



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



Maykon Kennedy Schulz Oliveira

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

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Odontologia de Araraquara



Maykon Kennedy Schulz Oliveira

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

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

Orientadora: Prof. Dra. Andreia Bufalino

Araraquara

2018

Oliveira, Maykon Kennedy Schulz

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

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

Orientadora: Profa. Dra. Andreia Bufalino

Coorientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León

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

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

Maykon Kennedy Schulz Oliveira

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

Comissão julgadora

Para obtenção do grau de Mestre em cirurgia e diagnóstico

Presidente e orientadora: Prof^a. Dra. Andreia Bufalino

2º Examinador: Prof^a. Dra. Luciana Yamamoto de Almeida

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

Araraquara, 13 de março de 2018.

DADOS CURRICULARES

Maykon Kennedy Schulz Oliveira

NASCIMENTO: 15/09/1990 – Timóteo – MG

FILIAÇÃO: Dilson Martins de Oliveira e Eliane Schulz Moraes Oliveira

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

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

2016: Conclusão do programa de residência.

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

Dedicatória

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

Agradecimentos

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

SUMÁRIO

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

1 INTRODUÇÃO

A carcinogênese designa o processo de desenvolvimento de uma neoplasia, na qual uma série de alterações se acumulam como consequência da desregulação da sinalização de moléculas¹. O carcinoma espinocelular (CEC) é a sexta malignidade mais comum no mundo², e representa >90% das malignidades da região de cabeça e pescoço³. O diagnóstico histopatológico é feito de acordo com critérios propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS)⁴, sendo que para fazer o diagnóstico seguindo classificações atualizadas, muitas vezes são necessários estudos complementares como a imuno-histoquímica (IQ)⁵.

Normalmente a doença se manifesta na orofaringe, hipofaringe, laringe e cavidade oral. O desenvolvimento do CECCP é resultado da interação de fatores ambientais e herança genética, sendo, portanto, multifatorial. Os fatores de risco incluem o abuso do álcool e o tabagismo⁶.

O CECCP é uma doença complexa que se caracteriza por heterogeneidade clínica, patológica, fenotípica e biológica⁷. A evolução e a progressão dessa lesão é resultado de múltiplos passos e alterações das vias celular e molecular no epitélio escamoso estratificado⁸. Evidências sugerem um modelo de progressão molecular de células pré-malignas, lesões instaladas e doenças invasivas (Figura 1).

Os sintomas variam, dependendo no local de origem, e pode incluir dor de garganta, disfagia, odinofagia e rouquidão. Ao exame clínico, os pacientes geralmente apresentam um sítio primário identificável e uma massa palpável em região cervical. Uma abordagem multidisciplinar é importante no tratamento desses pacientes, dada a complexidade do tratamento e as complicações agudas e de longo prazo resultantes da quimioterapia, radioterapia e cirurgia. A determinação do estágio clínico e radiográfico é crucial para o planejamento e tratamento precoce⁶.

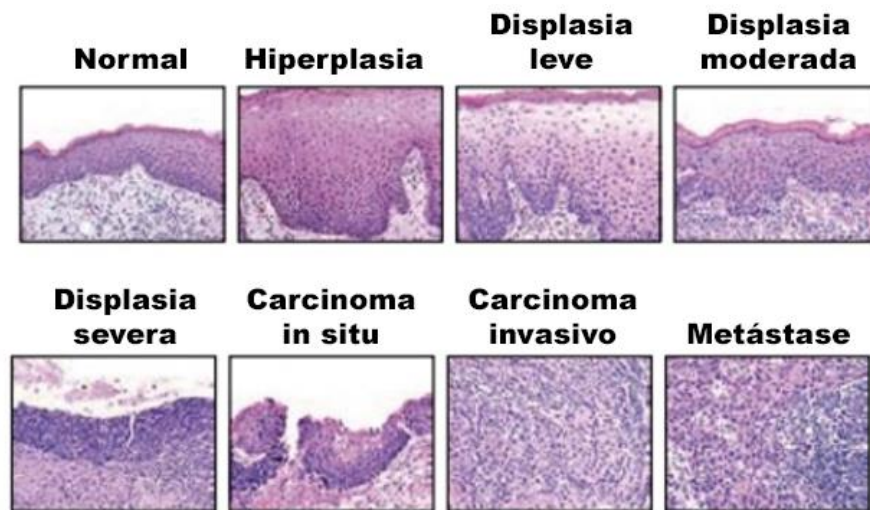
De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA), no biênio 2016-2017, apontou a ocorrência de cerca de 600.000 casos novos de câncer. No ano de 2016, a estimativa foi de 11.140 casos novos de câncer oral em homens e 4.350 em mulheres. Para o câncer da laringe, foram 6.360 casos novos em homens e 990 em mulheres. O CEC oral (CECO) representa o quinto e o de laringe o oitavo tipo de câncer mais comum em incidência entre os homens⁹.

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

com resultados ruins¹⁰. Mecanismos de evasão imunológica tumoral no CECCP incluem o desenvolvimento de tolerância de células T, modulação de células inflamatórias e citocinas angiogênicas, além de queda na regulação do processamento de antígenos¹¹. Esses mecanismos atualmente estão servindo para definir metas de imunoterapia para desenvolvimento de tratamento clínico¹².

Para melhorar o prognóstico é necessário estabelecer novos marcadores que possam prever a resistência terapêutica. Isso ajudaria na otimização do tratamento dos CECCP, beneficiando os pacientes¹³. A maioria dos estudos de CECCP em populações brasileiras enfatizam a análise epidemiológica e correlações clinico-patológicas através de uma análise morfológica convencional^{14,15}. Desse modo, a identificação de subgrupos de CECCP por meio de análise complementar por IQ, podem ter impacto no tratamento e prognóstico (recorrência e metástases locais e à distância) fornecendo informações necessárias para melhor abordagem clínica.²

Figura 1 – Progressão do CECCP



Fonte: Adaptado de Haddad, Shin⁶ p.1145.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma espinocelular da região de cabeça e pescoço e sua relação com fatores de proliferação e diferenciação celular

O processo de proliferação celular está relacionado com o aumento do número de células como resultado do crescimento e da divisão celular. Os processos de diferenciação celular representam os mecanismos pelos quais as células se especializam, gerando uma diversidade celular capaz de realizar determinadas funções. A desregulação destes fatores, como erros na síntese do DNA das células, pode gerar uma produção descontrolada das células dando início as neoplasias⁷.

Existem diversos marcadores de diferenciação que atualmente são utilizados nas pesquisas desses eventos moleculares e os resultados indicam que eles podem ser importantes no diagnóstico e prognóstico em diversos tipos de tumores. Originalmente, o CD10 foi usado para o diagnóstico e classificação de linfomas malignos e leucemia¹⁶. Além disso, foi relatado como importante marcador diagnóstico em diferentes lesões não hematopoiéticas incluindo mama, fígado e útero^{17,18,19}. As células-tronco tumorais (*Cancer stem cell* - CSC) são responsáveis pelas falhas nos tratamentos, e o CD10 está associado com a resistência terapêutica nos casos de CECCP, além de poder servir como alvo molecular no tratamento dos casos refratários¹³. Adicionalmente, a expressão de Vimentina tem sido frequentemente associada a um maior potencial metastático em CEC oral²⁰. Vários estudos têm mostrado que a Vimentina pode ser expressa em células epiteliais migratórias que estão envolvidas na embriogênese e organogênese, além de cura de feridas ou invasão tumoral^{21,22,23,24}.

Biomarcadores moleculares, como o p53 e Ki-67 têm apresentado um significativo valor prognóstico na análise do CECCP^{2,25}. A proteína de manutenção minicromossomal 7 (MCM7) é um componente essencial do complexo de replicação da helicase (MCM2-7) necessária para a replicação de DNA²⁶. Um estudo que avaliou a marcação para a proteína MCM-2 em CECO (carcinoma espinocelular oral), concluiu que a expressão desta proteína pode ser utilizada como um fator de prognóstico em pacientes com CECO²⁷. Já em um estudo realizado em CEC de

orofaringe mostrou altos índices proliferativos para Ki-67 em mais de 56% dos espécimes, e a proteína p53 apresentou um forte padrão de marcação sendo evidente em mais de 38% dos espécimes². A ciclina D1 é uma proteína reguladora do ciclo celular, a desregulação desta proteína pode ser responsável pelos altos níveis de proliferação celular em CECCP²⁸. Em um estudo em que foi avaliado a expressão coordenada das quinases dependentes de ciclina (CDK4) e seus reguladores em casos tumores orais, os autores concluíram que os oncogenes de CDK4, ciclina D1, ciclina E, Gankyrin, SEI1 e BMI1 são regulados de forma coordenada no desenvolvimento de tumores orais e os eventos moleculares ocorrem mesmo no estágio inicial, como nos casos de mucosas em situação de risco elevado²⁹.

