

BERENICE DI ANGELIS COELHO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS QUERATINAS 17 E 19 NO CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE BOCA E OROFARINGE E SUA RELAÇÃO COM A
AGRESSIVIDADE TUMORAL**

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Curso de Pós - Graduação em
Ciências da Saúde do Hospital
Heliópolis para obtenção do Título de
Mestre em Ciências da Saúde.

SÃO PAULO - SP

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

BERENICE DI ANGELIS COELHO

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS QUERATINAS 17 E 19 NO CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE BOCA E OROFARINGE E SUA RELAÇÃO COM A AGRESSIVIDADE
TUMORAL.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Curso de Pós - Graduação em Ciências
da Saúde do Hospital Heliópolis para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências da Saúde

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira Álvares da Silva
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Ana Maria da Cunha Mercante

**SÃO PAULO - SP
2009**

Coelho, Berenice A.

Avaliação da expressão das queratinas 17 e 19 no carcinoma epidermóide de boca e orofaringe e sua relação com a agressividade tumoral/ Berenice Di Angelis Coelho. -

São Paulo, 2009.

x, 46p.

Tese (Mestrado) Hospital Heliópolis de São Paulo. Curso de Pós Graduação em Ciências Saúde.

Título em inglês: Evaluation of expression of keratins 17 and 19 in squamous cells carcinomas of the mouth and oropharynx and the relationship with tumor aggressiveness.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Queratinas 17 e 19.
3. Agressividade tumoral.

Dedico este trabalho aos meus pais

Antonio e Rosa

pelo incentivo, orientação e estímulo

em minha carreira

profissional.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Abrão Rapoport**, Coordenador da Pós-Graduação do Hospital Heliópolis, pela oportunidade de realizar esse projeto.

À **Profª. Drª. Adriana Madeira Álvares de Silva**, minha orientadora, pela contribuição na elaboração desse trabalho.

À **Profª Drª Ana Maria da Cunha Mercante**, pela valiosa colaboração do início ao fim.

À **Rosicler Aparecida de Mello** pelo auxílio e amizade durante minha jornada de trabalho.

Ao **Laboratório de Patologia do Hospital A.C. Camargo** pela confecção dos blocos de *Tissue Array*.

À **Paula Chiappini**, pela confecção das lâminas de imuno-histoquímica.

Ao **Marcelo dos Santos**, pela importante ajuda na análise estatística.

Ao **Corpo Docente e funcionários do Curso de Pós-Graduação**, pelo apoio e dedicação.

A todos do **Departamento de Patologia do Hospital Heliópolis** pelo apoio em minha carreira profissional e pessoal.

Aos **alunos do Laboratório de Biologia Molecular** do Hospital Heliópolis.

Aos **pacientes**, dos quais foram originados os exames, meu agradecimento especial.

Ao **Christian Kather**, meu marido, pelo amor, paciência e vontade de ajudar sempre.

Às minhas irmãs **Cibele e Amanda**. Obrigada pelo amor e pela amizade.

A toda **minha família** pelo apoio em todas as etapas da minha vida

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	I
AGRADECIMENTOS.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	V
LISTA DE TABELAS.....	VI
LISTA DE QUADROS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
3.1. EPIDEMIOLOGIA DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA E OROFARINGE.....	4
3.2. FATORES DE RISCO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA E OROFARINGE.....	5
3.3. ASPECTOS PATOLÓGICOS DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA E OROFARINGE.....	6
3.4. ASPECTOS BIOMOLECULARES DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA E OROFARINGE..	7
3.5. QUERATINAS.....	8
4. CASUÍSTICA E MÉTODO.....	12
4.1. CASUÍSTICA.....	12
4.1.1. CARACTERIZAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA, CLÍNICA E HISTOPATOLÓGICA DOS INDIVÍDUOS...	13
4.2. MÉTODO.....	17
4.2.1. HISTOLOGIA.....	17
4.2.2. CONFECÇÃO DO <i>TISSUE MICROARRAY</i> (TMA).....	17
4.2.3. IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	19
4.2.4. METODOLOGIA DA ANÁLISE.....	20
4.2.5. ASPECTOS ÉTICOS.....	22
4.2.6. METODOLOGIA ESTATÍSTICA.....	23
5. RESULTADOS.....	25
6. DISCUSSÃO.....	40
7. CONCLUSÕES.....	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
FONTES CONSULTADAS.....	52
ANEXOS.....	53

"Sim, não tenhamos pressa. Mas não percam tempo".

