press: Lyon 2006
32. De Paula AMB, Cardoso SV, Gómez RS. Eosinofilia tecidual na região do fronte invasivo do carcinoma de célula espinocelulares de boca: correlação com parâmetros clínico-patológicos. *Rev Odontol UNESP.* 2006; 35(3): 163-69.
33. Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Dis.* 1998;4(2):70-77.
34. Bryne M, Jenssen N, Boysen M. Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch.* 1995;427 (3):277-281.
35. Bankfalvi A, Piffko J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med* 2000;29:291–8.
36. Lourenço SQCL, Schueler AF, Camisasca DR, Lindenblatt RC, Bernardo VG Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: revisão dos sistemas propostos. *Rev Bras Cancerol* 2007;53(3):325-333.
37. Dabbs DJ. Diagnostic immunohistochemistry. Second Edition, Saunders, 2010.

38. Coaracy AEV, Lopes FF, Cruz MCFN, Bastos EG. Correlação entre os dados clínicos e histopatológicos os casos de carcinoma espinocelular oral do Instituto Maranhense e Oncologia Aldenora Bello, em São Luís, MA. *J Bras Patol Med Lab* 2008; 44(1):31-35.
39. Brougham ND, Dennett ER, Cameron R, Tan ST. The incidence of metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma and the impact of its risk factors. *J Surg Oncol.* 2012;106(7):811–815
40. Wong CY, Helm MA, Helm TN, Zeitouni N. Patterns of skin metastases: a review of 25 years, experience at a single cancer center. *Int J Dermatol* 2013. doi: 10.1111/j.1365-4632.2012.05635.x.
41. Ratushny V, Gober MD, Hick R, Ridky TW, Seykora JT. From Keratinocyte to cancer: the pathogenesis and modeling of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Clin Invest.* 2012;122(2):464-472.
42. Lapouge G, Uoussef KK, Vokaer B, Archouri Y, Michaux C, Sotiropoulou PA. Identifying the cellular origin of squamous skin tumors. *PNAS.* 2011;108(18):7431-6
43. Yuspa SH. The pathogenesis of squamous cell cancer: lesson learned from studies of skin carcinogenesis. *J Dermatol Sci.* 1998;17(1):1-7.
44. Jensen KB, Jones J, Watt FM. A stem cell gene expressions profile of human squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2008;272(1):23-31
45. Thieu K, Ruiz ME, Owens DM. Cells of origin and tumor-initiating cells for nonmelanoma skin cancers. *Cancer Lett.* 2012;11
46. Feller LL, Khammissa RR, Kramer BB, Lemmer JJ. Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. *Cancer Cell Int.* 2013;13(1):31
47. Perrotta RE, Giordano M, Malaguarnera M. Non-melanoma skin cancers in elderly patients. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2011;80(3):474-480.
48. Brodland DG. Diagnosis of nonmelanoma skin cancer. *Clin Dermatol* 1995;13: 551-557.

49. Sánchez G, Nova J. Risk Factors for Squamous Cell Carcinoma, A Study by the National Dermatology. *Actas Dermosifiliogr.* 2013 doi: 10.1016/j.ad.2013.01.005
50. Vinicius de LV, Scapulatempo C, Perpetuo NM, Mohamed F, de Carvalho TS, de Oliveira AT, Segalla JG, Carvalho AL. Prognostic and risk factors in patients with locally advanced cutaneous squamous cell carcinoma of the trunk and extremities. *J Skin Cancer.* 2011; doi: 10.1155/2011/420796. Epub 2011 May 19.
51. Kim RH, Armstrong AP. Nonmelanoma Skin Cancer. *Dermatol Clin* 2012;30: 125-139.
52. Yan W, Wistuba II, Emmert-Buck MR, Erickson HS. Squamous cell carcinoma – similarities and differences among anatomical sites. *Am J Cancer Res* 2011;1(3):275-300.
53. Sinclair R. Nonmelanoma skin cancer in Australia. *Br J Dermatol.* 2013;168 (1):1–2.
54. Gurudutt VV, Genden EM. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *J Skin Cancer.* 2011 doi:10.1155/2011/502723, Epub 2011 Feb 21.
55. Nuño-González A, Vicente-Martín FJ, Pinedo-Moraleda F, López-Estebanz JL. High-risk cutaneous squamous cell carcinoma. *Actas Dermosifiliogr.* 2012;103(7):567-578.
56. Asgari MM, Chren MM, Warton EM, Friedman GD, White E. Supplement use and risk of cutaneous squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol.* 2011;65(6):1145-1151
57. Kwon S, Dong ZM, Wu PC. Sentinel lymph node biopsy for high-risk cutaneous squamous cell carcinoma: clinical experience and review of literature. *World J Surg Oncol.* 2011, 9:80
58. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:167–178.

59. Kane SV, Gupta M, Kakade AC, D' Cruz A. Depth of invasion is the most significant histological predictor of subclinical cervical lymph node metastasis in early squamous carcinomas of the oral cavity. *Eur J Surg Oncol* 2006;32;795-803.
60. Bryne M. Prognostic value of various cellular and molecular features in oral squamous cell carcinomas: a review. *J Oral Pathol Med*. 1991;20: 414-420.
61. de Araújo Júnior RF, Barboza CAG, Clebis NK, de Moura SAB, Costa ALL. Prognostic significance of the anatomical location and TNM classification in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13(6):E344-347.
62. Bryne M, Boysen M, Alfsen CG, Abeler VM, Sudbø J, Nesland JM, Kristensen GB, Piffko J, Bankfalvi A. The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis? *Anticancer Res*. 1998;18(6B):4757-4764.
63. Varela-Centelles PI, Seoane J, Vázquez Fernández E, De La Cruz A, García Asenjo JA. Survival to oral cancer. A study of clinical risk markers with independent prognostic value. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol*.2002;44(2):46-51
64. Perrotta RE, Giordano M, Malaguarnera M. Non-melanoma skin cancers in elderly patients. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2011;80:474-480.
65. Nuno-Gonzalez A, Vicente-Martin FJ, Pinedo-Moraleda F, Lopez-Estebarez JL. High-risk cutaneous squamous cell carcinoma. *Actas Dermosifogr*. 2012;103(7):567-578.
66. Jensen V, Prasad AR, Smith A, Raju M, Wendel CS, Schmelz M, Leyva W, Warneke J, Krouse RS. Prognostic Criteria for Squamous Cell Cancer of the Skin. *J Surg Res*. 2010;159(1):509-516.
67. Horta MPR, Assis LA, Souza AF, Araújo-Gómez SR, Aguiar MCF. p53 and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> overexpression at the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2007;36: 88–92.
68. Matsuta M, Kon S, Sasaki,K, Matsuta M. Immunohistochemical detection of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p53 proteins in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections of squamous cell carcinoma of the skin. *J Dermatol Sci*. 1997;14(3):233-9

69. Kurokawa, H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita, Tanaka, T. The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34(10):602-7.
70. Piffkò J, Bãnkfalvi A, Ofner D, Bryne M, Rasch D, Joos U, Böcker W, Schmid KW. Prognostic value of histobiological factors (malignancy grading and AgNOR content) assessed at the invasivetumour front of oral squamous cell carcinomas. *Br J Cancer.* 1997;75(10):1543-6
71. Wang X, Zhang J, Fan M, Zhou Q, Deng H, Aisharif MJ, Chen X. The expression of E-cadherin at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR analysis with clinicopathological correlation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(4):547-554.
72. de Araújo RF Jr, Barboza CA, Clebis NK, de Moura SA, Lopes Costa Ade L. Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical classification in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008;13(6):E344-347.
73. Dib LL, Sabba LMB, Marques LA, Araújo NS. Fatores prognóstico sem carcinoma de borda de língua: análise clínica e histopatológica. *Acta Oncol Bras.* 1994;14:88-93.
74. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R. New malignancy grading is a better prognostic indicator than “Broders” grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol. Med* 1989; 18: 432-7
75. Araújo Júnior RF, Costa A de LL, Ramos CCF. Clinical- pathological parameters as prognostic indicators in oral squamous cell]. *Pesq Bras Odontoped Clin Integr.* 2006 May- Aug; 6 (2):125-30.
76. Chang Y-C, Nieh S, Chen S-F, Jao SW, Lin YL, Fu E. Invasive pattern grading score designed as an independent prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2010 Aug;57(2):295-303
77. Araújo-Júnior RF, Barboza CA, Clebis NK, Moura SA, Costa AL. Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical classification in oral

- squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 Jun1; 13(6):E344-7.
78. Kristensen GB, Abeler VM, Risberg B, Trop C, Bryne M. Tumor size, depth of invasion, and grading of the invasive tumor front are the main prognostic factors in early squamous cell cervical carcinoma. *Gynecol Oncol*. 1999;74(2):245-251.
79. Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tanaka T, Takamori K, Igawa K, Yoshida M, Fukuyama H, Takahashi T, Sakoda S.. Reduced syndecan-1 expression is correlated with the histological grade of malignancy at the deep invasive front in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2006;35(5):301-6.
80. Williams HK, Sanders DS, Jankowski JA, Landini G, Brown AM. Expression of cadherins and catenins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1998;27: 308.
81. Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Grieco M, Mignogna MD, Cerrato A, et al. Beta- and gamma-catenin expression in oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 1999;19: 3817-26.
82. Bankfalvi A, Krassort M, Buchwalow IB, Vegh A, Felszeghy E, Piffko J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, Ecadherin, and beta-catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. *J Pathol* 2002; 198:343-51.
83. Hajra KM, Fearon ER. Cadherin and catenin alterations in human cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; 34:255-68.
84. Mărgăritescu C, Simionescu C, Pirici D, Mogoantă L, Ciurea R, Stepan A. Immunohistochemical characterization of tumoral vessels in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2008;49(4):447-458.
85. Piffkó J, Bánkfalvi A, Ofner D, Kusch F, Böcker W, Joos U, Schmid KW. In situ assessment of cell proliferation at the invasive front of oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 1996;429:229-234.
86. Vogelstein B, Kinzler KW. P53 function and dysfunction. *Cell* 1992;70:523-526.
87. Shimizu T, Murakami T, Oga A, Furumoto H, Nakano J, Muto M. Prognostic significance of expression of p53 protein and Ki-67 antigen in well-

- differentiated squamous cell carcinoma of the skin. *J Dermatol.* 1999;26(12):837-40.
88. Carlos de Vicente J, Herrero-Zapatero A, Fresno MF, López-Arranz JS.. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. *Oral Oncol.* 2002;38(3):301-308
89. Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. The relationship of proliferating cell density at the invasive tumor front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 204–8.
90. Moriyama-Kita M, Endo Y, Yonemura Y, Heixmann CW, Miyamori H, Sato H, Yamamoto E, Sasaki T. S100A4 regulates E-cadherin expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2005; 230 (2):211-218.
91. Beltrami CA, Desinan L, Rubini C. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. A retrospective study of 80 cases. *Pathol Res Pract* 1992;188:510-516.
92. Tralongo V, Rodolico V, Luciani A, Marra G, Daniele E. Prognostic factors in oral squamous cell carcinoma. A review of the literature. *Anticancer Res.* 1999;19(4C):3503-3510.
93. Fransen M, Karahalios A, Sharma N, English DR, Giles GG, Sinclair RD. Non-melanoma skin cancer in Australia. *Med J Aust.* 2012;197(10):565–568.
94. Vogelstein B, Kinzler KW. p53 function and dysfunction. *Cell.* 1992;70(4):523-526.
95. Fundyler O, Khanna M, Smoller BR. Metalloproteinase-2 expression correlates with aggressiveness of cutaneous squamous cell carcinomas. *Mod Pathol.* 2004; 17(5):496-502.
96. Dang C, Gottschling M, Roewert J, Forschner T, Stockfleth E, Nindl I. Tenascin-C patterns and splice variants in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2006;155(4):763-770.
97. Bowden J, Brennan PA, Umar T, Cronin A. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cutan Pathol.* 2002;29(10):585-9.

98. Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR, et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. *Clin Cancer Res* 2004; 10:5455-63.
99. Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, Manni JJ, van 't Hof- Grootenboer B, de Mulder PH, et al. E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. *Int J Cancer* 1993;55: 580-5.
100. Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara S, Shirasuna K, et al. Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behaviour. *J Pathol* 1998;184:369-81.

**CAPÍTULO II**  
**Artigo científico**

AValiação DAS CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS E IMUNO-  
HISTOQUÍMICAS DO FRONTE DE INVASÃO TUMORAL DO CARCINOMA  
ESPINOCELULAR CUTÂNEO DE CABEÇA E PESCOÇO E SUA IMPORTÂNCIA  
NO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS LESÕES

Juliana Carneiro Melo<sup>1</sup>, Luciana Abadde<sup>2</sup>, Mariângela E. A. Marques<sup>3</sup>

- 1- Médica Patologista, Programa de Pós-graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista
- 2- Professora Livre Docente do Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista
- 3- Professor Livre Docente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista

Trabalho realizado no Hospital de Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista (UNESP)

Autor correspondente:

Dra. Mariângela Éster A. Marques

Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – Universidade Estadual Paulista

Distrito de Rubião Júnior, CEP: 18618-970, Botucatu, São Paulo, Brasil.