2.2 Anticorpo de proliferação celular: ki-67

Ki-67 é uma proteína nuclear, considerada um marcador de proliferação celular que está associada com a transcrição de RNA ribossômico³⁰. Durante a interfase, o antígeno pode ser detectado exclusivamente dentro do núcleo, enquanto que na mitose a maior parte da proteína é transferida para a superfície dos cromossomos. Diante disso, a proteína Ki-67 está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitoses), mas fica ausente nas células em repouso (G0), tornando-se assim um marcador excelente para determinar a chamada fração de crescimento de uma determinada população de células³¹. A expressão da proteína humana Ki-67 é estritamente associada à proliferação celular³⁰.

Além disso, Ki-67 tem sido mostrada como sendo fortemente expressa na fase de crescimento das células tumorais. A alta expressão de Ki-67 em células tumorais parece estar correlacionada com altas taxas de recorrência e baixa sobrevida global, estando consequentemente relacionada com um prognóstico ruim no carcinoma de próstata, mama e rim³¹. Para o CECCP, são necessários estudos que avaliem a expressão do Ki-67 em resposta ao tratamento tumoral verificando possível associação³².

Os genes mitocondriais desempenham papéis importantes no metabolismo celular, liberação de radicais livres e apoptose. A desregulação desses genes tem sido associada com a geração de espécies reativas de oxigênio, aumento da proliferação e progressão do câncer. Em um estudo onde se avaliou essa desregulação dos genes supressores de tumores mitocondriais (SIRT3, SIRT4 e MTUS1) em relação à

diminuição da expressão do gene de reparo do DNA mitocondrial, evidenciou fatores importantes no desenvolvimento do CECCP, que foi medido pelos índices de proliferação celular do Ki-67³³.

Um estudo mostrou que pacientes com CECCP que apresentaram maior índice de marcação para o Ki-67, também apresentaram pior curso clínico e prognóstico ruim quando comparado a pacientes com a mesma neoplasia e tratamento, porém com resposta positiva ao protocolo terapêutico³⁴. Neste estudo todos os pacientes do estudo haviam sido tratados por meio de cirurgia combinada com radioterapia pós-operatória.

Em um outro estudo recente, foram avaliados fatores clínicos e patológicos de pacientes com diagnóstico de câncer de mama durante um seguimento de mais de 4 anos. Os autores concluíram que além do estágio tumoral e presença de linfonodos positivos serem importantes preditores de sobrevivência global e recorrência, o Ki-67 parece ser preditivo de mortalidade, mas não de recorrência³⁵.

A relação entre o Ki-67 e o prognóstico de pacientes com CECCP ainda não está totalmente esclarecida. Novos trabalhos podem fornecer dados relevantes no que diz respeito a diagnóstico, prognóstico e abordagem terapêutica.

2.3 Anticorpo de proliferação celular: Ciclina D1

No processo da proliferação celular estão relacionados genes supressores, produtos dos oncogenes e outras proteínas que são responsáveis pelo desenvolvimento das neoplasias malignas³⁶. A ciclina D1 é altamente expressa no meio e no final da fase G1 do ciclo celular. A proteína p16 se liga as quinases dependentes de ciclina (CDKS) e forma o complexo p16-CDK4, o que impede a fosforilação do pRb. Este estando hipofosforilado, mantém-se como supressor tumoral, no entanto, a proteína p16 em disfunção pode promover a ligação da CDK4 com a ciclina D e formar o complexo CDK4-ciclina D. Esse complexo, promove a fosforilação do pRb e libera fatores de transcrição que aceleram o ciclo celular³⁷.

O transdutor de sinal e o ativador da transcrição-3 (STAT3) estão intimamente associados à tumorigênese e são ativados em células tumorais de uma grande variedade de carcinomas³⁸. Em um estudo onde foi avaliado a relação entre o STAT3 e a ciclina D1 em linhagens celulares de carcinoma gástrico, foi concluído que houve

superexpressão da ciclina D1 contribuindo para proliferação, migração e invasão tumoral³⁸.

A ciclina D1 é um importante regulador da progressão do ciclo celular e a sua expressão aumentada está associada ao desenvolvimento e progressão tumoral. Além disso, os estudos têm mostrado que essa expressão aumentada está ligada ao desenvolvimento de resistência à terapia no câncer de mama³⁹.

Em um estudo onde avaliou-se o efeito terapêutico quimioterápico utilizando um inibidor não-peptidomimético, o Lonafernib, para tratamento do carcinoma hepatocelular (HCC) usando modelos celulares in vitro, os autores observaram que esta droga inibiu a proliferação tumoral e reduziu a atividade das vias das proteínas quinases ativadas por mitógenos, causando a interrupção do ciclo celular nas fases G1/S por meio da baixa regulação da ciclina D1, CDK6 e SKP2, induzindo a apoptose celular⁴⁰. Em um outro estudo, utilizando substâncias dietéticas não tóxicas e produtos botânicos, como a Panduratina A, para o tratamento do câncer de mama, os resultados mostraram que tais terapias são capazes de regular negativamente as CDKS e reduzir a expressão da ciclina D1, comprovando sua associação com processos de proliferação celular⁴¹.

Em muitos tipos de câncer, a degradação prejudicada da proteína ubiquitina da ciclina D1 é responsável por seus elevados níveis, no entanto, alguns agentes terapêuticos demonstraram induzir a degradação da ciclina D1 através da via ubiquitina. Uma droga induzindo a ablação da ciclina D1 pode proporcionar um quimiopreventivo útil ou estratégia de tratamento para o câncer³⁹. O desenvolvimento de tais agentes requer uma compreensão profunda da regulação da ciclina D1, necessitando mais estudos.

2.4 Anticorpo de diferenciação celular: CD10

CD10 é uma molécula transmembrana tipo II que possui atividade metalopeptidase dependente de zinco ligado a membrana. Sua expressão é encontrada em diversos tecidos normais como epitélio renal e intestinal, mas predomina em células do centro germinativo de tecido linfóide reacional⁴². Foi usado inicialmente para o diagnóstico e classificação de linfomas malignos e leucemia¹⁶. O CD10 tem se

mostrado um marcador muito útil e um atraente alvo molecular para terapia direcionada, sendo sua análise de expressão fundamental para o diagnóstico de neoplasias malignas e resposta ao tratamento⁴³.

As células tronco tumorais (*Cancer stem cell* - CSC) são definidas como aquelas que possuem a propriedade da iniciação do tumor e sua auto renovação. Atualmente, entende-se que essas células são responsáveis pela falha da terapia anti-neoplásica em diversos tumores^{44,45}. Outros trabalhos pesquisaram outros possíveis marcadores dessas células, como CD44⁴⁶ e ALDH1⁴⁷, no entanto, os resultados permaneceram controversos^{37,48}.

Em um estudo onde avaliou-se um novo marcador específico para CSC nos CECCP na presença de agentes terapêuticos, identificaram o CD10 como marcador potencial, contribuindo para resistência terapêutica¹³. Em outro trabalho, relacionou-se o CD10 de acordo com as características clínicas e histológicas das lesões da tireoide, e concluíram que o CD10 pode ser usado como ferramenta diagnóstica e prognóstica, o que consequentemente influencia no tratamento e sobrevida global em pacientes com neoplasias da tireóide, especialmente carcinoma papilar⁴⁹.

2.5 Anticorpo de diferenciação celular: Vimentina

A vimentina é um filamento intermediário de 10 nm de diâmetro presente na maioria das células mesenquimais, sendo usada como marcador do desenvolvimento celular e tecidual. Essa proteína tem mostrado participação em um elevado número de funções críticas, frequentemente associada na organização de proteínas envolvidas nos processos da adesão celular, migração, ancoragem nuclear das células, sinalização celular e no posicionamento de suas organelas no citoplasma, sendo considerada uma molécula integradora mecânica do citoplasma celular⁵⁰.

Em um estudo onde avaliou-se a contribuição individual das redes citoesqueléticas (incluindo os filamentos intermediários) na modulação da morfologia nuclear e comportamento mecânico, além do nível de condensação da cromatina, destacou-se o papel das fibras da actomiosina e dos filamentos intermediários da vimentina como responsáveis principais na regulação mecânica do estado nuclear pelo citoesqueleto⁵¹. Além desses resultados, destacaram o papel do citoesqueleto no núcleo dando origem a mudanças morfológicas e mecânicas que são da mesma

magnitude do que os alcançados intrinsecamente, induzindo as células a se diferenciar. Nesses resultados o citoesqueleto é colocado no centro da regulação mecânica do comportamento das células e do seu destino, não só pelo papel estabelecido como mecanismo de transformação mecânica e estrutura de carga, mas também devido à sua principal influência no estado nuclear⁵¹.

Avaliada a relação com CECO, a expressão de vimentina evidenciou positividade em 38,1% dos casos estudados, além de associação com metástase tumoral⁵².