(José Saramago)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotos do aparelho tissue arrayer.....	18
Figura 2. Mapa do bloco de tissue array.....	19
Figura 3. Foto da expressão positiva forte da K17 em carcinoma epidermóide.....	26
Figura 4. Foto da expressão positiva fraca da K17 em carcinoma epidermóide.....	27
Figura 5. Foto da expressão negativa da K17 em margem de carcinoma epidermóide.....	28
Figura 6. Foto da expressão positiva fraca da K17 em margem de carcinoma epidermóide.....	29
Figura 7. Foto de lâmina corada em H.E. demonstrando infiltração vascular linfática.....	31
Figura 8. Foto de lâmina corada em H.E. demonstrando necrose peritumoral.....	32
Figura 9. Foto da expressão positiva forte da K19 em carcinoma epidermóide.....	35
Figura 10. Foto da expressão positiva fraca da K19 em carcinoma epidermóide.....	36
Figura 11. Foto da expressão negativa da K19 em margem de carcinoma epidermóide.....	37
Figura 12. Foto da expressão positiva fraca da K19 em margem de carcinoma epidermóide.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação entre a expressão imuno-histoquímica da K17 no tumor e na margem.....	25
Tabela 2. Relação entre infiltração de vasos linfáticos e necrose e a expressão da K17.....	30
Tabela 3. Relação entre as características do tumor e a marcação para K17.....	33
Tabela 4. Relação entre a expressão imuno-histoquímica da K19 no tumor e na margem.....	34
Tabela 5. Relação entre as características do tumor e a marcação para K19.....	39

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Distribuição dos pacientes com relação ao gênero, idade e hábitos de tabagismo e etilismo.....	14
Quadro 2. Distribuição dos pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe em relação ao sítio.....	14
Quadro 3. Distribuição dos pacientes com relação ao estadiamento e aos dados anatomo-patológicos.....	16
Quadro 4. Listagem dos anticorpos utilizados no projeto em relação ao antígeno, clone e origem....	19
Quadro 5. Gradação da reação imuno-histoquímica de acordo com a intensidade.....	21
Quadro 6. Gradação da reação imuno-histoquímica de acordo com o número de células coradas...	21
Quadro 7. Interpretação da média calculada nos spots.....	22
Quadro 8. Demonstrativo das características clínico-patológicas com suas respectivas categorias..	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
H.E.	Hematoxilina e Eosina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
K17	Queratina 17
K19	Queratina 19
Kb	Quilobase (um segmento de DNA com 1000 bases)
KDa	Quilodaltons (peso das proteínas)
mRNA	RNA mensageiro
NCI	National Câncer Institute
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	PCR de transcrição reversa
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
μ	Micrômetro

RESUMO

Coelho, B. *Avaliação da expressão das queratinas 17 e 19 no carcinoma epidermóide de boca e orofaringe e sua relação com a agressividade tumoral*. [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Curso de Pós – Graduação em Ciências da Saúde do Hospital Heliópolis; 2009.

INTRODUÇÃO: O câncer oral é uma importante causa de morbi-mortalidade no mundo, sendo o carcinoma epidermóide o tipo histológico mais comum. Durante a transformação neoplásica são observadas alterações no tipo e na distribuição das queratinas. Em carcinomas epidermóides estão em grande quantidade e regulam a migração de células normais e células epiteliais alteradas. Vários estudos são desenvolvidos em relação ao carcinoma epidermóide de boca e orofaringe, seu comportamento biológico, agressividade e prognóstico, porém muitos aspectos ainda têm de ser melhor compreendidos. **OBJETIVOS:** Avaliar a expressão imuno-histoquímica das queratinas 17 e 19 no carcinoma epidermóide de boca e orofaringe e na margem cirúrgica. Comparar a expressão imuno-histoquímica das queratinas entre carcinomas epidermóides mais e menos agressivos, avaliados através de características histopatológicas e do TNM. **MÉTODO:** Foram analisadas amostras de tecido de carcinoma epidermóide de boca e orofaringe de 90 pacientes, tratados cirurgicamente. O material utilizado inclui tecido cirúrgico neoplásico e adjacente normal, provenientes de blocos parafinizados, sendo confeccionado um bloco de tissue array contendo amostras que foram avaliadas do ponto de vista histopatológico e imuno-histoquímico, com reações para os anticorpos: anti K17 e K19. As margens tumorais foram analisadas em cortes histológicos convencionais. **RESULTADOS:** O resultado da análise da K17 mostrou que do total de 90 casos de tecido tumoral, 65 (72,2%) casos apresentaram expressão, destes 44 (67,6%) foi positiva forte e 21 (32,3%) positiva fraca. Nas margens, 75 (88,2%) casos não expressaram K 17 ($p=0,000$). Em 5 (5,8%) casos a expressão foi positiva fraca na margem do tumor ($p=0,005$). Dos 65 casos positivos, 43 (66,1%) correspondem a pacientes com linfonodos comprometidos pela neoplasia ($p=0,09$). Dentre os casos com infiltração da neoplasia em vasos linfáticos 48 (78,6%) apresentaram marcação positiva para a K17 ($p=0,043$). Entre os casos com necrose peritumoral a positividade ocorreu em 58 casos (78,3%; $p=0,004$). Dos 90 casos avaliados ocorreu expressão positiva para a K 19 em 12 (13,3%), destes, 8 (66,6%) foi positiva forte e 4 (33,3%) positiva fraca. Na margem cirúrgica de segurança não ocorreu expressão em 79 (92,9%) casos ($p=0,021$). Três margens (3,5%) expressaram a K19, sendo que em uma a positividade foi fraca e em duas forte. Dos casos com presença de necrose 16,2% (12 casos) apresentaram marcação positiva para a K 19 ($p=0,092$). **CONCLUSÃO:** A expressão da K17 foi mais freqüente do que a K19 nos tumores e ambos não estiveram presentes de forma significativa nas margens. Não houve relação das K17 e K19 com as variáveis clínicas. Houve relação positiva entre a expressão da K17 com a agressividade tumoral.