Telefone: +55 (14) 3882-4922      Fax: +55 (14) 3882-4922

e-mail: [mmarques@fmb.unesp.br](mailto:mmarques@fmb.unesp.br)

**Apoio financeiro da Fundação de amparo à pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)- Processo: 11-50660-1**

Trabalho aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP (Protocolo CEP 3471-2010).

Não há conflito de interesses.

De acordo com a revista Anais Brasileiros de Dermatologia.

## RESUMO

**Introdução:** O carcinoma espinocelular (CEC) é tumor maligno das células espinhosas da epiderme caracterizado por evolução mais rápida, maior poder invasivo e metastático em relação ao carcinoma basocelular (CBC). A área mais profunda e infiltrativa do CEC, conhecida como frente de invasão, revela células neoplásicas malignas com menor grau de diferenciação comparadas à totalidade da lesão. Estudos recentes demonstram a influência do padrão do frente de invasão tumoral no prognóstico de CEC de laringe e colo uterino. Contudo, não há estudos sobre o mesmo em relação a CEC cutâneos de cabeça e pescoço. **Objetivos:** Estudar as características clínicas, histopatológicas e perfil imuno-histoquímico do CEC de cabeça e pescoço e frente de invasão tumoral, correlacionando-o com comportamento biológico. **Métodos:** O estudo foi do tipo coorte retrospectivo, sendo selecionados os pacientes que tiveram diagnóstico de CEC de cabeça e pescoço confirmados pelo exame anatomopatológico no período de 1999 a 2009. A avaliação do frente de invasão tumoral foi realizada empregando-se imuno-histoquímica para E-caderina, ki-67 e p53. **Resultados:** O tipo de frente de invasão, bem como as expressões de E-caderina e ki-67, seja em sítio superficial ou profundo, não apresentaram associação com os critérios prognósticos histopatológicos. Os achados mostraram que a E-caderina, o p53 e o ki-67 foram mais expressos em tumores com tamanho > 2cm. Em relação a espessura do tumor, observamos que o p53 foi mais expresso na profundidade nas lesões mais espessas (índice de Breslow maior que 2mm), e que foi acompanhada também pela expressão maior do Ki-67. A expressão de p53 em sítio superficial teve associação inversa com o critério de espessura ( $p < 0,049$ ) e, em sítio profundo, teve associação direta com a intensidade do processo inflamatório local ( $p < 0,046$ ). O tipo de frente de invasão, bem como as expressões de E-caderina, ki-67 e p53, em sítios superficial e profundo, não demonstraram impacto na sobrevida livre de doença. **Conclusão:** As características do frente de invasão tumoral não se correlacionaram com prognóstico, em CEC cutâneos de cabeça e pescoço no presente estudo.

**Palavras chaves:** Histopatologia; Imuno-histoquímica; Carcinoma Espinocelular, Frente de Invasão Tumoral.

## ABSTRACT

**Introduction:** The Squamous Cell Carcinoma (SCC) is a malignant epidermal tumor of squamous epithelial cells, characterized for greater aggressiveness much higher incidence of metastasis than Basal Cell Carcinoma (BCC). The deepest invading tumor area, known as invasive tumor front usually disclose less differentiated malignant cells, compared with the whole lesion. Recent studies demonstrate the influence of the invasive tumor front pattern on the prognosis of larynx and uterine cervix SCC. However, there is no studies about that on cutaneous SCC of the head and neck. **Objectives:** To study the clinical, histopathological and immunohistochemical profile of the SCC from head and neck and its invasive tumor front, correlating it with its biological behavior. **Methods:** The study was a retrospective type coorte, where the patients with histopathological diagnosis of head and neck cutaneous SCC among 1999 to 2009 were selected. The evaluation of invasive tumor front was immunohistochemistry for E-cadherin, ki-67 and p53. **Results:** The pattern of invasive tumor front, as well as E-cadherin and ki-67 expressions, at superficial and deep sites, did not present association with histopathological prognostic criteria. The findings showed that E-cadherin, p53 and Ki-67 were more highly expressed in tumors with size > 2cm. Regarding the thickness of the tumor, we observed that p53 was expressed in depth in thicker lesions (Breslow thickness greater than 2 mm), which was also accompanied by higher expression of Ki-67. p53 expression, at superficial site, had inverse association with thickness criteria ( $p < 0,049$ ) and, at deep site, had direct association with local inflammatory process intensity ( $p < 0,046$ ). The invasive tumor front, as well as E-cadherin, ki-67 and p53 expressions, at superficial and deep sites, did not demonstrate impact on free disease survival. **Conclusion:** The characteristics of invasive tumor front did not correlate with prognosis in cutaneous SCC of the head and neck regarding to the present study.

**Keywords:** Histopathology; Immunohistochemistry; Squamous Cell Carcinoma, Invasive tumor Front.

## INTRODUÇÃO

O câncer de pele não melanoma (CPNM) é a neoplasia maligna mais comum no Brasil, sendo 80% representada por tumores derivados das células não queratinizadas que originam a camada basal da epiderme- Carcinoma Basocelular (CBC) enquanto cerca de 20% surgem de proliferação atípica de queratinócitos suprabasais - Carcinoma Espinocelular (CEC).<sup>(1)</sup>

O CEC representa um significativo problema de saúde pública, cuja incidência, morbidade, mortalidade e custos associados aumentam a cada ano<sup>(2)</sup>. Embora a maioria seja facilmente tratada, com alta taxa de cura (90-95 %), uma minoria substancial das lesões podem apresentar recorrência ou metástase<sup>(3)</sup>.

Patologistas têm observado que as células tumorais encontradas nas partes mais invasivas do CEC diferem substancialmente daquelas encontradas na superfície/centro.<sup>(4)</sup> Desse modo, as regiões mais profundas infiltrativas do CEC foram denominadas como frente de invasão tumoral (FIT). O FIT revela, frequentemente, a presença de células neoplásicas malignas com menor grau de diferenciação e com um maior grau de dissociação, comparadas às demais regiões do tumor<sup>(5)</sup>.

O crescimento tumoral no FIT pode mostrar os seguintes padrões: expansivo e infiltrativo. O primeiro, caracterizado pela presença de ilhas tumorais largas, com bordas bem definidas que se projetam para a profundidade, sendo associado a melhor prognóstico e o segundo, caracterizado por cordões ou células tumorais irregulares e escassas, com margens pobremente definidas, estando associado com curso clínico mais agressivo.<sup>(5)</sup>

A graduação da intensidade das alterações morfológicas encontradas no FIT tem sido utilizada para estadiamento morfológico das malignidades, em especial, do CEC<sup>(6)</sup>. Há estudos que mostram que o FIT nos CEC em comparação com outras partes do mesmo pode refletir melhor a avaliação do prognóstico<sup>(6,7)</sup>.

Ao considerar exclusivamente os trabalhos com CEC cutâneo, somente três estudos avaliaram o FIT, embora em nenhum deles esse tenha sido o foco da investigação. Fundyler et al. (2004) observaram expressão proteica elevada da metaloproteinase-2 (MMP-2), proteína da matriz extracelular, com marcação intensa de células tumorais na região do FIT tanto em áreas próximas de infiltrados inflamatórios como em áreas de neovascularização<sup>(8)</sup>. Por sua vez, Dang et al. (2006) avaliaram a

tenascina C, uma outra proteína de matriz extracelular, e observaram a sua expressão elevada em células neoplásicas do FIT <sup>(9)</sup>. Já no estudo de Bowden et al. (2002), a expressão proteica elevada de VEGF, um fator de crescimento endotelial vascular, não foi associada à região do fronte <sup>(10)</sup>.

Com base na escassez de relatos abordando o FIT para CEC cutâneo, este projeto propõe avaliar a expressão proteica de marcadores atualmente utilizados na caracterização de neoplasias, como Ki-67, p53 e E-caderina na região mais profunda desses tumores em comparação com áreas mais superficiais.

O objetivo maior deste estudo foi padronizar o FIT nos CECs cutâneos de cabeça e pescoço, avaliar a possível utilidade desse parâmetro morfológico no estadiamento desses tumores, bem como correlacioná-lo com as características clínicas e comportamento biológico.

## **MÉTODO**

### **PACIENTES**

Observacional retrospectivo com 79 amostras de CEC cutâneos de cabeça e pescoço de 57 pacientes atendidos e tratados, entre 1999 a 2009, no serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Botucatu Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Pacientes com diagnóstico de CEC primários, que foram acompanhados por, no mínimo, 1 ano após o diagnóstico, que não se encontravam em uso de imunossupressores e que haviam sido tratados exclusivamente por ressecção cirúrgica (excluídos os que haviam sido submetidos a radioterapia).

Os pacientes incluídos na análise foram uma amostra não probabilística de uma população geradora de difícil delimitação geográfica em razão da fonte de seleção ser um centro de referência e atender pacientes de vários municípios.

Os CEC foram confirmados por exame anatomopatológico.

Serviços de Dermatologia e de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu Universidade Estadual Paulista (UNESP).

### **VARIÁVEIS**

As variáveis estudadas foram:

**- Variáveis sóciodemográficas**

- Sexo, Idade de aparecimento do tumor, cor, tabagismo e/ou etilismo atual, histórico prévio de outras neoplasias.

**- Variáveis clínicas**

- Número, tamanho, local e tempo de evolução das lesões; presença ou não de gânglio linfático clinicamente alterado e eventual localização deste, presença de metástases loco-regionais e/ou a distância, tempo de seguimento, presença de recidiva ou não)

**- Variáveis anatomopatológicas**

- Tipo histológico; presença ou não de ulceração; classificação de Broders, Breslow e Clark; presença ou não de invasão perineural e/ou perivascular; avaliação de margens cirúrgicas microscópicas; medidas da menor margem profunda e menor margem lateral; presença ou não de infiltrado inflamatório; frente de invasão tumoral (expansivo/ infiltrativo); em caso de frente tumoral infiltrativo, presença ou não de células tumorais isoladas.

**- Variáveis imuno-histoquímicas**

- Expressão da E-caderina, p 53 e ki-67 na superfície e na profundidade. Todas estas variáveis ordinais foram avaliadas em quatro grupos, conforme a intensidade da imunomarcção, em 1+, 2+, 3+ e 4+. As de intensidade +1 e +2 foram consideradas como de fraca intensidade e as +3 e +4, forte intensidade.

-Expressão do (AE1/AE3) marcador constituído por mistura entre dois diferentes clones, AE1 e AE3, os quais detectam queratinas de alto e baixo peso molecular ,utilizado no sentido de facilitar a caracterização do frente de invasão tumoral e na detecção de células epiteliais neoplásicas isoladas especialmente nos frentes de invasão infiltrativos.

**IMUNO-HISTOQUÍMICA**

As amostras foram fixadas em blocos de parafina. Foram seccionadas com navalha de aço inox 77x88mm na espessura de 3µm e os cortes estendidos sobre 4

lâminas histológicas de vidro 76x26mm/3x1, foscas, previamente tratadas com VectaBond®, sendo uma lâmina para cada marcador. Inicialmente, as secções de tecido foram desparafinizadas e reidratadas através de graduação alcoólica. Então, a peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio 3% por 10 minutos em temperatura ambiente seguida da recuperação antigênica com solução Trilogy (Cell Marque) em panela pressurizada (Pascal-Dako) por 3 minutos. Os anticorpos primários utilizados foram: AE1/AE3 (clone AE1/AE3, Cell Marque) pronto para uso; anti-Ki-67 (clone SP6, Cell Marque) pronto para uso, anti-p53 (Clone DO-7, Cell Marque) e E-caderina (clone NCH, Cell Marque). A incubação dos anticorpos primários de cada marcador foi realizada por um período de 45 minutos. Para os anticorpos secundários e terciários, foi utilizado sistema de amplificação para camundongo e coelho por 10 minutos em temperatura ambiente (HiDef Detection System Cell Marque). Os imunomarcadores foram revelados pelo cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB Substrate Kit Cell Marque) e a contra-coloração realizada com hematoxilina de Harris (Merck). Finalmente, os cortes sofreram desidratação em álcoois graduados, finalizando com xilol para diafanização. As lâminas foram montadas com lamínulas 24x32 (Knittel) por meio de resina sintética Permount (Fisher).

Para reduzir o erro sistemático de informação e o vício de informação, a revisão das lâminas arquivadas no serviço de Patologia da mesma instituição e coradas pela hematoxilina e eosina (HE) foi realizada por dois avaliadores de forma cega, isto é, sem o conhecimento da evolução clínica e do diagnóstico final dos pacientes.

## **ANÁLISE DE DADOS**

As associações entre tipo de frente de invasão (FIT), expansivo/ infiltrativo e expressões de E-caderina, e p53, em sítios superficial e profundo, foram estudadas por teste exato de Fisher.

As associações entre parâmetros relacionados ao tumor (incluindo critérios de pior prognóstico conforme a 7ª edição da AJCC) e o tipo de FIT (expansivo/ infiltrativo), bem como com a imunomarcagem (fraca/ forte intensidade) de E-caderina, ki-67 e p53, na superfície e na profundidade, foram avaliadas pelas técnicas não paramétricas de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher. Seguidamente, as associações estatisticamente significantes foram avaliadas sobre seu impacto na sobrevida, através do modelo semiparamétrico de Cox. Em caso de impossibilidade de uso deste e/ou

ausência de associações entre as variáveis previamente estudadas, o teste de Log Rank foi empregado para analisar a relação entre tipo de frente de invasão (expansivo/infiltrativo), imunomarcção (fraca/ forte intensidade) de E-caderina, ki-67 e p53, na superfície e na profundidade, e a sobrevida livre de doença.

Diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ . Análise estatística feita com o software SPSS, v.15.

## ÉTICA

Trabalho aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP (Protocolo CEP 3471-2010) (Anexo 1).

## RESULTADOS

Foram selecionados 61 pacientes com 100 tumores do tipo CEC cutâneo primário de cabeça e pescoço. Foram excluídos 21 tumores por não obedecerem aos critérios de inclusão e exclusão, permanecendo no estudo 57 pacientes e 79 tumores para serem avaliados clínica e histopatologicamente. O FIT foi avaliado em 53 dos 79 tumores incluídos no estudo.

Na tabela 1, observamos que em 42,1 % dos pacientes eram do sexo feminino e 57,9 % eram do sexo masculino com variação de idade entre 37 e 92 anos, todos de cor de cor branca com uma minoria tabagista (21,1%) e etilista (3,6%). Outras neoplasias prévias foram observadas em 54,4% dos pacientes. O tempo entre o diagnóstico e a última consulta foi de 50,9 %, no intervalo de 0-5 anos e 45,6% no intervalo de 6-10 anos. Dentre os 57 pacientes, sete apresentaram recidiva (12,2%) e três evoluíram a óbito, porém nenhum deles por causas relacionados ao CEC.

A tabela 2, mostra a descrição dos tumores, segundo informações clínicas. Ao analisar os gânglios linfáticos, observou-se que havia oito aumentados de tamanho clinicamente (10,1%); desses, dois eram de localização submandibular e seis eram de localização cervical, porém apenas dois desse último grupo apresentaram metástases regionais. Além dessas duas metástases regionais, houve apenas uma metástase a distância.

Analisando a tabela 3, temos que em relação ao subtipo histológico do CEC ,88,6% eram do tipo usual e 13,3% do tipo acantolítico. E na maioria observou-se ulceração (65,8%),

Quanto ao grau de Broders, observamos que 51,9% eram bem diferenciados (figura 1a), 34,2 % moderadamente diferenciados (figura 1b) ,3,8% pouco diferenciado e 8,8% indiferenciados.

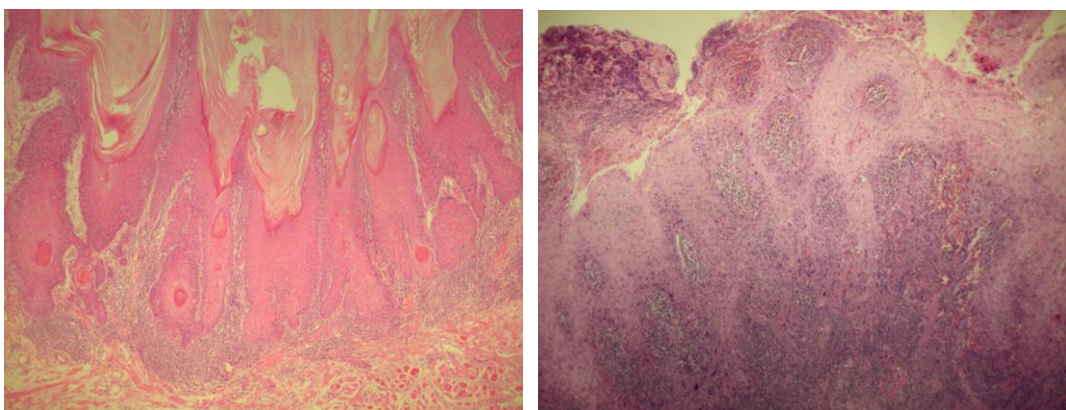


Foto 1: a) CEC bem diferenciado ; b)CEC moderadamente diferenciado.

O nível de Clark mais observado foi o IV, com 51,9 % dos pacientes, seguido do nível V, com 29,1% dos pacientes.

Cinco tumores apresentaram invasão perineural (6,3%) e sete (8,9%) possuíam invasão perivascular.

Ao analisar as margens, constatou-se que 73% das mesmas estavam livres e 15,2 % comprometidas. Quanto a menor margem profunda, a média foi de 2,0 cm, enquanto a menor margem lateral , a média foi de 2,3cm.

O infiltrado inflamatório variou em intensidade, sendo em 44,3 % de intensidade leve, em 33,9% moderada e 22,8% intensa.

Quanto ao FIT, foi observado que 40,5% eram do tipo expansivo (foto 2), 26,6% do tipo infiltrativo. O FIT não foi avaliado em 32,9% do casos por desgaste dos blocos, impossibilitando desse modo a realização do estudo imuno-histoquímico proposto na secção métodos. Dentre os FIT infiltrativos (figura 3), 81% eram do tipo que apresentavam células isoladas e 19%, sem células isoladas.

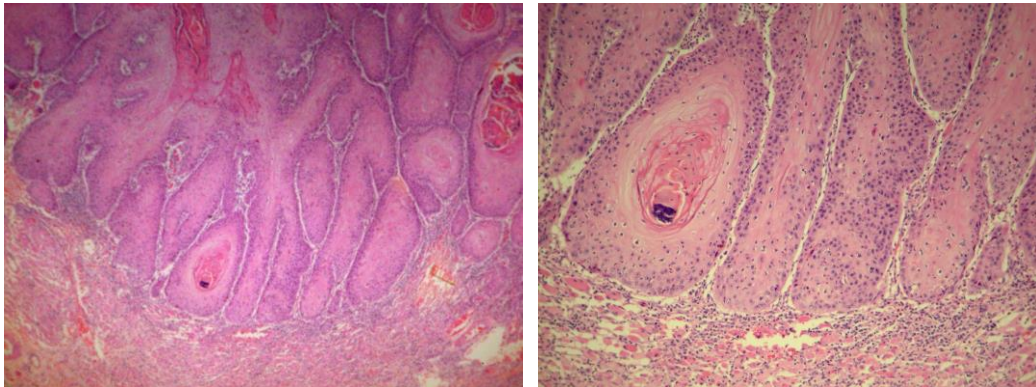


Figura 2: a) FIT expansivo; b) detalhe do FIT expansivo.

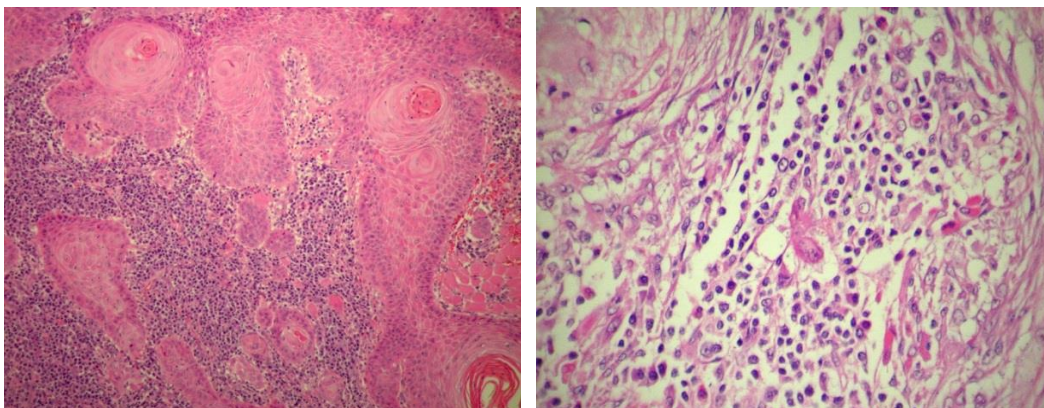


Figura 3: a) FIT infiltrativo sem células isoladas ; b) FIT infiltrativo com células isoladas.

Na tabela 4, observa-se que tanto o FIT infiltrativo quanto o expansivo, ocorreram mais no sexo masculino, CEC tipo usual, grau bem diferenciado e infiltrado inflamatório de leve intensidade. Ambos os FIT apresentaram em sua maioria tamanho  $\leq 2\text{cm}$ , relação Clark  $\geq \text{IV}$  e Breslow  $> 2\text{mm}$  e margens livres. Analisando os dois casos com linfonodos acometidos, observou-se que um deles correspondia a FIT expansivo e um ao FIT infiltrativo. Não foram observadas metástases nos casos em que foi avaliado o FIT. Em relação a invasão perivascular e perineural, observou-se um caso de invasão perivascular com FIT expansivo e um caso de invasão perineural com FIT infiltrativo.

Tabela 1 – Descrição dos pacientes segundo características sócio-demográficas (n=57)

<b>Sóciodemográfica</b>	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Sexo</b>		
Feminino	24	42,1
Masculino	33	57,9
<b>Idade # (anos)</b>		69 (37 - 92)
<b>Cor</b>		
Branca	57	100
Parda	0	0,0
<b>Tabagismo atual</b>		
Não	44	77,2
Sim	12	21,1
Sem informação	1	1,8
<b>Etilismo atual</b>		
Não	54	94,7
Sim	2	3,5
Sem informação	1	1,8
<b>Outras neoplasias</b>		
Não	26	45,6
Sim	31	54,4
<b>Tempo entre diagnóstico e última consulta (anos)</b>		
De 0 a 5	29	50,9
De 6 a 10	26	45,6
Sem informação	2	3,5
<b>Recidiva</b>		
Não	45	78,9
Sim	7	12,2
Sem informação	2	3,5
<b>Óbito</b>		
Não	54	94,7
Sim (Nenhuma devido ao CEC)	3	5,3

# Mediana (Mínimo-Máximo)

Tabela 2– Descrição dos tumores segundo informações clínicas (n=79)

<b>Informações clínicas</b>		
<b>Tempo de duração das lesões</b>		12,0 (1,0 – 120,0)
<b>Gânglio linfático clinicamente aumentado</b>		
Não	69	87,3
Sim	8	10,1
Sem informação	2	2,6
<b>Localização do linfonodo aumentado (n = 8)</b>		
Cervical	6	75,0
Submandibular	2	25,0
<b>Metástase</b>		
Não	76	96,2
Regional – cervical	2	2,5
À distância	1	1,3

# Mediana (Mínimo-Máximo)

**Tabela 3 – Descrição dos tumores segundo informações histopatológicas (n=79)**

<b>Histopatológico</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Tipo do CEC</b>		
Usual	70	88,6
Acantolítico	9	11,3
<b>Ulceração</b>		
Não	27	34,1
Sim	52	65,8
<b>Grau de Broders</b>		
Bem diferenciado	42	53,6
Moderadamente diferenciado	27	34,2
Pouco diferenciado	3	3,8
Indiferenciado	7	8,8
<b>Índice de Breslow</b>	3,0 (0,4 - 13,0)	
<b>Nível Clark</b>		
Nível II	2	2,5
Nível III	13	16,5
Nível IV	41	51,9
Nível V	23	29,1
<b>Invasão perineural</b>		
Não	74	93,7
Sim	5	6,3
<b>Invasão perivascular</b>		
Não	72	91,1
Sim	7	8,9
<b>Condição das margens</b>		
Livres	67	73,4
Comprometidas	12	15,2
<b>Menor margem profunda</b>	2,0 (0,2 - 10,0)	
<b>Menor margem lateral</b>	2,3 (0,4 - 9,5)	
<b>Infiltrado inflamatório</b>		
Leve	35	44,3
Moderado	26	32,9
Intenso	18	22,8
<b>Fronte de invasão</b>		
Expansivo	32	40,5
Infiltrativo	21	26,6
Não avaliado	23	32,9
<b>Células isoladas nas invasões infiltrativas (n = 21)</b>		
Não	4	19,0
Sim	17	81,0

Tabela 4 - Associação entre variáveis do tumor e tipo de frente de invasão (n=53)

Variável	Frente de invasão		p <sup>(1)</sup>
	Expansivo (n=23)	Infiltrativo (n=30)	
<b>Sexo</b>			
Masculino	16	19	0,635
Feminino	7	11	
<b>Linfonodo acometido</b>			
Não	22	28	1,000
Sim	1	2	
<b>Metástase à distância</b>			
Não	23	30	1,000
Sim	0	0	
<b>Tipo de CEC</b>			
Usual	21	28	1,000
Acantolítico	2	2	
<b>Intensidade de processo inflamatório</b>			
Leve	12	14	0,931
Moderada	7	11	
Intensa	4	5	
<b>Tamanho do tumor (7º edição)</b>			
≤ 2cm	15	18	0,652
>2cm	3	2	
Sem informação	3	10	
<b>Grau histopatológico (7º edição)</b>			
Bem ou moderadamente diferenciado	22	28	1,000
Pouco diferenciado ou indiferenciado	1	2	
<b>Espessura, nível de invasão (7º edição)</b>			
Clark < IV ou Breslow ≤ 2mm	8	4	0,168
Clark ≥ IV e Breslow > 2mm	11	18	
Sem informação	2	8	
<b>Invasão perineural (7º Edição)</b>			
Não	22	30	0,434
Sim	1	0	
<b>Invasão perivascular</b>			
Não	23	29	1,000
Sim	0	1	
<b>Condição das margens</b>			
Livres	20	28	0,642
Comprometidas	3	2	
<b>Células isoladas nas invasões infiltrativas</b>			
Não	0	5	
Sim	0	25	

(1) Teste exato de Fisher ou Qui-quadrado.