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivo geral.

O objetivo do presente estudo foi analisar a expressão de marcadores de proliferação e diferenciação celular e sua associação com parâmetros clínico-patológicos em casos de CECCP.

3.2 Objetivos específicos.

3.2.1 Avaliar por IQ a porcentagem de expressão de Ki-67 e ciclina D1 em amostras de CECCP e associar com parâmetros clínico-patológicos.

3.2.2 Avaliar por IQ a porcentagem de expressão de CD10 e Vimentina em amostras de CECCP e associar com parâmetros clínico-patológicos.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Aprovação do Comitê de Ética

Todos os experimentos deste estudo foram realizados de acordo com as normas relativas à ética em pesquisa envolvendo seres humanos sob deliberação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – USP. (protocolo nº 2.017.327) (ANEXO).

4.2 Amostras dos CECCP parafinados

Inicialmente foram selecionados 110 espécimes parafinados obtidos de pacientes com CECCP, previamente identificados e coletados nos Arquivos do Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP).

Foi realizado um estudo retrospectivo, cujos dados clínicos e epidemiológicos (idade, gênero, etnia, localização, grau histopatológico, estágio clínico, tamanho do tumor, linfonodo comprometido, metástase, recorrência e sobrevida global) foram obtidos dos prontuários clínicos de encaminhamento e pertencente ao HCFMRP-USP. As informações clínicas, demográficas, de tratamento, recorrência e sobrevida foram coletadas dos prontuários médicos e as características histopatológicas, incluindo o grau de diferenciação tumoral foi determinada por meio da análise de todas as lâminas coradas com hematoxilina e eosina disponíveis dos tumores. Todas as recorrências foram confirmadas histopatologicamente e a sobrevida livre de doença foi determinada como o período entre o tratamento inicial e a confirmação da recorrência, enquanto que a sobrevida global foi o período entre o diagnóstico do paciente e morte ou a última visita de acompanhamento.

Foram considerados como critérios de inclusão para o presente estudo:

- I. Casos de CEC oral, orofaringe, cavidade nasal, seios paranasais, faringe, laringe e de pele, com quantidade suficiente de material para confirmação histopatológica e para novos cortes histológicos, os quais foram utilizados nas reações de IQ.
- II. Casos que apresentaram informações clínicas completas e descrição detalhada da evolução nos prontuários médicos;

Como critérios de exclusão do presente estudo, foram considerados os seguintes parâmetros:

- I. Qualquer caso com alterações histopatológicas de epitélio escamoso reativo, regenerativo ou reparativo, por exemplo, resposta a trauma; Ulcerações associadas a deficiências nutricionais como a vitamina B12, ferro e ácido fólico;
- II. Qualquer caso com história prévia de radioterapia e/ou quimioterapia ou qualquer outro tratamento oncológico antes do procedimento cirúrgico;
- III. Ausência de qualquer informação clínica e epidemiológica, além de evolução incompleta do prontuário.

4.3 Análise histopatológica

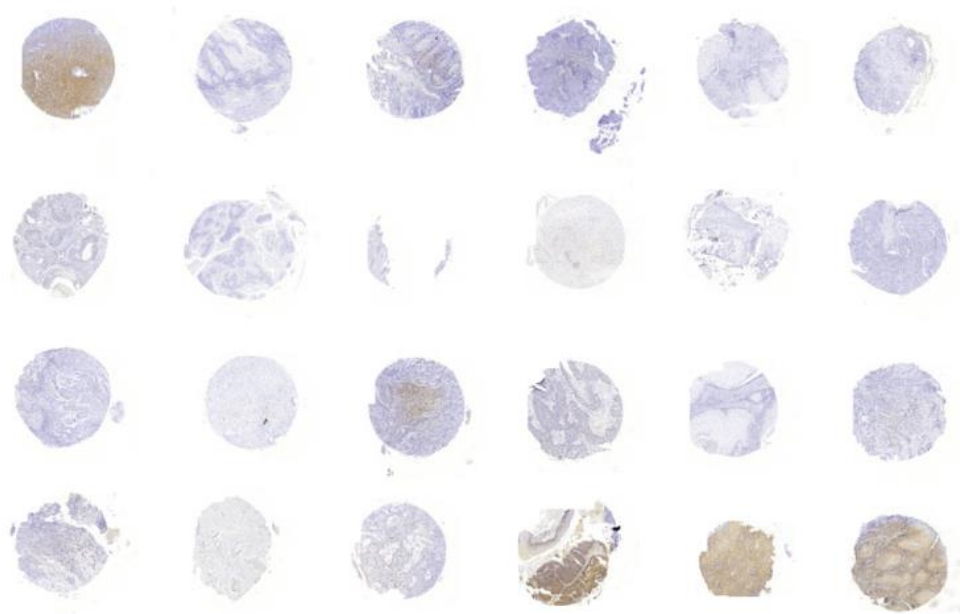
Após a avaliação dos prontuários médicos dos 110 casos inicialmente selecionados, um total de 64 foram excluídos por não contemplarem todos os critérios de inclusão e exclusão do estudo. Assim, foram incluídas neste estudo somente 46 amostras de CECCP que foram submetidas a dois novos cortes com 5 µm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosina (HE), e posteriormente analisados por dois patologistas do HCFMRP-USP para descrição morfológica dos cortes convencionais e confirmação diagnóstica. O grau de diferenciação celular dos CECs foi estabelecido de acordo com os critérios propostos pela OMS⁴. A classificação histopatológica de malignidade proposta pela OMS permitiu o agrupamento dos casos nas três categorias que incluem bem, moderadamente e pouco diferenciados.

4.4 Construção dos microarranjos teciduais (*Tissue microarrays* - TMAs)

Finalmente, foram utilizadas 46 amostras de CECs distribuídas em lâminas de microarranjos teciduais (tissue microarray – TMA). A construção dos TMAs e das lâminas (cortes de 3 µm de espessura) foram obtidos usando um instrumento TMA Grand Master (3D HISTECH, Budapeste, Hungria). As áreas de tumor foram selecionadas e marcadas nos cortes de HE. As lâminas foram então sobrepostas ao bloco original de parafina para determinar a área correspondente a ser usada. Os TMAs foram construídos utilizando uma matriz manual de tecido com três cortes

cilíndricos (2 mm² cada) representativos de cada um dos blocos em duplicatas. Em cada lâmina de TMA foram incluídos até 24 casos (Figura 2).

Figura 2 - Exemplo de uma lâmina de TMA contendo 24 cilindros. Visão panorâmica 10x.



Fonte: Autoria própria.

4.5 Avaliação Imunoistoquímica

Foram realizados cortes de 3 µm de espessura, os quais foram colocados sobre lâminas devidamente revestidas com organo-silano (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). Os cortes obtidos foram submetidos à técnica imunoistoquímica pelo método da estreptavidina-biotinaperoxidase (Universal LSAB™+ Kit/HRP, Rb/Mo/Goat, K0690, Dako) para avaliar anticorpos individuais. As secções de TMA de 3 µm de espessura foram cortadas, depois aquecidas a 75°C durante 8 min e desparafinadas com uma solução de preparação. Em seguida, as amostras foram pré-tratadas com Cell Conditioner a 100°C durante 16 min e depois um inibidor de peroxidase durante

4 min. O passo subsequente aplicou-se os anticorpos primários no TMA e os manteve incubados por 32 min. Após a aplicação e incubação do anticorpo primário, as lâminas foram incubadas com Optiview HQ Universal Linker e Optiview HRP multimer (Ventana Medical Systems) durante 8 min. As etapas finais foram a aplicação de peróxido de hidrogênio e DAB, e depois contra-coloração com hematoxilina. Os anticorpos primários utilizados neste estudo e suas características estão descritos na Tabela 1.

As lâminas foram escaneadas pelo Pannoramic Midi Digital Slide Scanner, os arquivos foram separados por blocos e as imagens correspondente de cada biomarcador divididas em diferentes arquivos digitais (Figura 3).