Descritores: Carcinoma Epidermóide. Queratinas 17 e 19. Agressividade Tumoral. Câncer de Cabeça e Pescoço.

ABSTRACT

Coelho, B. *Evaluation of expression of keratins 17 and 19 in squamous cells carcinomas of the mouth and oropharynx and the relationship with tumor aggressiveness*. [Dissertation]. São Paulo: Curso de Pós – Graduação em Ciências da Saúde do Heliópolis Hospital, São Paulo; 2009.

INTRODUCTION: Oral cancer is a major cause of morbi-mortality worldwide, being squamous cell carcinoma the most common histological type. During the neoplastic transformation changes in the type and distribution of the keratins are observed. In squamous cell carcinomas, they are in great quantity and regulate the migration of normal cells and altered epithelial cells. Several studies have been developed in relation to squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx, its biological behavior, aggressiveness and prognosis, but many aspects still have to be better understood. **OBJECTIVES:** To evaluate the immuno-histochemical expression of keratins 17 and 19 in squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx, and in the surgical margin. To compare the immuno-histochemical expression of the keratins among more and less aggressive squamous cell carcinomas, evaluated through the histopathological characteristics and the TNM. **METHODS:** Mouth and oropharynx squamous cell carcinoma tissue samples of 90 surgically treated patients were analyzed. The material includes neoplastic surgical and normal adjacent, coming from paraffin blocks, having a tissue array been made containing samples that were evaluated from the histopathological and immuno-histochemical point of view, with reactions for the antibodies: anti K17 and k19. The tumor margins were analyzed under conventional histological cuts. **RESULTS:** The results of the analysis of K17 showed that of all the 90 tumor tissue cases, 65 (72.2%) cases showed expression, these 44 (67.6%) were strong positive and 21 (32.3%) weak positive. In the margins, 75 (88.2%) cases didn't express K17 ($p = 0000$). In 5 (5.8%) cases the expression was positive weak on the margin of the tumor ($p=0005$). Of the 65 positive cases, 43 (66.1%) corresponds to the patients with compromised lymph nodes from neoplasia ($p = 0.09$). Among the cases with neoplasia infiltration in lymphatic vessels 48 (78.6%) showed positive mark for the K17 ($p = 0,004$). Among the cases with peritumoral necrosis the positivity occurred in 58 cases (78.3%, $p = 0004$). Of the 90 evaluated cases a positive expression occurred for the K19 in 12 (13.3%), of these, 8 (66.6%) were strong positive and in 4 (33.3%) weak positive. In the surgical margin of security an expression didn't occur in 79 (92.9%) cases ($p = 0021$). Three margins (3.5%) expressed the K19, showing that in one the positivity was weak and two strong. Of the cases with presence of necrosis 16.2% (12 cases) showed a positive mark for the K19 ($p = 0092$). **CONCLUSION:** The expression of the K17 was more frequent than of the K19 in the tumors and both were not present in the significant ways in the margins. There was no relation of K17 and K19 with the clinical variables. There was a positive relation between the expression of the K17 with the tumor aggressiveness.

Key Words: Squamous Cell Carcinoma. Keratins 17 and 19. Tumor Aggression. Head and Neck Cancer.

1. INTRODUÇÃO

O câncer oral é uma importante causa de morbi-mortalidade no mundo, com taxas de incidência variando amplamente de acordo com a localização geográfica e dentro de uma mesma localização conforme idade, sexo e raça (SILVEIRA et al, 2007). Nos Estados Unidos o câncer de Cabeça e Pescoço corresponde a aproximadamente 3 a 5% de todas as neoplasias (NCI, 2009).

Os carcinomas da cavidade oral e orofaringe representam aproximadamente 3% de todas as lesões malignas em homens e 2% das mulheres nos Estados Unidos (VENTURI et al, 2004). No Brasil, as estimativas para o ano de 2008, de números de casos novos de câncer da cavidade oral foram de 10.380, segundo dados do INCA no ano de 2008.

A agressividade destes tumores está ligada a diversos fatores como o grau histológico de malignidade, grau de comprometimento dos tecidos vizinhos e presença de metástase para linfonodos regionais (SILVEIRA et al, 2007; LIU et al, 2008).

Dos tumores de cabeça e pescoço, o carcinoma epidermóide é o tipo histológico mais comum. Muitas alterações moleculares já foram descritas nesse tipo de tumor e que levam a modificações fenotípicas nas células e em sua organização celular (SILVEIRA et al, 2007), como por exemplo, em filamentos intermediários.