Na tabela 5, observa-se que o tempo médio entre o diagnóstico e a recidiva é similar para os casos com FIT expansivo ( $8,5 \pm 0,3$ ) e casos com FIT infiltrativo ( $8,5 \pm 0,7$ ).

**Tabela 5 – Sobrevida livre de doença em função do tipo de frente de invasão tumoral (n=53)**

	Frente		$p^{(1)}$
	Expansivo	Infiltrativo	
Tempo entre diagnóstico até a recidiva (anos)	$8,5 \pm 0,3$	$8,5 \pm 0,7$	0,363

(1) Teste de Log Rank

Foram realizadas correlações entre as variáveis analisadas na tabela 4 com os marcadores imuno-histoquímicos E-caderina, p53 e ki-67 (Vide anexo 2), estudando a intensidade de marcação dos mesmos em região superficial e profunda. Apenas em duas circunstâncias foram demonstradas associações, sendo elas entre a marcação do p53 na região superficial e o nível de invasão e entre a do p53 na região profunda e o grau de infiltrado inflamatório.

A Tabela 6 mostra que a E-caderina é concordante, com expressão de fraca intensidade, na superfície e na profundidade em 70 % nos FIT infiltrativos contra 61% dos FIT expansivos e forte, na superfície e profundidade em 22% dos expansivos contra 17 % dos infiltrativos Os demais apresentaram padrão de imunexpressão discordante, forte na superfície e fraco na profundidade (Figura 4), em 17 % dos FIT expansivos contra 13 % dos FIT infiltrativos .

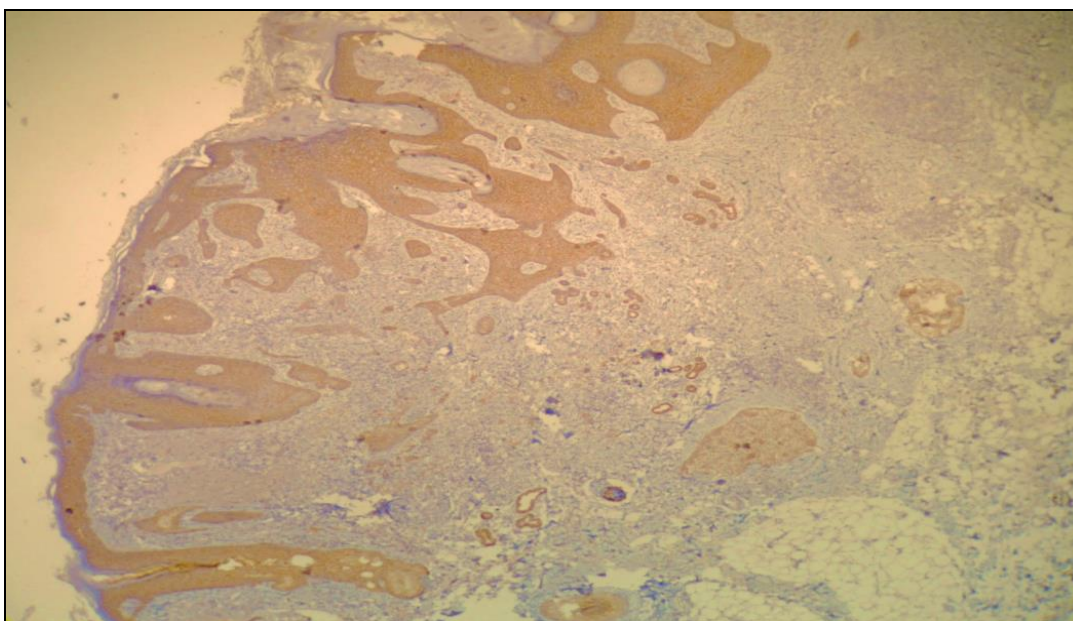


Figura 4: Marcador imuno-histoquímico E-caderina mostrando marcação forte na superfície e fraca na profundidade.

Em relação ao p53, observa-se que o mesmo é concordante, com expressão fraca, na superfície e profundidade em 52% dos FIT expansivos e em 50% dos FIT infiltrativos e forte, na superfície e profundidade em 14% dos expansivos contra 10 % dos infiltrativos. No restante, observou-se que 30 % dos FIT expansivos contra 17% dos FIT infiltrativos apresentaram padrão de expressão fraco na superfície e forte na profundidade. A minoria 4% dos FIT expansivos e 3% dos FIT infiltrativos exibiu padrão de expressão forte na superfície e fraco na profundidade (Figura 5).

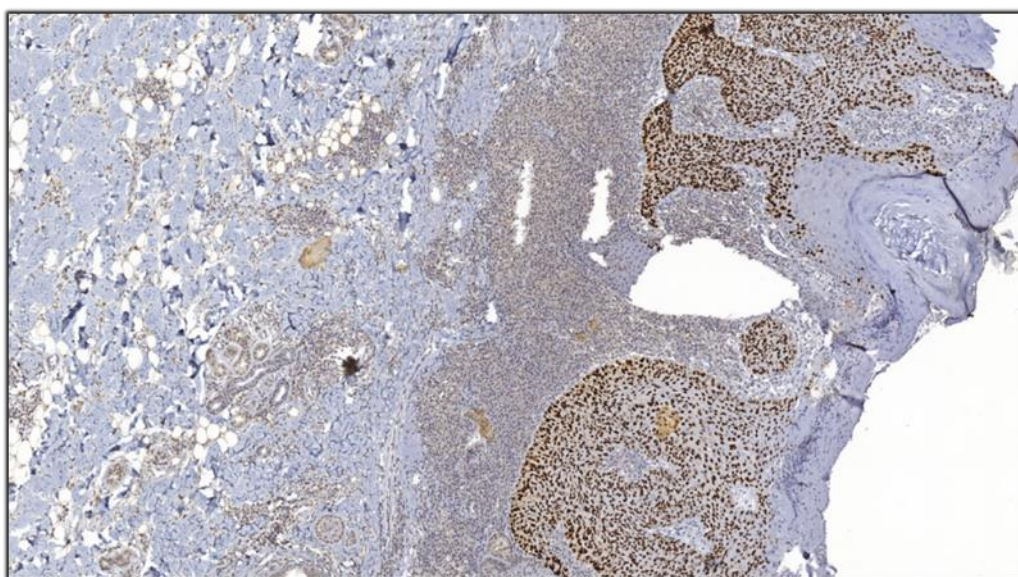


Figura 5: Marcador imuno-histoquímico p 53 mostrando marcação forte na superfície e fraca na profundidade.

Analisando o ki-67, foi observado que a expressão do referido marcador é concordante, com fraca intensidade na superfície e profundidade em 67% dos FIT infiltrativos contra 61% dos FIT expansivos e forte, na superfície e profundidade em 4% dos expansivos contra 10% dos infiltrativos (Figura 6). Em relação ao padrão de marcação discordante, ou seja, fraco na superfície e forte na profundidade foi constatado em 30% nos FIT expansivos contra 23% nos FIT infiltrativos. O padrão de expressão forte na superfície e fraco na profundidade foi observado apenas nos FIT expansivos (4%).

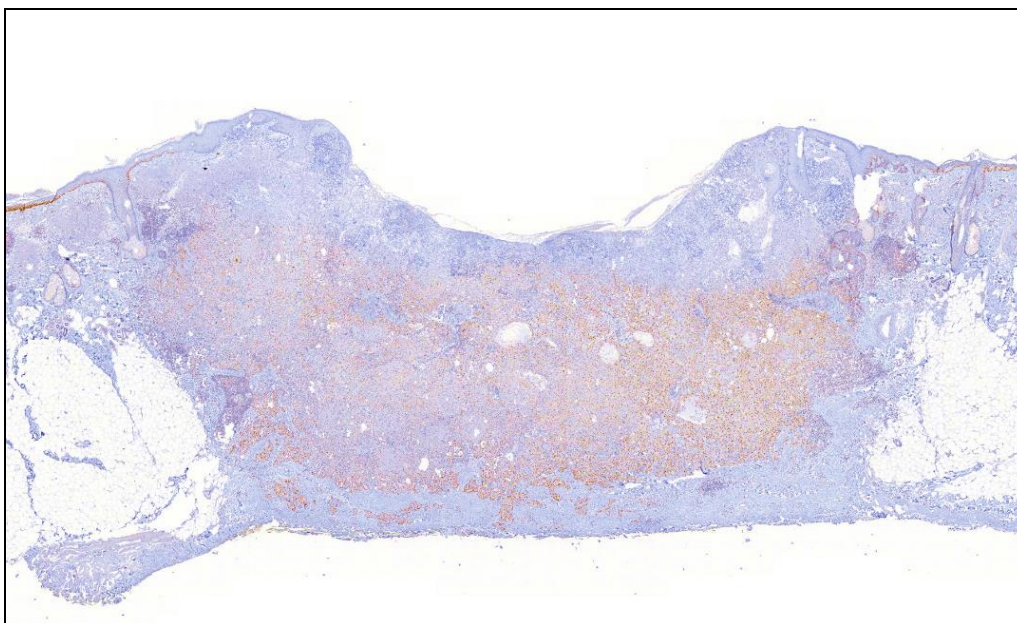


Figura 6: Marcador imuno-histoquímico ki-67 mostrando marcação forte na superfície e profundidade.

Tabela 6 – Expressão dos marcadores imuno-histoquímicos na superfície e profundidade em relação ao tipo de FIT (n=53)

Fronte expansivo				Fronte infiltrativo			
E-cad na profundidade	E-cad. na superfície		Total	E-cad. na profundidade	E-cad. na superfície		Total
	1+ou2+	3+ou4+			1+ou2+	3+ou4+	
1+ou2+	14 (61%)	4 (17%)	18	1+ou2+	21 (70%)	4 (13%)	25
3+ou4+	0 (0%)	5 (22%)	5	3+ou4+	0 (0%)	5 (17%)	5
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>23</b>	<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>9</b>	<b>30</b>
Kappa = 0,603; p = 0,02				Kappa = 0,636; p = 0,019			
p53 na profundidade	p53 na superfície		Total	p53na profundidade	p53 na superfície		Total
	1+ou2+	3+ou4+			1+ou2+	3+ou4+	
1+ou2+	12 (52%)	1 (4%)	13	1+ou2+	15 (50%)	1 (3%)	16
3+ou4+	7 (30%)	3 (14%)	10	3+ou4+	11 (17%)	3 (10%)	14
<b>Total</b>	<b>19</b>	<b>4</b>	<b>23</b>	<b>Total</b>	<b>26</b>	<b>4</b>	<b>30</b>
Kappa = 0,240; p = 0,162				Kappa = 0,159; p = 0,222			

ki67 na profundidade	ki67 na superfície		Total	ki67 na profundidade	ki67 na superfície		Total
	1+ou2+	3+ou4+			1+ou2+	3+ou4+	
1+ou2+	14 (61%)	1 (4%)	15	1+ou2+	20 (67%)	0 (0%)	20
3+ou4+	7 (30%)	1 (4%)	8	3+ou4+	7 (23%)	3 (10%)	10
<b>Total</b>	21	2	23	<b>Total</b>	27	3	30

Kappa = 0,071; p = 0,636

Kappa = 0,364; p = 0,010

Na Tabela 7, observa-se que a E-caderina é concordante, com expressão de fraca intensidade, na superfície e na profundidade em 70 % no grupo de tumores de baixo risco. A mesma concordância foi observada em 64 % no grupo de alto risco. Já a expressão de forte intensidade, na superfície e profundidade foi observada em 12 % no grupo de baixo risco contra 22% no grupo de alto risco. Os demais apresentaram padrão de imunexpressão discordante, forte na superfície e fraco na profundidade, em 18% no grupo de baixo risco contra 14 % no grupo de alto risco.

Em relação ao p53, observa-se que o mesmo é concordante, com expressão fraca, na superfície e profundidade em 52% do grupo de baixo risco contra 50% no grupo de alto risco. No restante, observou-se que 24 % do grupo de baixo risco contra 40 % do grupo de alto risco apresentaram padrão de expressão fraco na superfície e forte na profundidade. E apenas o grupo de alto risco apresentou padrão de expressão forte na superfície e fraco na profundidade em 5% dos mesmos.

A análise do Ki-67 evidenciou que o referido marcador é concordante, com expressão fraca, na superfície e profundidade em 65% do grupo de baixo contra 64% no grupo de alto risco. Nos demais, observou-se que 23 % do grupo de baixo risco contra 28 % do grupo de alto risco apresentaram padrão de expressão fraco na superfície e forte na profundidade. O padrão de expressão forte na superfície e fraco na profundidade foi observado apenas no grupo de alto risco, em 3% dos mesmos.