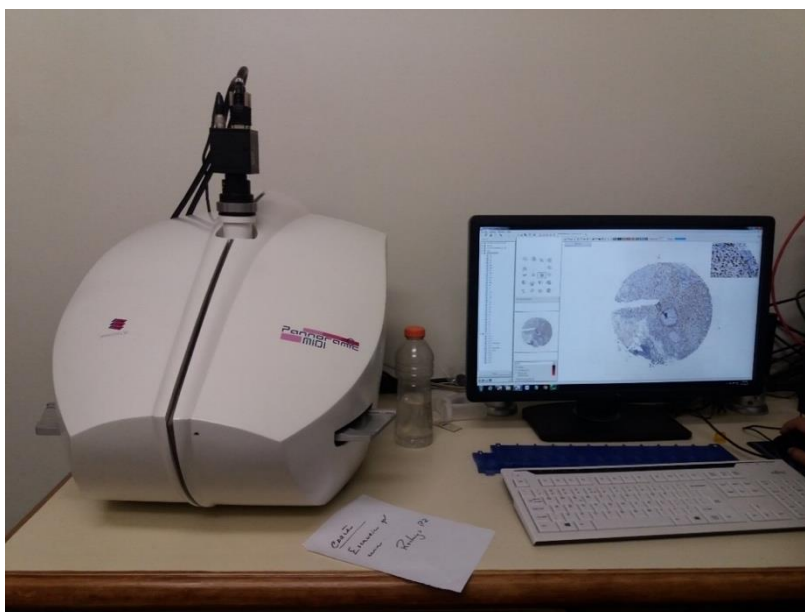
As seções de TMA coradas foram revisadas por dois patologistas experientes (JEL, RN) em região de cabeça e pescoço e cegado em relação as características clinico-patológicas (Figura 4). Para o Ki-67 e ciclina D1 (marcação nuclear), o número de células coradas foi contado manualmente com ampliação de 200x em uma área de tecido fixo (Figura 5). Para o CD-10 e Vimentina, foram avaliadas áreas do estroma e do tumor, analisando a intensidade das respectivas marcações. Após a quantificação das marcações IQ, o valor médio do índice de marcação para cada marcador foi determinado, e as amostras que apresentaram valores acima do valor médio foram definidas como positivas ou alta expressão. As seções foram avaliadas usando um microscópio de luz, de forma cega em relação aos parâmetros, por pelo menos dois dos autores.

Tabela 1 - Anticorpos primários utilizados nos experimentos de imunoistoquímica.

Anticorpo	Espécie	Fornecedor	Diluição
CD10	Monoclonal - rato	Leica Biosystem (novocastra™)	1:500
Vimentina	Monoclonal - rato	Dako	1:1000
Ki-67	Monoclonal - coelho	Abcam®	1:500
Ciclina D1	Monoclonal - rato	Leica Biosystem (novocastra™)	1:100

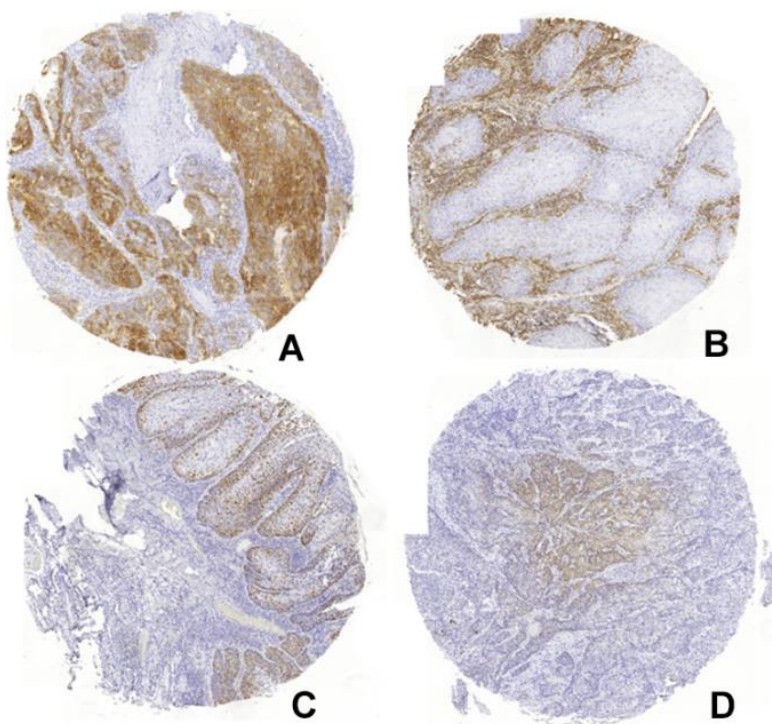
Fonte: Autoria própria.

Figura 3 - Panoramic Midi Digital Slide Scanner executando o escaneamento das lâminas.



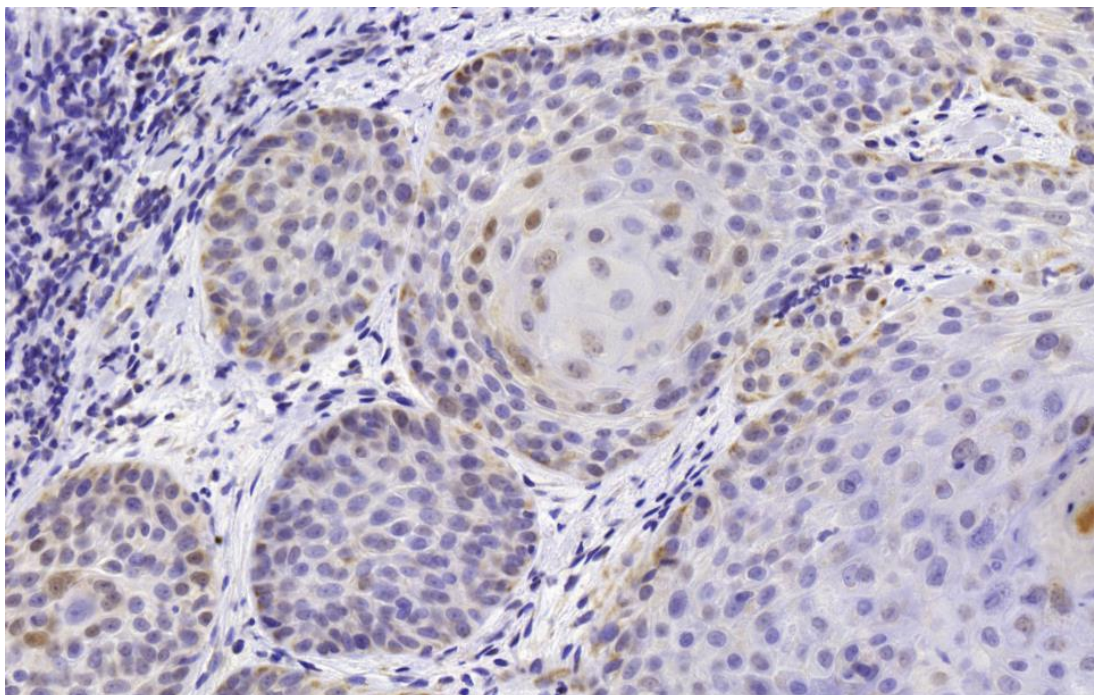
Fonte: Autoria própria.

Figura 4 - Exemplos de marcação nos casos de CECCP. A. CD10 aumento de 30x. B. Vimentina aumento de 30x. C. Ki-67 aumento de 30x. D. Ciclina D1 aumento de 30x.



Fonte: Autoria própria.

Figura 5 - Exemplo de marcação imuno-histoquímica em caso CECCP (marcador CD10). Aumento de 200x.



Fonte: Autoria própria.

4.6 Análise estatística

Para determinar a associação entre a positividade ou grau de expressão dos marcadores e os parâmetros clínico-patológicos das amostras de CECCP, utilizamos o teste exato de Fisher. O nível de significância empregado foi de 5% ($p < 0,05$). As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do programa GraphPad Prism 6.

5 RESULTADO

5.1 Expressão imuno-histoquímica de CD10 em amostras de CECCP

Dentre os 46 casos incluídos no estudo somente 42 amostras obtiveram material em condições satisfatórias para a realização da análise com o marcador CD10 (Tabela 2). Em relação a idade, 25 pacientes tinham menos de 59 anos e 17 pacientes mais que 60 anos. Desses 25, 6 tiveram marcação positiva para CD10 no tumor e 19 marcações negativas. Dos 17 pacientes acima dos 60 anos, apenas um paciente teve marcação positiva e 16 tiveram marcação negativa no tumor. No estroma, dos 25 pacientes, 9 tiveram marcação positiva e 16 tiveram marcação negativa. No grupo acima dos 60 anos, 9 pacientes tiveram marcação positiva e 8 tiveram marcação negativa.

Quando avaliamos a relação entre a expressão de CD10 e gênero, encontramos que 35 pacientes eram masculinos e apenas 7 femininos. Do segundo grupo, 6 tiveram marcação negativa no tumor e apenas uma marcação positiva. Dos masculinos, 29 tiveram marcação negativa no tumor e 6 tiveram marcação positiva. No estroma, no grupo feminino, 4 tiveram marcação negativa e 3 tiveram marcação positiva. Para o grupo masculino, 20 pacientes tiveram marcação negativa e 15 tiveram marcação positiva.

Com relação a etnia, a maioria dos pacientes eram de pele branca, sendo 30 brancos e 12 não brancos. Do grupo dos brancos, 24 tiveram marcação negativa no tumor e 6 tiveram marcação positiva. Do grupo dos não brancos, 11 tiveram marcação negativa no tumor e apenas um teve marcação positiva. No estroma, no grupo dos brancos, 17 pacientes tiveram marcação negativa e 13 tiveram marcação positiva. Do grupo dos não brancos, 7 tiveram marcação negativa e 5 tiveram marcação positiva.