Filamentos intermediários, como as queratinas são componentes intracelulares essenciais e refletem distintas propriedades celulares e estádios de diferenciação em tecidos epiteliais (FILLIES et al, 2006). No epitélio escamoso da mucosa oral, algumas queratinas estão presentes em condições normais, no entanto durante a transformação neoplásica,

alterações no tipo e na distribuição das queratinas são vistas (REIBEL, 2003). No citoesqueleto de epitélios, as queratinas são importantes para manter a integridade e estabilidade das células epiteliais. Algumas queratinas também têm função regulatória e estão envolvidas em sinalização intracelular, como na apoptose, por exemplo (MOLL et al, 2008). Em carcinomas epidermóides estão em grande quantidade e regulam a migração de células normais e células epiteliais alteradas (CROWE et al, 1999).

Os progressos na compreensão da biologia das queratinas e o desenvolvimento de anticorpos monoclonais para proteínas individuais são a base para o estudo da expressão dessas proteínas no epitélio oral normal e patológico (RAM PRASSAD et al, 2005).

Há uma busca incessante de fatores prognósticos que possam contribuir para o planejamento terapêutico de pacientes com câncer, identificando aqueles com maior probabilidade de se beneficiarem com as diferentes opções de tratamento (AMAR et al, 2002).

Vários estudos são desenvolvidos em relação ao carcinoma epidermóide de boca e orofaringe, seu comportamento biológico, agressividade e prognóstico, porém muitos aspectos ainda têm de ser melhor compreendidos, para maior direcionamento do prognóstico e tratamento. (UPPALURI et al, 2008; SCULLY e BURKHARDT, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a expressão imuno-histoquímica das queratinas 17 e 19 no carcinoma epidermóide de boca e orofaringe e na margem cirúrgica.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a relação da expressão das queratinas 17 e 19 com as variáveis clínicas e o TNM.
- Avaliar a relação das queratinas 17 e 19 com a agressividade tumoral.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Epidemiologia do carcinoma epidermóide de boca e orofaringe

O carcinoma epidermóide é a neoplasia mais frequente da cavidade oral, correspondendo a 90% das neoplasias desta localização (VENTURI et al, 2004). Entre todas as neoplasias malignas de cabeça e pescoço, corresponde a 38%. Este tipo de tumor pode ocorrer em qualquer parte da cavidade oral, mas os locais principais são soalho da boca, face ventral da língua, palato mole e base da língua (SILVEIRA et al, 2007).

Estes tumores são mais comuns em homens com mais de 50 anos de idade (NCI, 2007). A mortalidade por câncer de boca corresponde a menos de 30% dos casos novos. A sobrevida média estimada em cinco anos é aproximadamente cerca de 60% nos países desenvolvidos e 40% naqueles em desenvolvimento. A média mundial estimada é de 46%. No Brasil, os maiores valores das taxas médias anuais de incidência, ajustadas por idade por 100 mil homens, foram constatados em São Paulo (1997-1998), com taxa média anual de 7,6 (INCA, 2008).

A maioria dos pacientes tem doença avançada no diagnóstico (estádio III e IV). A sobrevida tem relação inversa com o estágio avançado do tumor. A presença de metástases linfáticas se relaciona com redução de 50% na expectativa de vida (MYERS 1998; ZHEN et al, 2004). Por isso, o diagnóstico precoce é importante e a descoberta de marcadores moleculares para a doença, é objetivo de estudo de muitos grupos de pesquisa.

O estadiamento é baseado na classificação segundo o TNM (UICC, 2002), o qual indica o prognóstico e o melhor planejamento para o tratamento adequado. O TNM avalia importantes características como extensão local, disseminação regional e metástase à distância (DANTAS et al, 2003; ARAÚJO et al, 2006). Porém para a classificação não estão associadas características biológicas do tumor, como por exemplo, expressão de proteínas específicas, que hoje se mostram de grande importância para o prognóstico e tratamento.

3.2 Fatores de risco do carcinoma epidermóide de boca e orofaringe.

Os estudos epidemiológicos mostram que o risco de desenvolvimento de câncer oral é de cinco a nove vezes maiores em tabagistas do que em não tabagistas, mantendo relação direta com a quantidade consumida. O uso do álcool também é fator de risco para o desenvolvimento do câncer das vias aerodigestivas superiores e potencializa a ação do tabaco (FORASTIERE et al, 2001; NEVILLE et al, 2002).

Além do aumento do risco pelo uso do tabaco e do álcool, aproximadamente 50% dos carcinomas epidermóides de orofaringe, particularmente nas tonsilas e na base de língua, evidenciam variantes oncogênicas do papilomavírus humano (HPV), principalmente dos sorotipos 16 e 18. A irritação por próteses dentárias, dentes pontiagudos ou infecções crônicas não são mais consideradas como importantes antecedentes diretos do câncer oral, porém podem contribuir para o desenvolvimento de leucoplasia, que constitui uma base para o desenvolvimento do câncer oral (FREEMAN, 2004; WARD et al, 2004).