**Tabela 7 – Expressão dos marcadores imuno-histoquímicos na superfície e profundidade em função da classificação quanto ao risco (NCCN 2013) (n=53)**

Baixo risco				Alto risco			
	E-cad. na superfície		Total		E-cad. na superfície		Total
<b>E-cad na profundidade</b>	<b>1+ou2+</b>	<b>3+ou4+</b>		<b>E-cad. na profundidade</b>	<b>1+ou2+</b>	<b>3+ou4+</b>	
<b>1+ou2+</b>	12(70%)	3(18%)	15	<b>1+ou2+</b>	23(64%)	5(14%)	28
<b>3+ou4+</b>	0(0%)	2(12%)	2	<b>3+ou4+</b>	0(0%)	8(22%)	8
<b>Total</b>	12	5	17	<b>Total</b>	23	13	36
Kappa = 0,485 ; p = 0,020				Kappa = 0,672 ; p < 0,001			
	p53 na superfície		Total		p53 na superfície		Total
<b>p53na profundidade</b>	<b>1+ou2+</b>	<b>3+ou4+</b>		<b>p53na profundidade</b>	<b>1+ou2+</b>	<b>3+ou4+</b>	
<b>1+ou2+</b>	9(52%)	0(0%)	9	<b>1+ou2+</b>	18(50%)	2(5%)	20
<b>3+ou4+</b>	4(24%)	4(24%)	8	<b>3+ou4+</b>	14(40%)	2(5%)	16
<b>Total</b>	13	4	17	<b>Total</b>	32	4	36
Kappa = 0,514 ; 0,015				Kappa = 0,027 ; p = 0,813			
	ki67 na superfície		Total		ki67 na superfície		Total
<b>ki67 na profundidade</b>	<b>1+ou2+</b>	<b>3+ou4+</b>		<b>ki67 na profundidade</b>	<b>1+ou2+</b>	<b>3+ou4+</b>	
<b>1+ou2+</b>	11(65%)	0(0%)	11	<b>1+ou2+</b>	23(64%)	1(3%)	24
<b>3+ou4+</b>	4(23%)	2(12%)	6	<b>3+ou4+</b>	10(28%)	2(6%)	12
<b>Total</b>	15	2	17	<b>Total</b>	33	3	36
Kappa = 0,393; p = 0,041				Kappa = 0,154; p = 0,201			

Os dados da tabela 8, mostraram que a E-caderina é concordante, com expressão de fraca intensidade, na superfície e na profundidade em 70 % dos CEC com Breslow  $\leq$  2mm e em 64% com Breslow  $>$  2mm. A expressão de forte intensidade, na superfície e profundidade foi observada em 15% do grupo com Breslow  $\leq$  2mm e contra 23% com Breslow  $>$  2mm. Os demais apresentaram padrão de imunoexpressão discordante, forte na superfície e fraco na profundidade, em 15% do grupo com Breslow  $\leq$  2mm contra 13 % com Breslow  $>$  2mm.

Em relação ao p53, observa-se que o mesmo é concordante, com expressão de fraca intensidade, na superfície e na profundidade em 47 % dos CEC com Breslow  $\leq$  2mm e em 54% com Breslow  $>$  2mm. A expressão de forte intensidade, na superfície e profundidade foi observada em 15% do grupo com Breslow  $\leq$  2mm e contra 3% com Breslow  $>$  2mm. Os demais apresentaram padrão de imunoexpressão discordante, fraco

na superfície e forte na profundidade, em 23% do grupo com Breslow  $\leq$  2mm contra 43 % com Breslow  $>$  2mm.

A análise do Ki-67, evidenciou que o referido marcador foi concordante, com expressão de fraca intensidade, na superfície e na profundidade em 69 % dos CEC com Breslow  $\leq$  2mm e em 67% com Breslow  $>$  2mm. A expressão de forte intensidade, na superfície e profundidade só foi observada em 15% do grupo com Breslow  $\leq$  2 mm, não ocorrendo esse padrão no grupo com Breslow  $>$  2mm. Os demais apresentaram padrão de imunoexpressão discordante, fraco na superfície e forte na profundidade, em 8% do grupo com Breslow  $\leq$  2mm contra 33 % com Breslow  $>$  2mm.

**Tabela 8– Expressão dos marcadores imuno-histoquímicos na superfície e profundidade segundo espessura medida pelo índice de Breslow (n=43).**

<b>Breslow <math>\leq</math>2mm</b>				<b>Breslow <math>&gt;</math> 2mm</b>			
<b>E-cad na profundidade</b>	<b>E-cad. na superfície</b>		<b>Total</b>	<b>E-cad. na profundidade</b>	<b>E-cad. na superfície</b>		<b>Total</b>
	<b>1+ou2+</b>	<b>3+ou4+</b>			<b>1+ou2+</b>	<b>3+ou4+</b>	
<b>1+ou2+</b>	9 (70%)	2 (15%)	11	<b>1+ou2+</b>	19 (64%)	4 (13%)	23
<b>3+ou4+</b>	0 (0%)	2 (15%)	2	<b>3+ou4+</b>	0 (0%)	7 (23%)	7
<b>Total</b>	9	4	13	<b>Total</b>	19	11	30
Kappa = 0,581; p = 0,021				Kappa = 0,689; p < 0,001			
<b>p53 na profundidade</b>	<b>p53 na superfície</b>		<b>Total</b>	<b>p53na profundidade</b>	<b>p53 na superfície</b>		<b>Total</b>
	<b>1+ou2+</b>	<b>3+ou4+</b>			<b>1+ou2+</b>	<b>3+ou4+</b>	
<b>1+ou2+</b>	6 (47%)	2 (15%)	8	<b>1+ou2+</b>	16 (54%)	0 (0%)	16
<b>3+ou4+</b>	3 (23%)	2 (15%)	5	<b>3+ou4+</b>	13 (43%)	1 (3%)	14
<b>Total</b>	9	4	13	<b>Total</b>	29	1	30
Kappa = 0,156; p = 0,569				Kappa = 0,076; p = 0,277			
<b>ki67 na profundidade</b>	<b>ki67 na superfície</b>		<b>Total</b>	<b>ki67 na profundidade</b>	<b>ki67 na superfície</b>		<b>Total</b>
	<b>1+ou2+</b>	<b>3+ou4+</b>			<b>1+ou2+</b>	<b>3+ou4+</b>	
<b>1+ou2+</b>	9 (69%)	1 (8%)	10	<b>1+ou2+</b>	20 (67%)	0 (0%)	20
<b>3+ou4+</b>	1 (8%)	2 (15%)	3	<b>3+ou4+</b>	10 (33%)	0 (0%)	10
<b>Total</b>	10	3	13	<b>Total</b>	27	3	30
Kappa = 0,567; p = 0,041							

Os dados da tabela 9, mostraram que a expressão da E-caderina foi concordante, com expressão de fraca intensidade, na superfície e na profundidade em 66% dos CEC com tamanho  $\leq 2$ cm e em 40% com tamanho  $> 2$ cm. A expressão de forte intensidade, na superfície e profundidade foi observada apenas no grupo com tamanho  $\leq 2$ cm (23%). Os demais apresentaram padrão de imunexpressão discordante, forte na superfície e fraco na profundidade, em 11% do grupo com tamanho  $\leq 2$ cm contra 60 % com tamanho  $> 2$ cm.

Em relação ao p53, observou-se que o mesmo foi concordante, com expressão de fraca intensidade, na superfície e na profundidade em 54 % dos CEC com tamanho  $\leq 2$ cm e em 20% com tamanho  $> 2$ cm. A expressão de forte intensidade, na superfície e profundidade foi observada apenas no grupo com tamanho  $\leq 2$ cm (9%). Os demais apresentaram padrão de imunexpressão com tamanho discordante, fraco na superfície e forte na profundidade, em 37% do grupo com tamanho  $\leq 2$ cm contra 60 % com tamanho  $> 2$ cm.

A análise do Ki-67, evidenciou que o referido marcador foi concordante, com expressão de fraca intensidade, na superfície e na profundidade em 74 % dos CEC com tamanho  $\leq 2$ cm e em 40% com tamanho  $> 2$ cm. A expressão de forte intensidade, na superfície e profundidade só foi observada no grupo com tamanho  $\leq 2$ cm (3%). Os demais apresentaram padrão de imunexpressão discordante, fraco na superfície e forte na profundidade, em 23% do grupo tamanho  $\leq 2$ cm contra 60 % com tamanho  $> 2$ cm.

**Tabela 9– Expressão dos marcadores imuno-histoquímicos na superfície e profundidade em relação ao tamanho do tumor (n=40)**

E-cad na profundidade	Tamanho $\leq 2$ cm			Tamanho $\geq 2$ cm			
	E-cad. na superfície		Total	E-cad. na superfície		Total	
	1+ou2+	3+ou4+		1+ou2+	3+ou4+		
1+ou2+	23 (66%)	4 (11%)	27	1+ou2+	2 (40%)	3 (60%)	5
3+ou4+	0 (0%)	2 (15%)	8	3+ou4+	0 (0%)	0 (0%)	0
<b>Total</b>	23	12	35	<b>Total</b>	2	3	5
Kappa = 0,7243; p = 0,001			Kappa = 0,689; p < 0,001				

p53 na profundidade	p53 na superfície		Total	p53na profundidade	p53 na superfície		Total
	1+ou2+	3+ou4+			1+ou2+	3+ou4+	
1+ou2+	19 (54%)	0 (0%)	19	1+ou2+	1 (20%)	0 (0%)	1
3+ou4+	13 (37%)	3 (9%)	16	3+ou4+	3 (60%)	0 (0%)	3
<b>Total</b>	32	3	35	<b>Total</b>	4	0	4
Kappa = 0,200; p = 0,048				Kappa = 0,118; p = 0,576			

ki67 na profundidade	ki67 na superfície		Total	ki67 na profundidade	ki67 na superfície		Total
	1+ou2+	3+ou4+			1+ou2+	3+ou4+	
1+ou2+	26 (76%)	0 (0%)	26	1+ou2+	2 (40%)	0 (0%)	2
3+ou4+	8 (23%)	1 (3%)	9	3+ou4+	3 (60%)	0 (0%)	3
<b>Total</b>	34	1	35	<b>Total</b>	5	0	5
Kappa = 0,157; p = 0,085							

## DISCUSSÃO

O prognóstico do CEC depende, principalmente, do estadió clínico, com especial atenção ao local acometido, comprometimento linfonodal ou não e presença de metástases a distância <sup>(11)</sup>. A identificação de fatores prognósticos relacionados à morfologia do tumor primário é importante, pois a maioria das decisões de tratamento para pacientes com câncer é feita baseada nos fatores prognósticos e preditivos, porém, o mesmo tem valores limitados. Nesse sentido, a padronização de critérios histopatológicos para avaliação de CEC cutâneos se faz necessária.

O CEC é neoplasia maligna que usualmente exhibe uma população de células heterogêneas e de subpopulações de células com variado potencial invasivo e metastático <sup>(4)</sup>. O significado prognóstico do FIT nos CEC oral tem sido recentemente reconhecido <sup>(12,13,14)</sup>. Estudos mostram que muitos eventos moleculares que favorecem a disseminação do tumor, como: ganho ou perda de moléculas de adesão, secreção de enzimas proteolíticas, proliferação celular aumentada e início da angiogênese ocorrem no FIT e se apresentam diferentes de outras regiões tumorais como superficial e central. <sup>(4)</sup>.

Byre et al, baseados na hipótese acima descrita, desenvolveram um sistema de graduação morfológica de malignidade que analisa o FIT no carcinoma de células escamosas da cavidade oral <sup>(12)</sup>. Os autores observaram que as células das áreas

profundamente invasivas de um tumor (correspondentes ao FIT), mostraram alterações mais parecidas com aquelas observadas em metástases, além de possuírem maior probabilidade de causar disseminação do tumor, sendo, desse modo, consideradas como as células com potencial para o comportamento clínico da lesão maligna <sup>(15)</sup>. Desde então, outros autores têm confirmado a significância prognóstica da graduação do FIT em CECs da cavidade oral e outros sítios como laringe e cérvix uterina <sup>(26,38)</sup>. A graduação do FIT é baseada na avaliação de parâmetros histológicos qualitativos: 1) grau de ceratinização, 2) polimorfismo nuclear, 3) padrão de invasão e 4) infiltrado inflamatório linfocítico. <sup>(17)</sup>

O objetivo do presente estudo foi caracterizar o FIT dos CECs cutâneos de cabeça e pescoço e avaliar sua importância como fator prognóstico e comportamento biológico. O FIT expansivo foi mais frequente tanto no grupo dos CECs bem e moderadamente diferenciados (60% contra 40% dos infiltrativos), como também para o grupo dos CECs pouco diferenciados ou indiferenciados (62,5% contra 25 % dos infiltrativos). A análise do FIT infiltrativo, revelou que a maioria apresentava células isoladas (81%) contra 19% sem células isoladas. O marcador AE1/AE3 foi importante na determinação do tipo do FIT, propiciando avaliação detalhada e, em alguns casos, auxiliou na distinção do FIT infiltrativo em com e sem células isoladas.

Não foi detectada nenhuma associação significativa entre os critérios de prognóstico recomendados pela 7ª edição do AJCC e a sobrevida livre de doença em relação ao tipo de FIT no presente estudo.