O padrão clínico mais observado foram casos de câncer oral, sendo 30 pacientes para este grupo e 12 em outras localizações. Do grupo de câncer oral, 27 pacientes tiveram marcação negativa no tumor e 3 marcações positivas. Os outros 12 casos, 8 tiveram marcação negativa no tumor e 4 marcações positivas. No estroma, para os casos de câncer oral, foram 20 pacientes com marcação negativa e 10 com marcações positivas. Para os casos de outras localizações, 4 pacientes tiveram marcação negativa e 8 marcações positivas.

Em relação ao grau histopatológico, 25 pacientes foram classificados no grupo

bem diferenciado e 17 pacientes nos grupos moderadamente e pobremente diferenciado. No grupo dos bem diferenciados, notamos que a maioria dos pacientes tiveram marcação negativa no tumor e apenas duas marcações positivas. No grupo moderadamente e pobremente diferenciado, 12 pacientes tiveram marcação negativa no tumor e 5 marcações positivas. Já no estroma, para o grupo bem diferenciado, foram 14 pacientes com marcação negativa e 11 marcações positivas. No grupo moderadamente e pobremente diferenciado 10 pacientes tiveram marcação negativa e 7 marcações positivas.

Os resultados em relação ao estágio, em T1 + T2, foram 11 pacientes, destes, 9 pacientes tiveram marcação negativa no tumor e duas marcações positivas. Em T3 + T4 observamos o maior número de pacientes, sendo 26 com marcação negativa e 5 com marcações positivas. Para o estroma, no grupo T1 + T2 foram 6 marcações negativas e 5 marcações positivas. Para o grupo T3 + T4, foram 18 marcações negativas e 13 positivas.

No estágio N, para o grupo N0, foram 13 pacientes, destes, 11 pacientes tiveram marcação negativa no tumor e duas marcações positivas. Para o grupo N+, foram 29 pacientes, sendo 24 marcações negativas no tumor e 5 positivas. No estroma, para o grupo N0, foram 9 marcações negativas e 4 positivas. Para o grupo N+ foram 16 marcações negativas e 13 positivas.

No estágio M, para o grupo M0, foram 22 pacientes, destes, 18 casos foram negativos no tumor e 4 positivos. Para o grupo M+, foram 20 pacientes, destes 17 casos foram negativos no tumor e 3 foram positivos. No estroma, para o grupo M0, foram 13 marcações negativas e 9 positivas. No grupo M+ foram 11 marcações negativas e 9 positivas.

Em relação ao estadiamento clínico, no grupo I + II, foram 7 pacientes, sendo 6 casos de marcação negativa no tumor e apenas um caso de marcação positiva. Observamos a maior parte dos pacientes no grupo III + IV, onde 35 pacientes foram avaliados, sendo 29 casos negativos no tumor e 6 positivos. No estroma, para o grupo I + II, foram 4 casos de negatividade e 3 de positividade. No grupo III + IV, foram 20 casos de marcação negativa e 15 de marcação positiva.

Quando observamos a sobrevida global notamos que a maior parte dos casos estavam classificados no grupo <5 anos, sendo 31 com marcação negativa no tumor e 6 casos com marcação positiva. Para o grupo >5 anos, foram 5 pacientes, destes 4 tiveram marcação negativa e apenas um caso teve positividade. No estroma, para o

grupo <5 anos, 20 pacientes tiveram marcação negativa, e 17 casos tiveram marcação positiva. Para o grupo >5 anos, foram 4 casos de marcação negativa e apenas um caso de marcação positiva.

Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre a intensidade de marcação de CD10, tanto para a área do tumor como estroma, e os parâmetros clínico-patológicos (Tabela 2).

Tabela 2 - Correlação entre a expressão imuno-histoquímica de CD10 e as variáveis clínico-patológicas dos CECs.

	Nº de casos (N=42)	Tumor		P-value	Estroma		P-value
		CD10+	CD10-		CD10+	CD10-	
Idade							
<59 anos	25	6	19	0,210	9	16	0,348
≥60 anos	17	1	16		9	8	
Gênero							
Feminino	7	1	6	1,000	3	4	1,000
Masculino	35	6	29		15	20	
Etnia							
Branco	30	6	24	0,651	13	17	1,000
Não brancos	12	1	11		5	7	
Localização							
Oral	30	3	27	0,088	10	20	0,084
Outros	12	4	8		8	4	
Grau histopatológico							
BD	25	2	23	0,099	11	14	1,000
MD + PD	17	5	12		7	10	
Estadio T							
T1 + T2	11	2	9	1,000	5	6	1,000
T3 + T4	31	5	26		13	18	
Estadio N							
N0	13	2	11	1,000	4	9	0,506
N+	29	5	24		13	16	
Estadio M							
M0	22	4	18	1,000	9	13	1,000
M+	20	3	17		9	11	
Estadiamento clínico (TNM)							
I + II	7	1	6	1,000	3	4	1,000
III + IV	35	6	29		15	20	
Sobrevida global							
<5 anos	37	6	31	1,000	17	20	0,371
>5 anos	5	1	4		1	4	

BD: bem diferenciado, MD: moderadamente diferenciado; PD: Pobremente diferenciado

Fonte: Autoria própria.

5.2 Expressão imunoistoquímica de Vimentina em amostras de CECCP

Na avaliação da diferenciação celular da Vimentina, 41 pacientes foram avaliados (Tabela 3). Em relação ao critério de idade, 24 pacientes, dos 41, tinham menos de 59 anos e 17 pacientes mais que 60 anos. Desses 24, todos os pacientes tiveram marcação negativa no tumor e nenhuma marcação positiva. Dos 17 pacientes acima dos 60 anos, 15 pacientes tiveram marcação negativa e 2 tiveram marcação positiva. No estroma, notamos maior positividade de marcação do que no tumor. Do grupo com menos de 59 anos, 6 tiveram marcação negativa e 18 tiveram marcação positiva. No grupo acima dos 60 anos, 5 pacientes tiveram marcação negativa e 12 tiveram marcação positiva.

Com relação ao critério de gênero, a maioria dos casos eram masculinos, sendo 35 masculinos e 6 femininos. Dos femininos, 6 tiveram marcação negativa no tumor e nenhuma marcação positiva. No grupo masculino, 33 tiveram marcação negativa no tumor e apenas 2 tiveram marcação positiva. No estroma, para o grupo feminino, observamos 5 marcações negativas e apenas uma marcação positiva. No grupo masculino, a maioria dos pacientes tiveram marcação positiva, sendo 30 casos, contra 5 marcações negativas.

Observado o critério etnia, notamos que a maioria dos pacientes eram brancos. Do grupo dos brancos, 28 tiveram marcação negativa no tumor e 2 tiveram marcação positiva. Do grupo dos não brancos, 11 tiveram marcação negativa no tumor e nenhuma marcação positiva. No estroma, no grupo dos brancos, 10 pacientes tiveram marcação negativa e 20 tiveram marcação positiva. Dos não brancos, apenas um caso foi negativo e 10 foram positivos.

O padrão clínico mais observado foram casos de câncer oral, sendo 31 pacientes classificados, contra 10 em outras localizações. Do grupo de câncer oral, 27 pacientes tiveram marcação negativa no tumor e 2 marcações positivas. Os outros 10 casos, 10 tiveram marcação negativa no tumor e nenhuma marcação positiva. No estroma, para os casos de câncer oral, 10 pacientes tiveram marcação negativa e 21 foram positivos. Para os casos de outras localizações, apenas 2 pacientes tiveram marcação negativa e encontramos 8 marcações positivas.

Quando avaliamos o grau histopatológico, 24 pacientes foram classificados no grupo bem diferenciado e 17 pacientes nos grupos moderadamente e pobremente diferenciado. No grupo dos bem diferenciados, a grande maioria dos casos foram

negativos (22 pacientes) e apenas duas marcações positivas. Do grupo moderadamente e pobremente diferenciado, 17 pacientes tiveram marcação negativa no tumor e nenhuma marcação positiva. No estroma, para o grupo bem diferenciado, observamos 5 pacientes com marcação negativa e 19 casos positivos. No grupo moderadamente e pobremente diferenciado 6 pacientes tiveram marcação negativa e 11 marcações positivas.

Em relação ao estágio, em T1 + T2 foram 9 pacientes, destes, 8 pacientes tiveram marcação negativa no tumor e apenas uma marcação positiva. Em T3 + T4 foram 31 pacientes, destes, 30 pacientes tiveram marcação negativa e apenas uma marcação positiva. No estroma, para o grupo T1 + T2, foram 4 marcações negativas e 5 marcações positivas. Para o grupo T3 + T4, a maioria dos casos foram positivos (25 pacientes) e apenas 6 marcações negativas.