Segundo Gillison (2007), outros fatores de risco estão ligados ao carcinoma epidermóide de boca e orofaringe, como a dieta e o índice de massa corpórea. Há uma forte e consistente associação entre o risco de desenvolver câncer oral e o baixo consumo de frutas e vegetais. Pacientes que tem o hábito de consumir grande quantidade de frutas e vegetais tem

menor risco para o desenvolvimento deste tipo de câncer. Porém o fator protetor da dieta pode ser modificado por outros fatores de risco. A deficiência crônica nutricional pode contribuir para o risco de câncer oral. No entanto o baixo índice de massa corpórea foi encontrado principalmente entre os fumantes e etilistas. De acordo ainda com Gillison, poucas doenças hereditárias têm sido associadas com o aumento de risco para o câncer oral, um exemplo destas doenças é a anemia de Fanconi, no qual há um defeito em 11 genes envolvidos no reconhecimento e reparo do DNA. A mutação do p16 também está associada à história familiar de câncer oral em pacientes jovens.

3.3 Aspectos patológicos do carcinoma epidermóide de boca e orofaringe.

Em estágios iniciais, o carcinoma epidermóide da cavidade oral surge como placas firmes, elevadas, brancas, ou como áreas irregulares, ásperas ou verrucosas, podendo em ambos os casos, sobrepor-se a uma base de leucoplasia ou eritroplasia. Com o crescimento dos tumores eles se mostram como massas exuberantes, salientes ou sofrem necrose central, com superfície ulcerada, bordas elevadas e firmes (EPSTEIN et al, 2008; ROBBINS, 2008).

De acordo com as alterações histológicas, o carcinoma epidermóide tem início nas camadas mais superficiais com o aparecimento de células epiteliais displásicas, exibindo aparência diferente das células escamosas do epitélio normal, apresentando posteriormente, um comportamento invasivo para o tecido conjuntivo subjacente (VENTURI et al, 2004).

Dentre as localizações anatômicas, o câncer de língua apresenta um alto potencial de invasão e grande probabilidade de desenvolver metástases para linfonodos regionais, pois existe grande drenagem linfática nesta região. Com relação às metástases distantes, os locais mais frequentes são linfonodos mediastinais, pulmões, fígado e ossos. Essas metástases muitas vezes estão ocultas no momento do diagnóstico da lesão primária. (SILVEIRA et al, 2007).

Slaughter et al (1953), estudando câncer bucal, utilizaram pela primeira vez o termo cancerização de campo. Esse estudo baseou-se em análises histológicas de tumores de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e demonstrou que: a) o câncer oral desenvolve-se em áreas de lesões multifocais com alterações pré-cancerosas; b) um tecido anormal circunda a neoplasia; c) as múltiplas lesões são independentes; d) a permanência do tecido anormal após a cirurgia pode explicar a recorrência do tumor (SLAUGHTER et al, 1953; BRAAKHUIS et al, 2003; HA e CALIFANO, 2003).

3.4 Aspectos biomoleculares do carcinoma epidermóide de boca e orofaringe.

Bases moleculares do processo de carcinogênese foram pesquisadas utilizando como modelo o carcinoma colorretal. Esse modelo propõe que um acúmulo de alterações genéticas ao longo do tempo leva o tecido normal ao carcinoma invasivo, passando por hiperplasia e displasia celular (FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

A maioria das alterações genéticas importantes no desenvolvimento do câncer ocorre nos genes que controlam a proliferação celular (oncogenes e genes supressores tumorais), ou ainda genes associados ao processo de reparo de danos no DNA, os quais, quando inativos, podem levar ao aumento das taxas de mutação, causando eventualmente a alteração de genes importantes na carcinogênese (OJOPI e NETO, 2002).

O desenvolvimento do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço ocorre em múltiplas etapas, que incluem a perda de controle do ciclo celular, perda da capacidade de apoptose e reativação da telomerase. Além da p53 e p16, a perda da proteína rb, a inativação de p27 e a amplificação do oncogene ciclina *D1* podem levar à progressão tumoral (CHOI E MEYERS, 2008; GLEICH et al, 2002; RAYBAUD et al, 2003).

Durante a formação do carcinoma epidermóide ocorrem alterações genéticas que levam à alterações fenotípicas (SILVEIRA et al, 2007). Esse fato pode ser analisado por expressões alteradas de filamentos intermediários de queratinas, os quais compõem um sistema de estruturas filamentosas presentes no citoplasma e núcleo de células eucarióticas. Os filamentos intermediários apresentam composição protéica, sendo que as queratinas constituem um dos cinco grupos distribuídos nos diferentes tecidos (FUDGE et al, 2008; COULOMBE et al, 2001).

3.5 Queratinas

Filamentos intermediários de queratina são característicos das células de origem epitelial. Nestes epitélios as células predominantes contêm em seu citoplasma abundantes filamentos de 80 Å (8 nm), na forma de feixes, correspondendo a cerca de 30% da proteína total da célula. As queratinas compõem uma família de polipeptídeos com peso molecular que varia de 40-65 kDa. De acordo com o tipo de tecido epitelial, podem exibir diferenças no número de subunidades de polipeptídeos, bem como em seus pesos moleculares. Diferentes grupos de queratinas são expressos em vários tipos de epitélio escamoso estratificado *in vivo*. No tecido humano são representados por 20 polipeptídeos diferentes que foram numerados de 1 a 20, de acordo com seus pesos moleculares e pontos isoelétricos. Estes peptídeos são expressos nos epitélios em combinações específicas para cada tipo celular (ALMEIDA Jr, 2004).