Uma diferença substancial do FIT em relação às áreas superfície / centro tem sido reportada pelo estudo imuno-histoquímico através do marcador E-caderina. <sup>(4)</sup>. O marcador em questão é uma molécula de adesão e a diminuição dos níveis do mesmo nas células é fortemente associado ao potencial de invasão e metástases em vários tipos de câncer em humanos e no CEC, não cutâneo de cabeça e pescoço, está associada a pior diferenciação e poder metastático mais alto <sup>(40, 41, 42)</sup>. Wang et al, estudaram a expressão da E-caderina no FIT do CEC, verificando que a imunoreatividade desse marcador é mais baixa no FIT do que na superfície e centro do tumor e que o referido marcador no FIT está estatisticamente associado ao grau histopatológico, tamanho e espessura tumoral, além de baixa sobrevida <sup>(4)</sup>. Franchi et al tem reportado que a perda ou redução da expressão da E-caderina em CEC de laringe têm relação com menor grau de diferenciação do tumor e/ou presença de metástase em linfonodos clinicamente negativos. Desse modo, segundo Franchi, a E-caderina pode ser uma ferramenta útil

para identificar pacientes que têm risco considerável para metástases ocultas que necessitam de tratamento adicional. <sup>(38)</sup> Bãnkfalvi & Piffkò, no entanto, não mostraram correlação significativa desse marcador com os fatores clínicos e prognósticos <sup>(18)</sup>. No presente trabalho, observou-se que 17% dos FIT expansivos e 13% dos FIT infiltrativos (total de 30%) apresentaram o padrão de marcação semelhante relatado por Wang et al.

Em neoplasias cutâneas a superexpressão do p 53, um gene supressor tumoral, é detectada com frequência e tem sido considerada como um evento precoce na carcinogênese cutânea. As mutações, desse gene supressor tumoral, são as anormalidades genéticas mais encontradas no CEC oral e a análise imuno-histoquímica da expressão da proteína do p53 tem sido considerada como um marcador útil de mutações do referido gene <sup>(35)</sup>. Stratijos et al observaram alta prevalência de imunoreatividade do p53 em CECs <sup>(36)</sup>.

O Ki-67 mostra a capacidade de proliferação das células cancerígenas, existindo controvérsias nos estudos relacionados com a aplicação clínica desse último antígeno como indicador prognóstico. Muitos artigos de CEC de cabeça e pescoço têm demonstrado que o ki-67 não tem valor prognóstico para predizer o curso da doença <sup>(38,39)</sup>. Roychowdhuey et al. não observaram nenhuma associação com o prognóstico em carcinomas nasofaríngeais <sup>(38)</sup> Stoll et al. estudaram 107 pacientes com CEC de cabeça e pescoço e carcinoma de orofaringe e encontrou que o ki-67 não está habilitado para predizer a sobrevida ou sobrevida livre de doença <sup>(39)</sup>. No entanto, Kurokawa et al relatou que a expressão aumentada do Ki-67 e o p53 correlacionam-se com CECs orais pobremente diferenciados <sup>(29)</sup>.

O FIT, em CECs orais, apresenta expressão mais elevada do ki-67 e do p53 em áreas mais invasivas do tumor <sup>(22,37)</sup>. Batinac et al. revelaram que a distribuição do padrão de expressão do ki-67 era similar à expressão da proteína p53 <sup>(37)</sup>.

No presente estudo observou-se expressão mais alta do p53 na profundidade e baixa na superfície em 30% dos FIT expansivos e 17% dos infiltrativos, (total de 47%), enquanto para o Ki-67 a mesma expressão ocorreu em 30% dos FIT expansivos e 23% dos infiltrativos, (total de 53%), evidenciando padrão de expressão semelhante ao relatado na literatura para esses marcadores.

Embora não tenha sido observado associação entre os fatores prognósticos da 7ª edição e as expressões de E-caderina, ki-67 e p53, em sítios superficial e profundo, em CEC cutâneos de cabeça e pescoço, comprovou-se que a expressão do p53 apresentou associação direta com a intensidade do processo inflamatório peritumoral. A associação

do p53 com o infiltrado tumoral é consistente com interação entre as células do infiltrado inflamatório e as células tumorais para a viabilização da progressão do tumor (8).

Em relação à sobrevida livre de doença em função da expressão da E-caderina, ki-67 e p53, em sítios superficial e profundo, em CEC cutâneos de cabeça e pescoço, não foi evidenciado associação.

Os fatores de risco para recorrência dos CEC cutâneos dividem esses tumores em alto e baixo risco. Ao comparar a expressão dos marcadores E-caderina, p 53 e ki-67, em sítios superficial e profundo comparando os CEC de baixo com os de alto risco, observamos que: 1-E-caderina: a expressão diminuída dessa proteína na profundidade, como referida por Wang, foi observada tanto nos CEC da baixo risco (18%) como nos CEC de alto risco (14%), perfazendo total de 22%; 2- para o p53 a expressão forte na profundidade, relatada por Batinac et al foi observada em menos da metade dos tumores em ambos os grupos (24% no grupo de baixo risco e 40% no grupo de alto risco) e p Ki-67 apresentou a mesma expressão do p 53 em aproximadamente  $\frac{1}{4}$ , em ambos os grupos (23% no de baixo risco e 28 % nos de alto risco). Ou seja, a forte expressão do p53 foi mais frequente nos tumores de alto risco, (40%), do que nos tumores de baixo risco,(24%), porém não foi acompanhada pelo ki-67 (28%).

O índice de Breslow determina a espessura tumoral, ou seja, a dimensão vertical a partir do ponto mais profundo de invasão ao topo da camada granulosa ou a célula mais superficial em caso de ulceração. A medida de Breslow é utilizada no estadiamento do Melanoma como principal fator prognóstico. Ao associar esse índice com a expressão dos marcadores E-caderina, p 53 e ki- 67, em sítios superficial e profundo, vimos que: 1-E-caderina: apresentou a expressão diminuída na profundidade (relatada por Wang et al) em 15% dos tumores com Breslow  $\leq 2$  mm e 13% dos tumores  $> 2$  mm; 2-p 53 teve em 23% dos tumores com Breslow  $\leq 2$  mm e 43 % dos tumores  $> 2$ mm a expressão mais forte na profundidade, referida por Batinac et al, e para o ki-67 a expressão conforme relatada por Batinac et al foi observada em 8% dos tumores  $\leq 2$  mm contra 33% dos tumores  $> 2$ mm. Portanto, em relação à espessura do tumor, observamos que o p53 foi mais expresso na profundidade nas lesões mais espessas (índice de Breslow maior que 2mm), e que foi acompanhada também pela expressão maior do Ki-67. Esse fato sugere que p53 e Ki67 poderiam indicar progressão tumoral nos carcinomas cutâneos de cabeça e pescoço.

O tamanho do tumor é um conhecido fator de risco para recorrência dos CEC cutâneos e a divisão mais comumente observada é maior ou menor que 2 cm. E ao correlacionar esse fator de risco com a expressão dos marcadores E-caderina, p 53 e ki-67, em sítios superficial e profundo, evidenciou-se que: 1-) E-caderina: a expressão fraca profundidade foi observada em 11% dos tumores  $\leq 2$  cm e em 60% dos tumores  $> 2$  cm 2) p 53, expressão forte na profundidade foi observada em 37% dos tumores  $\leq 2$  cm contra 60% dos tumores  $> 2$  cm e 3) Ki-67, o índice de proliferação celular (23% tumores  $\leq 2$  cm e 60% nos tumores  $> 2$ cm). Os achados mostram que a E-caderina, o p53 e o ki-67 foram mais expressos em tumores com tamanho  $> 2$ cm, mostrando correlação desses marcadores com o tamanho.

A análise de imuno-histoquímica foi realizada primariamente com intuito de avaliar a expressão diferencial das proteínas p53, Ki-67 e E-caderina entre as regiões mais superficiais e profundas de cada amostra de CEC cutâneo e mostrou que nenhum dos três marcadores apresentou associação com o tipo de FIT. Entretanto, os marcadores imuno-histoquímicos estudados evidenciaram importante correlação com fatores prognósticos atualmente utilizados para avaliação prognóstica dos CEC cutâneos como tamanho e espessura das lesões. Em relação ao FIT, os autores acreditam que estudos futuros prospectivos, com grupos distintos de tumores de baixo risco e alto risco e secções histológicas padronizadas poderão ser úteis na definição da importância da classificação e interpretação do FIT para os CEC cutâneos.

Em resumo, podemos dizer que a avaliação dos CECs com auxílio da imuno-histoquímica pode constituir ferramenta adicional para análise e melhor entendimento do comportamento biológico dessas lesões tumorais. Há necessidade de estudos posteriores bem como ampliação da amostra para referendar e posicionar adequadamente a utilidade desse parâmetro morfológico no estadiamento do CEC cutâneo.

## CONCLUSÕES

1. O tipo de frente de invasão no presente estudo, não apresentou associação com os critérios prognósticos histopatológicos já conhecidos na literatura, em CEC cutâneos de cabeça e pescoço.
2. A expressão de E-caderina, seja em sítio superficial ou profundo, não apresentou associação com os critérios prognósticos histopatológicos já conhecidos na literatura, em CEC cutâneos de cabeça e pescoço.
3. A expressão de Ki-67, seja em sítio superficial ou profundo, não apresentou associação com os critérios prognósticos histopatológicos já conhecidos na literatura, em CEC cutâneos de cabeça e pescoço.
4. A expressão de p53 em sítio superficial apresentou associação inversa com o critério de espessura (nível de invasão da 7ª. Edição do AJCC) e nenhuma outra associação com os outros fatores prognósticos avaliados, em CEC cutâneos de cabeça e pescoço.
5. A expressão de p53 em sítio profundo apresentou associação direta com a intensidade do processo inflamatório local, mas nenhuma outra associação com os outros fatores prognósticos avaliados, em CEC cutâneos de cabeça e pescoço.
6. O tipo de frente de invasão não demonstrou na casuística avaliada neste estudo, impacto na sobrevida livre de doença, em CEC cutâneos de cabeça e pescoço.
7. As expressões de E-caderina, ki-67 e p53, em sítios superficial e profundo, não demonstraram impacto na sobrevida livre de doença, em CEC cutâneos de cabeça e pescoço.
8. A expressão da E-caderina, em sítios superficial e profundo em **relação ao tipos de FIT**, mostrou no presente estudo, marcação diferenciada com forte expressão na superfície e fraca expressão na profundidade em apenas 17% dos FIT expansivos e 13 % dos FIT infiltrativos num total de 30% dos casos estudados.
9. A **expressão do p53**, em sítios superficial e profundo em **relação ao tipos de FIT**, mostrou no presente estudo, marcação diferenciada com fraca expressão na superfície e forte expressão na profundidade em apenas 30% dos FIT

expansivos e 17 % dos FIT infiltrativos, com um total de 47% dos casos estudados.

10. A **expressão do ki-67**, em sítios superficial e profundo em **relação ao tipos de FIT**, mostrou no presente estudo, marcação diferenciada com fraca expressão na superfície e forte expressão na profundidade em apenas 30% dos FIT expansivos e 23 % dos FIT infiltrativos, perfazendo total de 53%.
11. A **expressão da E-caderina**, em sítios superficial e profundo em **relação aos grupos de alto e baixo risco para recorrência**, mostrou no presente estudo, marcação diferenciada com forte expressão na superfície e fraca expressão na profundidade em 18% dos FIT de baixo risco e 14 % dos FIT de alto risco. A expressão da E-caderina com maior intensidade na superfície e menor intensidade na profundidade foi observada na minoria dos tumores avaliados no presente estudo.
12. A **expressão do p53**, em sítios superficial e profundo em **relação aos grupos de alto e baixo risco para recorrência**, mostrou no presente estudo, marcação diferenciada com fraca expressão na superfície e forte expressão na profundidade em 52% dos FIT de baixo risco e 50 % dos FIT de alto risco.
13. A **expressão do ki-67**, em sítios superficial e profundo em **relação aos grupos de alto e baixo risco para recorrência**, mostrou no presente estudo, marcação diferenciada com fraca expressão na superfície e forte expressão na profundidade em apenas 23% dos FIT de baixo risco e 28 % dos FIT de alto risco.
14. A **expressão da E-caderina**, em sítios superficial e profundo em **relação a espessura (Breslow)**, mostrou no presente estudo, marcação diferenciada com forte expressão na superfície e fraca expressão na profundidade em 15% dos tumores com Breslow  $\leq 2$  mm e 13 % dos tumores com Breslow  $>2$  mm. A expressão da E-caderina com maior intensidade na superfície e menor intensidade na profundidade foi observada na minoria dos tumores estudados.
15. A **expressão do p53**, em sítios superficial e profundo em **relação a espessura (Breslow)**, mostrou no presente estudo, marcação diferenciada com fraca expressão na superfície e forte expressão na profundidade em apenas 23% dos tumores com Breslow  $\leq 2$  mm e em 43 % dos tumores com Breslow  $>2$  mm.
16. A **expressão do ki-67**, em sítios superficial e profundo em **relação a espessura (Breslow)**, mostrou no presente estudo, marcação diferenciada com fraca

expressão na superfície e forte expressão na profundidade em apenas 8% dos tumores com Breslow  $\leq 2$  mm e 33 % dos tumores com Breslow  $>2$  mm.