No estágio N, para o grupo N0, foram 12 pacientes, destes, 11 pacientes tiveram marcação negativa no tumor e apenas uma marcação positiva. Para o grupo N+, foram 29 pacientes, sendo 28 marcações negativas no tumor e apenas uma positiva. No estroma, para o grupo N0, foram 4 marcações negativas e 8 positivas. Para o grupo N+ foram 7 marcações negativas e 22 positivas.

No estágio M, para o grupo M0, observamos que 20 casos foram negativos no tumor e apenas um positivo. Para o grupo M+, foram 20 pacientes, destes, 19 casos foram negativos no tumor e apenas um foi positivo. No estroma, para o grupo M0, foram 4 marcações negativas e 17 positivas. No grupo M+ foram 7 marcações negativas e 13 positivas.

Em relação ao estadiamento clínico, no grupo I + II, foram 5 pacientes, sendo 4 casos de marcação negativa no tumor e apenas um caso de marcação positiva. No grupo III + IV, foram 36 pacientes, sendo 35 casos negativos no tumor e apenas um caso positivo. No estroma, para o grupo I + II, foram 2 casos negativos e 3 positivos. No grupo III + IV, foram 9 casos de marcação negativa e 27 de marcação positiva.

Observado a sobrevida global, evidenciamos que para o grupo <5 anos, foram 33 pacientes, sendo 31 casos de marcação negativa no tumor e apenas 2 casos de marcação positiva. Para o grupo >5 anos, foram 8 pacientes, onde todos tiveram marcação negativa e nenhum caso foi positivo. Para o estroma, no grupo <5 anos, 10 pacientes tiveram marcação negativa, e 23 casos foram positivos. Para o grupo >5 anos, apenas um caso teve marcação negativa e 7 casos foram positivos.

Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre a

intensidade de marcação de vimentina, tanto para a área do tumor como estroma, e os parâmetros clínico-patológicos (Tabela 3).

Tabela 3 - Correlação entre a expressão imuno-histoquímica de Vimentina e as variáveis clínico-patológicas dos CECs.

	Nº de casos (N=41)	Tumor		P-value	Estroma		P-value
		Vimentina+	Vimentina-		Vimentina+	Vimentina-	
Idade							
<59 anos	24	0	24	0,166	18	6	1,000
≥60 anos	17	2	15		12	5	
Gênero							
Feminino	6	0	6	1,000	1	5	1,000
Masculino	35	2	33		25	5	
Etnia							
Branços	30	2	28	1,000	20	10	0,233
Não brancos	11	0	11		10	1	
Localização							
Oral	31	2	27	1,000	21	10	0,128
Outros	10	0	10		8	2	
Grau histopatológico							
BD	24	2	22	0,495	19	5	0,489
MD + PD	17	0	17		11	6	
Estadio T							
T1 + T2	9	1	8	0,395	5	4	0,217
T3 + T4	31	1	30		25	6	
Estadio N							
N0	12	1	11	0,505	8	4	0,701
N+	29	1	18		22	7	
Estadio M							
M0	21	1	20	1,000	17	4	0,306
M+	20	1	19		13	7	
Estadiamento clínico (TNM)							
I + II	5	1	4	0,232	3	2	0,598
III + IV	36	1	35		27	9	
Sobrevida global							
<5 anos	33	2	31	1,000	23	10	0,412
>5 anos	8	0	8		7	1	

BD: bem diferenciado, MD: moderadamente diferenciado; PD: Pobremente diferenciado

Fonte: Autoria própria.

5.3 Expressão imunoistoquímica do Ki-67 em amostras de CECCP

Na avaliação da proliferação celular do Ki-67, 46 pacientes foram avaliados (Tabela 4). Em relação ao critério de idade, 27 pacientes foram classificados no grupo <59 anos e 19 pacientes no grupo ≥ 60 anos. Dos 27 pacientes, 13 tiveram marcação

<40% do cilindro e 14 pacientes $\geq 40\%$. Para o grupo ≥ 60 anos, foram 11 pacientes com marcação <40% e 8 pacientes $\geq 40\%$.

Com relação ao gênero, 39 pacientes eram masculinos e 7 femininos. Do grupo masculino, 20 pacientes tiveram marcação <40% de área e 19 pacientes tiveram marcação em uma área de $\geq 40\%$. Do grupo feminino, foram 4 pacientes com marcação <40% e 3 pacientes $\geq 40\%$.

Quando avaliado a etnia, a maior parte dos pacientes eram brancos. Foram classificados 32 pacientes brancos e 14 não brancos. Do grupo dos brancos, 19 pacientes tiveram marcação <40% de área e 13 pacientes $\geq 40\%$. Do grupo dos não brancos, foram 5 pacientes com marcação <40% de área e 9 pacientes $\geq 40\%$.

Quanto a localização, para os casos de câncer oral foram 33 pacientes e para outras localizações 13 pacientes. Para o primeiro grupo observamos que 17 pacientes tiveram marcação <40% de área e 16 pacientes $\geq 40\%$. Para o grupo de outras localizações foram 7 casos com marcação <40% de área e 6 casos em $\geq 40\%$.

Quando comparado ao grau histopatológico, os casos bem diferenciados foram um total de 26 pacientes, e os casos moderadamente e pobremente diferenciado foram 20 pacientes. Para o primeiro grupo, encontramos 17 pacientes com marcação <40% de área e 9 pacientes com marcação em $\geq 40\%$. Para o segundo grupo, foram 7 pacientes com marcação <40% de área e 13 pacientes com marcação em $\geq 40\%$.

Observado o estágio T, para o grupo T1+T2, foram 11 pacientes. Para o grupo T3+T4 foram 35 pacientes. Para o primeiro grupo, encontramos 5 pacientes com marcação <40% de área e 6 pacientes com marcação em $\geq 40\%$. Para o segundo grupo, foram 19 pacientes com marcação <40% de área e 16 pacientes com marcação em $\geq 40\%$.

Em relação ao estágio N, para o grupo N0 foram 16 casos, sendo 10 com positividade em <40% de área e 6 com marcação em $\geq 40\%$. Para o grupo N+ foram 30 casos, sendo 14 pacientes com marcação <40% de área e 16 pacientes com marcação em $\geq 40\%$.

No estágio M, para o grupo M0 foram 23 casos, sendo 12 com positividade em <40% de área e 11 com marcação em $\geq 40\%$. Para o grupo M+ foram 23 casos, sendo 12 pacientes com marcação <40% de área e 11 pacientes com marcação em $\geq 40\%$.

O estadiamento clínico (TNM), para o grupo I + II, foram 7 casos, sendo 3 pacientes com marcação <40% de área e 4 pacientes com marcação em $\geq 40\%$.

Observamos a maior parte dos casos no grupo III + IV, totalizando 39 casos, sendo 21 pacientes com marcação <40% de área e 18 pacientes com marcação em $\geq 40\%$.

Para a sobrevida global, a marcação de Ki-67 $\geq 40\%$ foi associada com uma sobrevida global menor que 5 anos ($p=0,05$), com 100% dos pacientes com alta expressão de Ki-67 apresentando óbito em um período menor que 5 anos. A tabela 4 resume os resultados encontrados entre a porcentagem de expressão de Ki-67 e os parâmetros clínico-patológicos dos casos de CECCP estudados.

Tabela 4 - Correlação entre a expressão imunoistoquímica de Ki-67 e as variáveis clínico-patológicas dos CECs.

		Nº de casos (N=46)	Ki-67		P-value
			< 40%	≥40%	
Idade	<59 anos	27	13	14	0,562
	≥60 anos	19	11	8	
Gênero	Feminino	7	4	3	1,000
	Masculino	39	20	19	
Etnia	Branços	32	19	13	0,202
	Não brancos	14	5	9	
Localização	Oral	33	17	16	1,000
	Outros	13	7	6	
Grau histopatológico	BD	26	17	9	0,073
	MD + PD	20	7	13	
Estadio T	T1 + T2	11	5	6	0,734
	T3 + T4	35	19	16	
Estadio N	N0	16	10	6	0,364
	N+	30	14	16	
Estadio M	M0	23	12	11	1,000
	M+	23	12	11	
Estadiamento clínico (TNM)	I + II	7	3	4	0,694
	III + IV	39	21	18	
Sobrevida global	< 5 anos	41	19	22	0,05*
	> 5 anos	5	5	0	

BD: bem diferenciado, MD: moderadamente diferenciado; PD: Pobremente diferenciado

Fonte: Autoria própria

5.4 Expressão imunoistoquímica de Ciclina D1 em amostras de CECCP

Na avaliação da proliferação celular da ciclina D1, 46 pacientes foram avaliados (Tabela 5). Em relação ao critério de idade, 27 pacientes foram classificados no grupo <59 anos e 19 pacientes no grupo ≥ 60 anos. Dos 27 pacientes, 19 tiveram marcação <20% do cilindro e 8 pacientes $\geq 20\%$. Para o grupo ≥ 60 anos, foram 12 pacientes com marcação <20% e 7 pacientes $\geq 20\%$.