Segundo Fuchs e Cleveland (1998), mais de 20 tipos de queratinas diferentes foram descritas e podem ser subdivididas em duas classes: queratinas tipo I e queratinas tipo II. As queratinas do tipo I são moléculas pequenas com 40 a 56,5 kDa relativamente ácidas e compreendem as queratinas de 10 a 19, já as queratinas do tipo II são mais básicas e maiores

com 53 a 68 kDa. A formação de filamentos normalmente requer a expressão de queratinas em pares, consistindo uma do tipo I e outra do tipo II.

O gene responsável pela codificação da queratina 17 está localizado no cromossomo 17 na região q12-q21, possuindo 5 kb de comprimento. O gene possui 8 exons que codificam uma proteína com 432 aminoácidos, um filamento intermediário de classe I, que é expresso em células basais do epitélio complexo em base de unha, folículo capilar, glândulas sebáceas e outros apêndices epiteliais, não sendo descrita como expressa em tecido epitelial simples ou estratificado (TROYANOVSKY et al, 1992). A queratina 17 está catalogada no *site* do NCBI com números NM_000422.1 (Entrez-Gene) e MIN 148069 (OMIN) (NCBI, 2008).

Estudos posteriores como no de Van de rijn et al (2002) estudaram a relação da queratina 17 com o câncer de mama e seu prognóstico. Análises de imuno-histoquímica realizadas em *tissue microarray* contendo 611 tumores relacionaram a expressão das queratinas 5 e 17 a um pior prognóstico.

Cohen-Kerem et al (2004) demonstraram a relação entre a queratina 17 e o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço através de estudo utilizando a técnica de imuno-histoquímica em 63 amostras de carcinoma epidermóide de laringe. Neste trabalho, intensidade de marcação do anticorpo da queratina 17 foi significativamente maior em células tumorais, displásicas e em epitélio normal próximo ao tumor quando comparados a expressão dos tecidos normais distantes do tumor.

Regauer e Reich (2007) alisaram por imuno-histoquímica com anticorpos para queratina 17, p16 e p63, setenta e cinco amostras de biópsia cervical, curetagens e cones contendo variadas proporções de displasia e metaplasia e vinte casos diagnosticados como metaplasia atípica imatura. Na metaplasia imatura as células proliferadas foram imunoreativas para a queratina 17 e para o p63, enquanto que o p16 foi negativo. Todas as células displásicas da neoplasia intraepitelial grau III demonstraram imunoreatividade uniforme para o

p16 e p63, mas estavam negativas para a queratina 17. Eles concluíram que a metaplasia imatura atípica é um descritor histológico útil, mas não deve ser utilizado como diagnóstico final. A imuno-histoquímica para p16 e queratina 17 permite a distinção entre metaplasia e neoplasia intra-epitelial de alto grau.

Ikeda et al (2008) realizaram um estudo, através da análise da coloração imuno-histoquímica do p16, queratina 8 e 17 em 134 amostras de tecido cervical obtidos de biópsias. Com os resultados concluíram que a positividade para as queratinas 8 e 17 estão correlacionadas com o aumento do grau das lesões intra-epiteliais e com o carcinoma de células escamosas.

As queratinas 17 e 19 estão localizadas no mesmo cromossomo muito próximas em uma região cromossômica de 150kb que também contém as queratinas 13, 14, 15, 16 (CERATTO et al, 1997).

A queratina 19 é uma proteína que está envolvida no desenvolvimento da epiderme encontrada na superfície da pele e está catalogada no site do NCBI com NM_002276.3 com número do MIN 148020 (OMIN) (NCBI, 2008).

A queratina 19 é quase exclusivamente expressa em células do epitélio brônquico, de tecidos pulmonares malignos e principalmente no câncer de pulmão, que não seja o de células pequenas. (PRADAL et al, 1999).

Crowe et al (1999) realizaram experimentos utilizando a técnica de imuno-histoquímica e encontraram menor expressão da queratina 19 em linhagens celulares de carcinoma epidermóide oral em tumores mais invasivos. Maior expressão de queratina 19 foi relacionada ainda à diminuição da capacidade celular de migrar pela lâmina basal.

Rosa et al (2005) estudaram a expressão imunohistoquímica de neoplasias epiteliais tireóideas utilizando anticorpos monoclonais para galectina-3 e queratina 19, em 84 casos. O padrão de expressão da queratina 19 foi diferente entre os tipos de lesão, enquanto nos

bócios e adenomas mostrou-se fraco, nos carcinomas papilíferos foi forte e difuso. E a expressão da galectina-3 foi mais significativa nos carcinomas. Foi concluído neste estudo que associadas, a galectina-3 e a queratina 19 auxiliam o diagnóstico histopatológico, além de evidenciarem atipias e com isso, determinarem a presença de uma lesão suspeita.

Suo et al (2006) utilizaram o estudo histopatológico e a expressão de mRNA da queratina 19 detectada por RT-PCR em tecidos de tumores e linfonodos de pacientes com câncer gástrico após ressecção radical do tumor, sendo concluído que mRNA K19 por RT-PCR é sensível e específico para exames em micrometástases em linfonodos regionais no câncer gástrico.