17. **A expressão da E-caderina**, em sítios superficial e profundo em **relação ao tamanho**, mostrou no presente estudo, marcação diferenciada com forte expressão na superfície e fraca expressão na profundidade em 11% dos tumores com tamanho  $\leq 2$  cm e 60 % dos tumores com tamanho  $>2$  cm. A expressão da E-caderina com maior intensidade na superfície e menor intensidade na profundidade nos tumores  $>2$  cm avaliados no presente estudo reproduziu os dados da literatura.
18. **A expressão do p53**, em sítios superficial e profundo em **relação ao tamanho**, mostrou no presente estudo, marcação diferenciada com fraca expressão na superfície e forte expressão na profundidade em 37% dos tumores com tamanho  $\leq 2$  cm e 60 % dos tumores com tamanho  $>2$  cm. A expressão do p53 com menor intensidade na superfície e maior intensidade na profundidade nos tumores  $>2$  cm avaliados no presente estudo reproduziu os dados da literatura.
19. **A expressão do ki-67**, em sítios superficial e profundo em **relação ao tamanho**, mostrou no presente estudo, marcação diferenciada com fraca expressão na superfície e forte expressão na profundidade em 23% dos tumores com tamanho  $\leq 2$  cm e 60 % dos tumores com tamanho  $>2$  cm. A expressão do ki-67 com menor intensidade na superfície e maior intensidade na profundidade nos tumores  $>2$  cm avaliados no presente estudo reproduziu os dados da literatura.

## REFERÊNCIAS

1. Farasat S, Yu SS, Neel VA, Nehal KS, Lardaro T, Mihm MC et al. A new American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous squamous cell carcinoma: Creation and rationale for inclusion of tumor (T) characteristics. *J Am Acad Dermatol.* 2011;64:1051-1059.
2. Hawrot A, Alam M, Ratner SD. Squamous Cell Carcinoma. *Curr Probl Dermatol.* 2003;15:85-134.
3. Elder DE, Elenitsas R, Johnson BL, Murphy GF, Xu X. *Lever's Histopathology of the Skin.* Lippincot and Williams & Wilkins. 10<sup>th</sup> ed. Philadelphia, 2009.
4. Wang X, Zhang J, Fan M, Zhou Q, Deng H, Aisharif MJ, Chen X. The expression of E-cadherin at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR analysis with clinicopathological correlation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(4):547-554.
5. World Health Organization Classification of Tumors: Pathology and Genetics: Head and Neck Tumors, Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D (Eds), WHO Press, Switzerland 2005.
6. De Paula AMB, Cardoso SV, Gómez RS. Eosinofilia tecidual na região do fronte invasivo do carcinoma de célula espinocelulares de boca: correlação com parâmetros clínico-patológicos. *Rev Odontol UNESP.* 2006; 35(3): 163-69.
7. Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Dis.* 1998;4(2):70-77.
8. Fundyler O, Khanna M, Smoller BR. Metalloproteinase-2 expression correlates with aggressiveness of cutaneous squamous cell carcinomas. *Mod Pathol.* 2004;17(5):496-502.
9. Dang C, Gottschling M, Roewert J, Forschner T, Stockfleth E, Nindl I. Tenascin-C patterns and splice variants in actinic keratosis and cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 2006;155(4):763-770.
10. Bowden J, Brennan PA, Umar T, Cronin A. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Cutan Pathol.* 2002;29(10):585-9.

11. Bånkfalvi A, Piffkò J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med* 2000;29:291–8.
12. Bryne M, Koppang HS, Lileng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading system is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1989; 18:432-7.
13. Po Wing Yuen A, Lam KY, Lam LK, Ho CM, Wong A, Chow TL, et al. Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma—a comparative study of stage, thickness, shape, growth pattern, invasive front malignancy grading, Martinez-Gimeno score, and pathologic features. *Head Neck* 2002;24:513-20.
14. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992;166: 375-81.
15. Bryne M, Jenssen N, Boysen M. Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch.* 1995;427 (3):277-281.
16. LeBoit PE, Burg G, Weedon D, Sarasain A. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. IARC Press: Lyon 2006
17. Lourenço SQCL, Schueler AF, Camisasca DR, Lindenblatt RC, Bernardo VG. Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: revisão dos sistemas propostos. *Rev Bras Cancerol* 2007;53(3):325-333.
18. Bryne M. Prognostic value of various cellular and molecular features in oral squamous cell carcinomas: a review. *J Oral Pathol Med.* 1991;20: 414-420.
19. Bryne M, Boysen M, Alfsen CG, Abeler VM, Sudbø J, Nesland JM, Kristensen GB, Piffko J, Bankfalvi A. The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis? *Anticancer Res.* 1998;18(6B):4757-4764.
20. Jensen V, Prasad AR, Smith A, Raju M, Wendel CS, Schmelz M, Leyva W, Warneke J, Krouse RS. Prognostic Criteria for Squamous Cell Cancer of the Skin. *J Surg Res.* 2010; 159 (1):509-516.

21. Horta MPR, Assis LA, Souza AF, Araújo-Gómez SR, Aguiar MCF. p53 and p21<sup>WAF1/CIP1</sup> overexpression at the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36: 88–92.
22. Matsuta M, Kon S, Sasaki K, Matsuta M. Immunohistochemical detection of p21<sup>WAF1/CIP1</sup> and p53 proteins in formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections of squamous cell carcinoma of the skin. *J Dermatol Sci.* 1997;14(3):233-9
23. Kurokawa, H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita, Tanaka, T. The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(10):602-7.
24. Wang X, Zhang J, Fan M, Zhou Q, Deng H, Aisharif MJ, Chen X. The expression of E-cadherin at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR analysis with clinicopathological correlation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(4):547-554.
25. Chang YC, Nieh S, Chen S-F, Jao SW, Lin YL, Fu E. Invasive pattern grading score designed as an independent prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma. *Histopathology.* 2010 Aug;57(2):295-303
26. Kristensen GB, Abeler VM, Risberg B, Trop C, Bryne M. Tumor size, depth of invasion, and grading of the invasive tumor front are the main prognostic factors in early squamous cell cervical carcinoma. *Gynecol Oncol.* 1999;74(2):245-251.
27. Piffkó J, Bánkfalvi A, Ofner D, Kusch F, Böcker W, Joos U, Schmid KW. In situ assessment of cell proliferation at the invasive front of oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 1996;429: 229-234.
28. Vogelstein B, Kinzler KW. P53 function and dysfunction. *Cell* 1992; 70: 523-526.
29. Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tanaka T, Tomoyose T, Takano H, Funaki K, Fukuyama H, Takahashi T, Sakoda S. The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(10):602-7.

30. Shimizu T, Murakami T, Oga A, Furumoto H, Nakano J, Muto M. Prognostic significance of expression of p53 protein and Ki-67 antigen in well-differentiated squamous cell carcinoma of the skin. *J Dermatol.* 1999;26(12):837-40.
31. Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. The relationship of proliferating cell density at the invasive tumor front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 204–8.
32. Moriyama-Kita M, Endo Y, Yonemura Y, Heixmann CW, Miyamori H, Sato H, Yamamoto E, Sasaki T. S100A4 regulates E-cadherin expression in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Lett.* 2005;230(2):211-218.
33. Yamauchi K, Fujioka Y, Kohno N. Sentinel node navigation surgery versus observation as a management strategy for early tongue carcinoma. *Head Neck.* 2012;34(4):568-72.
34. Kurokawa H, Matsumoto S, Murata T, Yamashita Y, Tomoyose T, Zhang M, Fukuyama H, Takahashi T. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med.* 2003;32(9):513-21.
35. Khodaeiani E, Fakhrjou A, Amirnia M, Babaei-Nezhad S, Taghvamanesh E, Razzagh-Karimi E, Alikhah H. Immunohistochemical evaluation of p53 and Ki67 expression in skin epithelial tumors. *Indian J Dermatol.* 2013 May;58(3):181-7.
36. Stratigos AJ, Kapranos N, Petrakou E, Anastasiadou A, Pagouni A, Christofidou E, et al. Immunophenotypic analysis of the p53 gene in non-melanoma skin cancer and correlation with apoptosis and cell proliferation. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2005;19:180–6
37. Batinac T, Zamolo G, Jonjić N, Gruber F, Petrovecki M. p53 protein expression and cell proliferation in non-neoplastic and neoplastic proliferative skin diseases. *Tumori.* 2004;90 (1):120-127.
38. Roychowdhury DF, Tseng A Jr, Fu KK, Weinburg V, Weidner N. New prognostic factors in nasopharyngeal carcinoma. Tumor angiogenesis and C-erbB2 expression. *Cancer.* 1996;77(8):1419-1426.

39. Stoll C, Baretton G, Ahrens C, Löhrs U. Prognostic significance of apoptosis and associated factors in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2000;436(2):102-108.
40. Franchi A, Gallo O, Boddi V, Santucci M. Prediction of occult neck metastases in laryngeal carcinoma: role of proliferating cell nuclear antigen, MIB-1, and E-cadherin immunohistochemical determination. *Clin Cancer Res.* 1996;2(10):1801-1808.
41. Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR, et al. Invasion and metastasis of oral cancer cells require methylation of E-cadherin and/or degradation of membranous beta-catenin. *Clin Cancer Res* 2004;10: 5455-63.
42. Mattijssen V, Peters HM, Schalkwijk L, Manni JJ, van 't Hof- Grootenboer B, de Mulder PH, et al. E-cadherin expression in head and neck squamous-cell carcinoma is associated with clinical outcome. *Int J Cancer* 1993;55: 580-5.
43. Shinohara M, Hiraki A, Ikebe T, Nakamura S, Kurahara S, Shirasuna K, et al. Immunohistochemical study of desmosomes in oral squamous cell carcinoma: correlation with cytokeratin and E-cadherin staining, and with tumour behaviour. *J Pathol* 1998; 184:369-81.
44. Connolly et al. Appropriate Use Criteria for Mohs Micrographic Surgery: A Report of the American Academy of Dermatology, American College of Mohs Surgery, American Society for Dermatologic Surgery Association and the American Society for Mohs Surgery *Dermatol Surg* 2012;38:1582–1603.

**ANEXOS**

## ANEXO 1



Universidade Estadual Paulista  
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.  
CEP: 18 618-970  
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143  
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br  
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde  
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 01 de agosto de 2011.

Of. 332/11-CEP

Ilustríssima Senhora  
Profª Drª Mariângela Esther Alencar Marques  
Departamento de Patologia da  
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Drª Mariângela,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa - (Protocolo CEP 3957-2011) "Avaliação das características histopatológicas e imunohistoquímicas do fronte de invasão tumoral do carcinoma espinocelular cutâneo de cabeça e pescoço e sua importância no comportamento biológico", a ser conduzido por Juliana Carneiro Melo, orientada por Vossa Senhoria, recebeu do relator, parecer favorável, aprovado em reunião do CEP de 01 de Agosto de 2.011.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Ao final da execução do Projeto, apresentar ao CEP "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP.

## ANEXO 2

**Tabela A - Associação entre variáveis do tumor e expressão da e-caderina na superfície**

Variável	E-caderina na superfície		<i>p</i> <sup>(1)</sup>
	Fraca Intensidade	Forte intensidade	
<b>Sexo</b>			
Masculino (n = 25)	9	6	0,285
Feminino (n = 15)	19	6	
<b>Linfonodo acometido</b>			
Não (n = 40)	27	13	1,000
Sim (n = 3)	2	1	
<b>Metástase a distância</b>			
Não (n = 43)	29	14	1,000
Sim (n = 0)	0	0	
<b>Tipo de CEC</b>			
Usual (n = 41)	28	13	1,000
Acantolítico (n = 4)	3	1	
<b>Intensidade de processo inflamatório</b>			
Leve (n = 17)	13	4	0,082
Moderada (n = 18)	9	9	
Intensa (n = 10)	9	1	
<b>Tamanho do tumor (7º edição)</b>			
≤ 2cm (n = 37)	26	11	0,313
>2cm (n = 5)	2	3	
<b>Grau histopatológico (7º edição)</b>			
Bem ou moderadamente diferenciado (n = 41)	29	12	0,578
Pouco diferenciado ou indiferenciado (n = 4)	2	2	
<b>Espessura, nível de invasão (7º edição)</b>			
Clark < 4 ou Breslow ≤ 2mm (n = 13)	10	3	0,724
Clark ≥ 4 e Breslow > 2mm (n = 32)	21	11	
<b>Invasão perineural (7º Edição)</b>			
Não (n = 43)	31	12	0,092
Sim (n = 2)	0	2	
<b>Invasão perivascular</b>			
Não (n = 44)	30	14	1,000
Sim (n = 1)	1	0	
<b>Condição das margens</b>			
Livres (n = 36)	26	10	0,353
Comprometidas (n = 6)	3	3	
<b>Células isoladas nas invasões infiltrativas</b>			
Não (n = 4)	3	1	1,000
Sim (n = 17)	12	5	

(1) Teste exato de Fisher

(2)