Quanto ao gênero, 39 pacientes eram masculinos e 7 femininos. Do grupo masculino, 26 pacientes tiveram marcação <20% e 13 pacientes tiveram marcação em uma área de $\geq 20\%$. Do grupo feminino, foram 5 pacientes com marcação <20% e 2 pacientes $\geq 20\%$.

Para a etnia, foram 32 pacientes brancos e 14 não brancos. Do grupo dos brancos, 21 pacientes tiveram marcação <20% de área e 11 pacientes $\geq 20\%$. Do grupo dos não brancos, foram 10 pacientes para marcação <20% e 4 pacientes $\geq 20\%$. Quanto a localização, para os casos de câncer oral foram 33 pacientes e para outras localizações 13 pacientes. Para o primeiro grupo foram 20 pacientes com marcação <20% de área e 13 pacientes $\geq 20\%$. Para o grupo de outras localizações foram 11 casos com marcação <20% de área e 2 casos em $\geq 20\%$.

Observado o grau histopatológico, os casos bem diferenciados totalizaram 26 pacientes, e os casos moderadamente e pobremente diferenciado foram 20 pacientes. Para o primeiro grupo, encontramos 17 pacientes com marcação <20% de área e 9 pacientes com marcação em $\geq 20\%$. Para o segundo grupo, foram 14 pacientes com marcação <20% de área e 6 pacientes com marcação em $\geq 20\%$.

Em relação ao estágio T, para o grupo T1+T2, foram 11 pacientes. Para o grupo T3+T4, foram 35 pacientes. Para o primeiro grupo, encontramos 7 pacientes com marcação <20% de área e 4 pacientes com marcação em $\geq 20\%$. Para o segundo grupo, foram 24 pacientes com marcação <20% de área e 11 pacientes com marcação em $\geq 20\%$.

Para o estágio N, para o grupo N0 foram 16 casos, sendo 10 com positividade em <20% de área e 6 com marcação em $\geq 20\%$. Para o grupo N+ foram 30 casos, sendo 21 pacientes com marcação <20% de área e 9 pacientes com marcação em $\geq 20\%$.

No estágio M, para o grupo M0 foram 23 casos, sendo 14 com positividade em $<20\%$ de área e 9 com marcação em $\geq 20\%$. Para o grupo M+ foram 23 casos, sendo 17 pacientes com marcação $<20\%$ de área e 6 pacientes com marcação em $\geq 20\%$.

O estadiamento clínico (TNM), foi observado para o grupo I + II, 7 casos, sendo 3 pacientes com marcação $<20\%$ de área e 4 pacientes com marcação em $\geq 20\%$. Para o grupo III + IV, foram 39 casos, sendo 28 pacientes com marcação $<20\%$ de área e 11 pacientes com marcação em $\geq 20\%$.

Avaliamos a sobrevida global em 41 pacientes para o grupo <5 anos e 5 pacientes para o grupo >5 anos. Para o primeiro grupo, foram 28 pacientes com marcação em $<20\%$ de área e 13 pacientes com marcação em $\geq 20\%$. Para o grupo >5 anos, foram 3 pacientes com marcação em $<20\%$ de área e dois pacientes com marcação em $\geq 20\%$.

Não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre a porcentagem de marcação da ciclina D1 e as variáveis clínico-patológicas dos CECs (Tabela 5).

Tabela 5 - Correlação entre a expressão imuno-histoquímica de Ciclina D1 e as variáveis clínico-patológicas dos CECs.

		Nº de casos (N=46)	Ciclina D1		P-value
			< 20%	≥ 20%	
Idade					
	<59 anos	27	19	8	0,752
	≥60 anos	19	12	7	
Gênero					
	Feminino	7	5	2	1,000
	Masculino	39	26	13	
Etnia					
	Branços	32	21	11	1,000
	Não brancos	14	10	4	
Localização					
	Oral	33	20	13	0,169
	Outros	13	11	2	
Grau histopatológico					
	BD	26	17	9	1,000
	MD + PD	20	14	6	
Estadio T					
	T1 + T2	11	7	4	1,000
	T3 + T4	35	24	11	
Estadio N					
	N0	16	10	6	0,744
	N+	30	21	9	
Estadio M					
	M0	23	14	9	0,530
	M+	23	17	6	
Estadiamento clínico (TNM)					
	I + II	7	3	4	0,193
	III + IV	39	28	11	
Sobrevida global					
	< 5 anos	41	28	13	1,000
	> 5 anos	5	3	2	

BD: bem diferenciado, MD: moderadamente diferenciado; PD: Pobremente diferenciado
 Fonte: Autoria própria.

6 DISCUSSÃO

O CEC é o tipo histológico mais comum de câncer de cabeça e pescoço. Embora seu diagnóstico seja quase sempre baseado nos achados histopatológicos, lesões que apresentam um padrão mais indiferenciado (não queratinizantes), podem se tornar indistinguíveis de outras neoplasias malignas (adenocarcinoma, melanoma, linfoma e sarcoma), necessitando de exames complementares por IQ para confirmação do diagnóstico⁵. No presente estudo, investigamos através da IQ a relação de anticorpos de diferenciação e proliferação celular em carcinomas de cabeça e pescoço, correlacionando-os com as informações clínicas dos casos estudados.

A relação da expressão imuno-histoquímica do CD10 como marcador de superfície celular em casos de neoplasias malignas vem sendo investigada há algum tempo. Ele é expresso em uma série de doenças malignas provenientes do rim, pulmão, pele, pâncreas, próstata, fígado, mama, estômago, colo do útero e bexiga¹³. Além de vários estudos mostrarem sua associação com metástase⁵³.

Em um ensaio clínico laboratorial¹³, os autores abordaram a possível relevância do CD10 para o fenótipo de células tronco tumorais (*Cancer stem cell* - CSC) e descobriram que a subpopulação CD10 positiva formou esferas in vitro e tumores in vivo de forma mais eficiente do que a subpopulação CD10 negativa, indicando que este marcador está intimamente relacionado à tumorigenicidade e capacidade de auto renovação. No entanto, no presente trabalho, os casos CD10 negativos na marcação tumoral foram os que apresentaram pior prognóstico (31 casos de 37 avaliados), com sobrevida global menor que 5 anos após o diagnóstico. Consequentemente, foram os casos que apresentaram pior estadiamento clínico (III e IV), 29 casos CD10 negativo contra 6 casos positivos, indicando, portanto, resultado divergente em termos de prognóstico.

Em um outro estudo onde avaliou-se o valor diagnóstico do CD10 nas lesões benignas da tireoide e no carcinoma papilar da tireoide⁴⁹, os autores concluíram que este marcador pode ser usado na distinção de ambas as lesões, no entanto, para usá-lo como ferramenta de diagnóstico e prognóstico, deve-se considerar um tamanho maior da amostra, além de definir sua sensibilidade e especificidade. No presente estudo, os casos estudados tiveram uma limitação em relação ao número de casos que possuíam informações clínicas completas nos prontuários médicos avaliados,

além de material histológico suficiente para confirmação diagnóstica e novos testes laboratoriais. Vale ressaltar que a maioria dos trabalhos não relaciona a expressão do marcador com os dados clínicos dos pacientes, avaliando somente o tipo de alteração que ocorre, através de estudos moleculares, não ocorrendo, portanto, limitações no número das amostras^{54,55,56}.

A Vimentina é considerada um marcador de células mesenquimatosas, associadas com componentes do citoesqueleto e adesões de membrana²⁰. Estudos de carcinomas epiteliais em humanos, como carcinoma de mama, carcinoma hepatocelular, carcinoma do cólon e adenocarcinoma da próstata, mostraram que a expressão de vimentina pode ser correlacionado com a invasão do tumor e pior prognóstico^{56,57,58,59}. Em um estudo onde avaliou-se a expressão da vimentina em casos de CEC oral, os autores concluíram que a superexpressão deste marcador está intimamente associado com recorrência local²⁰. No presente estudo, não foi encontrado diferenças estatisticamente significantes entre o padrão de expressão de vimentina e os parâmetros clínico-patológicos relacionados ao pior prognóstico. Provavelmente estes resultados podem estar relacionados com a área de material colhido para análise laboratorial, não apresentando, portanto, uma área tão representativa da lesão. Segundo Cortegoso et al⁶⁰, (2017), as características histológicas dos CEC oral podem ser muito diferentes de uma área para outra dentro do mesmo tumor. Eles acreditam que o local mais apropriado para prever o prognóstico é a região frente de invasão tumoral (*Tumor invasion front – TIF*), que é caracterizado por células com menor grau de diferenciação e maior grau de dissociação celular em comparação com outras partes do tumor. Dessa forma, a utilização da técnica do TMA pode não ser adequada quando realizam-se pesquisas com marcadores como a vimentina.