Lalli et al (2008) analisaram o padrão de expressão de 22 anticorpos monoclonais anti-queratinas em 28 amostras de fibrose oral submucosa. Foi observado um aumento de queratinas 1 e 10 nas camadas supra-basais, a indução de queratina 6 na camada basal e completa ausência de queratina 19 no epitélio. Além disso, houve um aumento da expressão da queratina 17 nas camadas supra-basais, que foi correlacionado com a severidade da doença. Em uma parte dos casos mais severos de fibrose oral submucosa (14%), a expressão da queratina 17 foi completamente perdida na camada basal, a qual pode ser definida como maior risco para transformação maligna.

Toyoshima et al (2008) realizaram um trabalho com 10 amostras de carcinoma epidermóide oral e 5 amostras de mucosa normal. Foram avaliados os padrões de expressão de 31 queratinas. As que tiveram expressão mais pronunciada foram as queratinas 17, 19 e 20, que foram avaliadas em 46 amostras de carcinoma epidermóide oral por quantificação relativa usando RT-PCR em tempo real. Os resultados mostraram que a queratina 17 teve uma maior expressão quando comparado às amostras normais e teve expressão significativa associado ao diagnóstico ($p=0.002$). Foi concluído que a queratina 19 pode ser utilizada para o estudo da progressão clínica e na diferenciação do tumor e a queratina 17 é um marcador

mais apropriado para o diagnóstico de carcinoma epidermóide oral, dentre as queratinas estudadas.

4. CASUÍSTICA E MÉTODO

Este projeto está inserido no projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço e foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Heliópolis e no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Heliópolis.

4.1 Casuística

Foram selecionados 95 pacientes com carcinoma epidermóide de boca e orofaringe, tratados cirurgicamente, atendidos no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital Heliópolis, São Paulo – SP, entre os anos de 2002 a 2005. Os pacientes foram caracterizados segundo o gênero, idade, hábito de fumar, etilismo e de acordo com a classificação histológica do tumor segundo TNM e o CID, para avaliação da agressividade tumoral e evolução clínica.

Os casos incluídos no estudo foram classificados pelo Código Internacional de Doenças (CID) e incluem o C02 (Borda/Corpo da língua), C03 (Gengiva), C04 (Soalho da Boca), C01 (Base da Língua), C05 (Palato), C06 (Área retromolar), C09 (Tonsila Palatina) e C10 (Orofaringe).

Dos casos de carcinoma epidermóide de boca e orofaringe foram excluídos os casos em que os pacientes haviam feito algum tipo de tratamento prévio à cirurgia e os casos de neoplasias de lábio (por apresentar fatores de risco diferentes dos de boca, como exposição à luz solar). Além disso, foram excluídos os casos em que não havia material representativo para análise, desta forma o número de casos estudados foi 90.

Os dados relacionados aos pacientes e ao tumor, como a classificação do sistema TNM (UICC, 2002), foram obtidos a partir das informações do arquivo do Serviço de Anatomia

Patológica do Hospital Heliópolis e dos prontuários dos pacientes (do banco de dados do Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço).

Todos os pacientes têm confirmação histológica do diagnóstico e blocos parafinizados do tumor primário. Os casos foram revisados e reclassificados segundo a OMS, 2002 e os critérios histológicos reavaliados foram o grau de diferenciação, desmoplasia, intensidade de infiltrado inflamatório, infiltração perineural, necrose e invasões vasculares linfática e sangüínea.

O material utilizado nesse trabalho inclui tecido cirúrgico neoplásico e adjacente normal, provenientes de blocos parafinizados. Porém, como a disponibilidade de tecido é limitada, foi confeccionado um bloco de *tissue array* contendo amostras que foram avaliadas do ponto de vista imuno-histoquímico.

4.1.1 Caracterização epidemiológica, clínica e histopatológica dos indivíduos.

Do ponto de vista epidemiológico 86 % dos pacientes eram do sexo masculino. A proporção entre homens e mulheres foi de seis homens para cada mulher. A idade dos pacientes participantes do trabalho variou entre 24 e 81 anos de idade, com média de idade de 52,5 anos. A maioria dos pacientes (67%) tinha mais que 50 anos (Quadro 1).

Em relação ao uso do tabaco declararam-se tabagistas 96% dos pacientes. Os etilistas foram 87% dos pacientes. Pacientes sem hábito tabagista e etilista representaram 2% da amostra (Quadro 1).

Quadro 1. Distribuição dos pacientes com relação ao gênero, idade e hábitos de tabagismo e etilismo

<i>Variável</i>	<i>Classificação</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Gênero	Feminino	13	14%
	Masculino	77	86%
Idade	<50	30	33%
	>50	60	67%
Tabagismo	Sim	86	96%
	Não	4	4%
Etilismo	Sim	78	87%
	Não	12	13%
Etilismo e tabagismo	Etilismo e/ou tabagismo	88	98%
	Não tabagista e etilista	2	2%
	Etilismo e não tabagismo	2	2%
	Tabagismo e não etilismo	5	6%

A amostra evidenciou uma localização prevalente na língua com 33% e soalho bucal 22%, em relação à análise da Classificação Internacional de Doenças – CID (Quadro 2).