**Tabela B -Associação entre variáveis do tumor e expressão da E-caderina na profundidade.**

Variável	E-caderina na profundidade		<i>p</i> <sup>(1)</sup>
	Fraca intensidade	Forte intensidade	
<b>Sexo</b>			
Masculino (n = 25)	22	3	0,654
Feminino (n = 15)	12	3	
<b>Linfonodo acometido</b>			
Não (n = 40)	34	6	0,421
Sim (n = 3)	2	1	
<b>Metástase a distância</b>			
Não (n = 43)	36	7	1,000
Sim (n = 0)	0	0	
<b>Tipo de CEC</b>			
Usual (n = 41)	34	7	1,000
Acantolítico (n = 4)	4	0	
<b>Intensidade de processo inflamatório</b>			
Leve (n = 17)	14	3	1,000
Moderada (n = 18)	14	4	
Intensa (n = 10)	10	0	
<b>Tamanho do tumor (7º edição)</b>			
≤ 2cm (n = 37)	30	7	0,569
>2cm (n = 5)	5	0	
<b>Grau histopatológico (7º edição)</b>			
Bem ou moderadamente diferenciado (n = 41)	36	5	0,108
Pouco diferenciado ou indiferenciado (n = 4)	2	2	
<b>Espessura, nível de invasão (7º edição)</b>			
Clark < 4 ou Breslow ≤ 2mm (n = 13)	13	0	0,089
Clark ≥ 4 e Breslow > 2mm (n = 32)	25	7	
<b>Invasão perineural (7º Edição)</b>			
Não (n = 43)	37	6	0,290
Sim (n = 2)	1	1	
<b>Invasão perivascular</b>			
Não (n = 44)	37	7	1,000
Sim (n = 1)	1	0	
<b>Condição das margens</b>			
Livres (n = 36)	30	6	1,000
Comprometidas (n = 6)	5	1	
<b>Células isoladas nas invasões infiltrativas</b>			
Não (n = 4)	3	1	0,352
Sim (n = 17)	16	1	

(1) Teste exato de Fisher ou Qui-Quadrado

**Tabela C - Associação entre variáveis do tumor e expressão da p53 na superfície**

Variável	p53 na superfície		<i>p</i> <sup>(1)</sup>
	Fraca intensidade	Forte intensidade	
<b>Sexo</b>			
Masculino (n = 25)	21	4	1,000
Feminino (n = 15)	13	2	
<b>Linfonodo acometido</b>			
Não (n = 40)	35	5	0,370
Sim (n = 3)	2	1	
<b>Metástase a distância</b>			
Não (n = 43)	37	6	1,000
Sim (n = 0)	0	0	
<b>Tipo de CEC</b>			
Usual (n = 41)	35	6	1,000
Acantolítico (n = 4)	4	0	
<b>Intensidade de processo inflamatório</b>			
Leve (n = 17)	15	2	0,736
Moderada (n = 18)	16	2	
Intensa (n = 10)	8	2	
<b>Tamanho do tumor (7º edição)</b>			
≤ 2cm (n = 37)	33	4	0,488
>2cm (n = 5)	4	1	
<b>Grau histopatológico (7º edição)</b>			
Bem ou moderadamente diferenciado (n = 41)	35	6	1,000
Pouco diferenciado ou indiferenciado (n = 4)	4	0	
<b>Espessura, nível de invasão (7º edição)</b>			
Clark < 4 ou Breslow ≤ 2mm (n = 13)	9	4	0,049
Clark ≥ 4 e Breslow > 2mm (n = 32)	30	2	
<b>Invasão perineural (7º Edição)</b>			
Não (n = 43)	37	6	1,000
Sim (n = 2)	2	0	
<b>Invasão perivascular</b>			
Não (n = 44)	39	5	0,133
Sim (n = 1)	0	1	
<b>Condição das margens</b>			
Livres (n = 36)	32	4	0,197
Comprometidas (n = 6)	4	2	
<b>Células isoladas nas invasões infiltrativas</b>			
Não (n = 4)	3	1	1,000
Sim (n = 17)	14	3	

(1) Teste exato de Fisher

**Tabela D - Associação entre variáveis do tumor e expressão da p53 na profundidade**

Variável	p53 na profundidade		<i>p</i> <sup>(1)</sup>
	Fraca intensidade	Forte intensidade	
<b>Sexo</b>			
Masculino (n = 25)	13	12	0,744
Feminino (n = 15)	7	8	
<b>Linfonodo acometido</b>			
Não (n = 40)	21	19	0,243
Sim (n = 3)	3	0	
<b>Metástase a distância</b>			
Não (n = 43)	24	19	1,000
Sim (n = 0)	0	0	
<b>Tipo de CEC</b>			
Usual (n = 41)	21	20	0,611
Acantolítico (n = 4)	3	1	
<b>Intensidade de processo inflamatório</b>			
Leve (n = 17)	13	4	0,046
Moderada (n = 18)	8	10	
Intensa (n = 10)	3	7	
<b>Tamanho do tumor (7º edição)</b>			
≤ 2cm (n = 37)	20	17	0,347
>2cm (n = 5)	1	4	
<b>Grau histopatológico (7º edição)</b>			
Bem ou moderadamente diferenciado (n = 41)	23	18	0,326
Pouco diferenciado ou indiferenciado (n = 4)	1	3	
<b>Espessura, nível de invasão (7º edição)</b>			
Clark < 4 ou Breslow ≤ 2mm (n = 13)	7	6	0,965
Clark ≥ 4 e Breslow > 2mm (n = 32)	17	15	
<b>Invasão perineural (7º Edição)</b>			
Não (n = 43)	23	20	1,000
Sim (n = 2)	1	1	
<b>Invasão perivascular</b>			
Não (n = 44)	24	20	0,467
Sim (n = 1)	0	1	
<b>Condição das margens</b>			
Livres (n = 36)	20	16	0,184
Comprometidas (n = 6)	1	5	
<b>Células isoladas nas invasões infiltrativas</b>			
Não (n = 4)	1	3	0,272
Sim (n = 17)	11	6	

(1) Teste exato de Fisher ou Qui-Quadrado

**Tabela E - Associação entre variáveis do tumor e expressão da Ki-67 na superfície**

Variável	Ki-67 na superfície		<i>p</i> <sup>(1)</sup>
	Fraca intensidade	Forte intensidade	
<b>Sexo</b>			
Masculino (n = 25)	23	2	1,000
Feminino (n = 15)	14	1	
<b>Linfonodo acometido</b>			
Não (n = 40)	38	2	0,199
Sim (n = 3)	2	1	
<b>Metástase a distância</b>			
Não (n = 43)	40	3	1,000
Sim (n = 0)	0	0	
<b>Tipo de CEC</b>			
Usual (n = 41)	38	3	1,000
Acantolítico (n = 4)	4	0	
<b>Intensidade de processo inflamatório</b>			
Leve (n = 17)	15	2	0,601
Moderada (n = 18)	17	1	
Intensa (n = 10)	10	0	
<b>Tamanho do tumor (7º edição)</b>			
≤ 2cm (n = 37)	35	2	1,000
>2cm (n = 5)	5	0	
<b>Grau histopatológico (7º edição)</b>			
Bem ou moderadamente diferenciado (n = 41)	38	3	1,000
Pouco diferenciado ou indiferenciado (n = 4)	4	0	
<b>Espessura, nível de invasão (7º edição)</b>			
Clark < 4 ou Breslow ≤ 2mm (n = 13)	11	2	0,196
Clark ≥ 4 e Breslow > 2mm (n = 32)	31	1	
<b>Invasão perineural (7º Edição)</b>			
Não (n = 43)	40	3	1,000
Sim (n = 2)	2	0	
<b>Invasão perivascular</b>			
Não (n = 44)	41	3	1,000
Sim (n = 1)	1	0	
<b>Condição das margens</b>			
Livres (n = 36)	34	2	0,378
Comprometidas (n = 6)	5	1	
<b>Células isoladas nas invasões infiltrativas</b>			
Não (n = 4)	4	0	1,000
Sim (n = 17)	16	1	

(1) Teste exato de Fisher

**Tabela F- Associação entre variáveis do tumor e expressão da Ki-67 na profundidade**

Variável	Ki-67 na profundidade		<i>p</i> <sup>(1)</sup>
	Fraca intensidade	Forte intensidade	
<b>Sexo</b>			
Masculino (n = 25)	18	7	0,722
Feminino (n = 15)	10	5	
<b>Linfonodo acometido</b>			
Não (n = 40)	28	12	1,000
Sim (n = 3)	2	1	
<b>Metástase a distância</b>			
Não (n = 43)	30	13	1,000
Sim (n = 0)	0	0	
<b>Tipo de CEC</b>			
Usual (n = 41)	28	13	0,308
Acantolítico (n = 4)	4	0	
<b>Intensidade de processo inflamatório</b>			
Leve (n = 17)	12	5	0,840
Moderada (n = 18)	12	6	
Intensa (n = 10)	8	2	
<b>Tamanho do tumor (7º edição)</b>			
≤ 2cm (n = 37)	29	8	0,103
>2cm (n = 5)	2	3	
<b>Grau histopatológico (7º edição)</b>			
Bem ou moderadamente diferenciado (n = 41)	28	13	0,308
Pouco diferenciado ou indiferenciado (n = 4)	4	0	
<b>Espessura, nível de invasão (7º edição)</b>			
Clark < 4 ou Breslow ≤ 2mm (n = 13)	10	3	0,725
Clark ≥ 4 e Breslow > 2mm (n = 32)	22	10	
<b>Invasão perineural (7º Edição)</b>			
Não (n = 43)	30	13	1,000
Sim (n = 2)	2	0	
<b>Invasão perivascular</b>			
Não (n = 44)	32	12	0,289
Sim (n = 1)	0	1	
<b>Condição das margens</b>			
Livres (n = 36)	25	11	1,000
Comprometidas (n = 6)	4	2	
<b>Células isoladas nas invasões infiltrativas</b>			
Não (n = 4)	3	1	1,000
Sim (n = 17)	14	3	

(1) Teste exato de Fisher

## ANEXO 3

**Tabela G-Sobrevida livre de doença em função da expressão da E-caderina na superfície**

	E-caderina na superfície		$p^{(1)}$
	Fraca intensidade	Forte intensidade	
Tempo entre diagnóstico até a recidiva (anos)	9,6 ± 0,3	5,9 ± 0,5	0,071

(2) (1) Teste de Log Rank

**Tabela H-Sobrevida até a recidiva em função da expressão da E-caderina na profundidade**

	E-caderina na profundidade		$p^{(1)}$
	Fraca intensidade	Forte intensidade	
Tempo entre diagnóstico até a recidiva (anos)	9,4 ± 0,3	5,7 ± 0,8	0,084

(3) (1) Teste de Log Rank

**Tabela I -Sobrevida livre de doença em função da expressão da p53 na superfície**

	p53 na superfície		$p^{(1)}$
	Fraca intensidade	Forte intensidade	
Tempo entre diagnóstico até a recidiva (anos)	8,3 ± 0,3	8,0 ± 1,7	0,251

(4) (1) Teste de Log Rank

**Tabela J - Sobrevida livre de doença em função da expressão da p53 na profundidade**

	p53 na profundidade		$p^{(1)}$
	Fraca intensidade	Forte intensidade	
Tempo entre diagnóstico até a recidiva (anos)	8,2 ± 0,4	9,0 ± 0,6	0,805

(5) (1) Teste de Log Rank

**Tabela L - Sobrevida livre de doença em função da expressão da ki67 na superfície**

	<b>Ki67 na superfície</b>		<b><i>p</i><sup>(1)</sup></b>
	<b>Fraca intensidade</b>	<b>Forte intensidade</b>	
Tempo entre diagnóstico até a recidiva (anos)	9,2 ± 0,3	6,0 ± 2,4	0,153

(6) (1) Teste de Log Rank

**Tabela M - Sobrevida livre de doença em função da expressão da ki67 na profundidade**

	<b>Ki67 na profundidade</b>		<b><i>p</i><sup>(1)</sup></b>
	<b>Fraca intensidade</b>	<b>Forte intensidade</b>	
Tempo entre diagnóstico até a recidiva (anos)	8,5 ± 0,3	8,4 ± 0,9	0,337

(7) (1) Teste de Log Rank

## ANEXO 4

Tabela N- Fatores de risco para recorrência para CEC de pele (NCCN, 2013)

<u>H&amp;P</u>	Baixo risco	Alto risco
Localização/ tamanho	Área L < 20mm	Área L ≥ 20mm
	Área M < 10mm	Área M ≥ 10mm
	Área H < 6mm <sup>3</sup>	Área H ≥ 6mm <sup>3</sup>
Bordas	Bem definida	Pouco definida
Primário vs. Recorrente	Primário	Recorrente
Imunossupressão	(-)	(+)
Sítio de RT prévia ou processo inflamatório crônico	(-)	(+)
Tu crescendo rapidamente	(-)	(+)
Sintomas neurológicos	(-)	(+)
<u>Patologia</u>		
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	Moderado ou pouco diferenciado
Adenoide (acantolítico), adenoescamoso (mostrando produção de mucina) ou subtipos desmoplásticos	(-)	(+)
Profundidade: espessura <sup>2</sup> ou nível de Clark	< 2mm ou I, II, III	≥ 2mm ou IV, V
Envolvimento perineural ou vascular	(-)	(+)

Área H = "áreas de máscara" da face (face central, sobrancelhas, pálpebras, periorbital, nariz, lábios [cutâneo e vermilion], queixo, mandíbula, pele/sulco preauricular e pós-auricular, têmpora, orelha), genitália, mãos e pés.

Área M = bochechas, frente, couro cabeludo, pescoço e pré-tíbia

Área L = tronco e extremidades (excluindo pré-tíbia, mãos, pés, unidades de unhas e tornozelos)