O Ki-67 é expresso em todas as fases do ciclo celular exceto a G0 e é considerado um marcador de proliferação que reflete o total de fração das células que proliferam em um tumor^{61,62}. A maioria dos estudos que correlaciona esse marcador com os CECCP não estabelece comparações clínico-patológicas. Cortegoso et al⁶⁰, (2017), estudaram a relação de proliferação de dois marcadores (Ki-67 e AgNOR) em CEC oral. Eles observaram a associação desses marcadores em cinco estudos^{63,64,65,66,67}, e notaram resultados contraditórios, relacionado principalmente nas diferenças de metodologias e tamanho das amostras, ou a combinação desses fatores. Os achados do presente trabalho mostraram que uma marcação de Ki-67

maior que 40% foi estatisticamente relacionada com uma sobrevida global menor que 5 anos ($p < 0,05$), sugerindo uma relação da alta expressão de Ki-67 com um pior prognóstico. No entanto, no estudo de Cortegoso et al⁶⁰, (2017) não foi observado relacionamento claro entre prognóstico, metástase regional e proliferação celular na TIF (*Tumor invasion front – TIF*), avaliado pela imunocoloração de Ki-67 e AgNOR. Contudo, os resultados deles demonstraram maior tendência de células positivas Ki-67 com pior estadiamento clínico (estágio IV), mas não foi estatisticamente significativo. Esses achados foram compatíveis com o trabalho de Tumuluri et al⁶⁶, (2004) que demonstraram uma relação entre estágio clínico avançado (estágios III e IV) em os casos de CEC oral com maior intensidade de marcação para Ki-67, quando comparados aos casos com estágio clínico inicial da doença (estádio I e II). Em um outro trabalho, os autores afirmaram que o Ki-67 não possui valor prognóstico para o CEC oral⁶⁸, mas essa situação pode ser explicada porque o Ki-67 marca a fração total das células em proliferação, em todas as fases do ciclo celular, exceto na G0, onde ficam negativas as células quiescentes⁵⁹. No entanto, Gonzalez-Moles et al⁶⁸, (2010) afirmaram que a velocidade da proliferação é provavelmente o fator prognóstico mais útil, uma vez que implica maior risco de adquirir eventos oncogênicos tardios e fornecem subclones de células tumorais com maiores capacidades invasivas.

A ciclina D1 desempenha um papel importante na ativação da progressão do ciclo celular e sua expressão mostra-se aumentada em 30% a 50% dos pacientes com CECCP⁶⁹. A expressão aumentada de ciclina D1 é mais comumente relacionada com fatores como a extensão do tumor, metástases regionais e estágio clínico avançado⁶⁹. Em um estudo onde foi avaliado 48 casos de CECCP, a maioria da amostra evidenciou fraca expressão para Ciclina D1 (43,75%), seguida de marcação intermediária (37,5%) e marcação forte em apenas 9 casos (18,8%)⁷¹.

Quando avaliaram a associação da expressão da Ciclina D1 com o grau do tumor, seus resultados não evidenciaram associação estatística significativa ($p = 0,73$)⁷¹. No entanto, quando analisaram comparativamente a expressão da Ciclina D1 com o estágio tumoral, demonstraram significância estatística ($p = 0,02$). Também interpretaram a associação deste marcador com metástase dos linfonodos e concluíram que havia relevância estatística ($p = 0,008$).

No presente trabalho, a expressão da ciclina D1 alterada não foi correlacionada com nenhum parâmetro clínico-patológico que indica pior prognóstico. Esses resultados também foram compatíveis com o trabalho de Zhien et al⁷², (2012) que

também não evidenciaram associação significativa com da expressão alterada de ciclina D1 e um pior prognóstico. No entanto, quando Dhingra et al⁷¹, (2017), avaliaram a associação da expressão da ciclina D1 com metástase dos linfonodos, descobriram uma associação significativa ($p = 0,008$), que foi compatível com os trabalhos de Das et al⁷³, (2011), que evidenciou expressão da ciclina D1 associada à linfonodos metastáticos ($p < 0,02$). Esses resultados não evidenciam que a Ciclina D1 é um marcador absoluto de prognóstico, mas sugere que o aumento do seu nível, juntamente com outros oncogenes, contribui no processo da progressão tumoral⁷⁴.

Vale a pena destacar que o presente estudo apresenta limitações no que diz respeito ao número baixo de amostras proveniente da ausência de informações clínico-patológicas e de descrição das evoluções nos prontuários médicos. Estudos de natureza epidemiológica necessitam de uma amostra consistente das informações clínicas e, portanto, todos os profissionais envolvidos no preenchimento de fichas e prontuários devem considerar o fato que esses arquivos serão de muita relevância para estudos futuros.

7 CONCLUSÃO

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

REFERÊNCIAS

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

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

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

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

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

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

ANEXO – Parecer do CEP



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo Clinicopatológico, Imuno-histoquímico, Hibridização in situ e Genética Molecular em Carcinomas Espinocelulares da Região de Cabeça e Pescoço.

Pesquisador:

JESSICA SANTOS

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 60786216.8.0000.5440

Instituição Proponente: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal:

Financiamento Próprio.

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.017.317

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

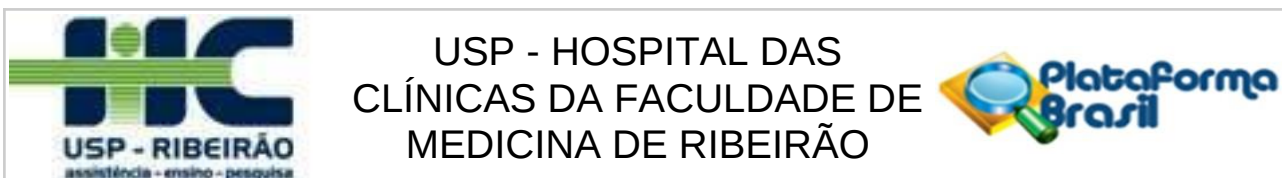
UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



Apresentação do Projeto:

O estudo propõe compreender melhor os mecanismos envolvidos na oncogênese viral e sua correlação com a expressão de marcadores de diferenciação/proliferação celular e exossomos, os quais visam estabelecer protocolos terapêuticos com impacto no prognóstico e sobrevida destes pacientes. Além disso, pela metodologia empregada, teremos a oportunidade de poder identificar subgrupos do CECCP, contribuindo com classificações modernas propostas pela OMS.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliando a complexidade que envolve o desenvolvimento do CECCP, passando por eventos que permitem sua progressão por meio da inibição ou ativação de diferentes mecanismos que desempenham um papel importante na progressão tumoral, e considerando a proposta de classificações modernas destes tumores, bem como de dados de prevalência variável de infecção viral, com implicações no prognóstico e tratamento, o objetivo do presente estudo será analisar comparativamente em uma ampla série de CECCPs, através de IQ, HIS e biologia molecular, o perfil da oncogênese viral e sua correlação com a proliferação e diferenciação celular, bem como definir o padrão da expressão de exossomos, visando uma compreensão mais abrangente das características clinicopatológicas destas neoplasias.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO



Avaliação dos Riscos e Benefícios:

não se aplica

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de emenda referente a inclusão de integrantes na equipe da pesquisa. Os participantes que serão incluídos na presente pesquisa ficarão responsáveis pelo processamento, avaliação de alguns dos marcadores imuno-histoquímicos, e revisão de prontuários.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos devidamente apresentados.

Recomendações:

não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP analisou e aprovou a inclusão dos seguintes integrantes na equipe da pesquisa: MAYKON KENNEDY SCHULZ OLIVEIRA;

Lucas Ribeiro Teixeira

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_895884_E1.pdf	06/04/2017 15:04:26		Aceito
Outros	InclusaoParticipantesPesquisa.jpg	04/04/2017 16:21:48	Carla Bento Nelem Colturato	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOPESQUISA2PlataformaBrasil.docx	16/01/2017 17:23:26	Carla Bento Nelem Colturato	Aceito
Orçamento	OrcamentoUPCcarimbado.jpg	16/01/2017 10:52:23	Carla Bento Nelem Colturato	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	CartaResposta.pdf	15/12/2016 23:14:26	Carla Bento Nelem Colturato	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoDESCOL.jpg	15/12/2016 23:00:59	Carla Bento Nelem Colturato	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE.pdf	15/12/2016 22:32:06	Carla Bento Nelem Colturato	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO



Continuação do Parecer: 2.017.327

Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	15/12/2016 22:32:06	Carla Bento Nelem Colturato	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	07/10/2016 13:53:23	Carla Bento Nelem Colturato	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRAO PRETO, 17 de Abril de 2017

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador)

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 13 de março de 2020.

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara, 13 de março de 2018.

Maykon Kennedy Schulz Oliveira