Quadro 2. Distribuição dos pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe em relação ao sítio.

	Sítio	n (n=90)	%
C01	Base língua	5	6%
C02	Borda/Corpo língua	29	33%
C03	Gengiva	15	17%
C04	Soalho de boca	20	22%
C05	Palato	4	4%
C06	Área retromolar/Mucosa Oral	4	4%
C09	Loja tonsilar	9	10%
C10	Orofaringe	4	4%

Em relação ao estadio clínico dos pacientes, a maioria foi diagnosticada em estadio avançado (estádio III, 40% e IV, 39%).

De acordo com o estadiamento patológico, 58% da amostra apresentaram ao diagnóstico tumor pT3 e pT4. A maior parte dos pacientes (61%) apresentava linfonodos acometidos pela doença (Quadro 3).

A reavaliação dos critérios histológicos mostrou que somente 9% eram pouco diferenciados. Seis (7%) casos apresentavam infiltração vascular sanguínea e 61 (68%) infiltração vascular linfática. A invasão perineural estava presente em 44 (49%) casos. O infiltrado inflamatório era escasso em 35 (39%) casos e moderado ou intenso em 54 (61%). A desmoplasia foi classificada como leve, moderada ou intensa, tendo como resultados 42 (47%), 30 (34%) e 17 (19%) casos respectivamente. Com relação à necrose em 74 (83%) casos estava presente (Quadro 3).

Quadro 3. Distribuição dos pacientes com relação ao estadiamento e aos dados anátomo-patológicos.

<i>Variável</i>	<i>Classificação</i>	<i>n</i>	<i>%</i>
Estadiamento clínico	I	3	3%
	II	16	18%
	III	36	40%
	IVA	34	38%
	IVB	1	1%
Estadiamento patológico			
pT	1	5	6%
	2	32	36%
	3	22	24%
	4	31	34%
pN	0	35	39%
	1	20	22%
	2	34	38%
	3	1	1%
Dados anátomo-patológicos			
Grau de diferenciação	Bem	40	44%
	Moderado	42	47%
	Pouco	8	9%
Linfonodos comprometidos	Sim	55	61%
	Não	35	39%
Infiltração vascular sanguínea	Presente	6	7%
	Ausente	84	93%
Infiltração vascular linfática	Presente	61	68%
	Ausente	29	32%
Invasão perineural	Presente	44	49%
	Ausente	46	51%
Infiltrado inflamatório peritumoral	Escasso	35	39%
	Moderado	40	44%
	Intenso	15	17%
Desmoplasia	Leve	42	47%
	Moderada	31	34%
	Intensa	17	19%
Necrose	Presente	75	83%
	Ausente	15	17%

4.2 Método

4.2.1 Histologia

O grau de diferenciação histológica foi separado em 3 graus, bem, moderadamente e pouco diferenciado, de acordo com as semelhanças com as células escamosas normais, como por exemplo, a queratinização e grau de atipia nuclear (OMS, 2002).

A infiltração vascular sanguínea, linfática, invasão perineural e necrose foram avaliadas quanto à presença ou ausência. Já o infiltrado inflamatório peritumoral e a desmoplasia foram avaliados e categorizados em leve, moderado ou intenso (OMS, 2002).

4.2.2 Confecção do *Tissue microarray* (TMA)

Para melhor aproveitamento do uso dos anticorpos e economia de material emblocado, optamos pela confecção de um *tissue microarray* de carcinoma epidermóide de boca e orofaringe.

Após a revisão das 90 lâminas coradas pelo método de hematoxilina e eosina (H.E.) dos blocos selecionados, estas foram analisadas e duas áreas foram delimitadas com caneta apropriada para marcação (as áreas marcadas foram representativas do tumor). Posteriormente, foram delimitadas as áreas nos blocos de parafina, chamados de blocos doadores.

Dos blocos doadores foram retirados fragmentos cilíndricos de 1mm e estes acondicionados em um outro bloco chamado de bloco receptor. Cada bloco doador foi representado em duplicata no bloco receptor. Esta etapa foi realizada em um aparelho preciso ("Tissue Arrayer") da marca Beecher Instruments® (Silver Spring MD), no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer São Paulo, ilustrado na Figura 1. Os casos foram

previamente dispostos em ordem numérica crescente de acordo com o registro de prontuário da cabeça e pescoço do Hospital Heliópolis e amostrados em duplicata, foi representado também uma amostra de fígado que serve como marcador de posição dos casos (Figura 2).

Em seguida esses blocos foram levados ao micrótomo de parafina e obtidos cortes histológicos seqüenciais de 3 μ que foram dispostos em lâminas com adesivos da marca Microsystems Inc®.

As lâminas de TMA foram desparafinadas, desidratadas e cortes histológicos a cada 9 níveis diferentes foram corados pelo H.E., apenas para avaliação da representação das amostras. Posteriormente foram selecionadas duas lâminas de cada bloco para cada anticorpo para serem submetidas à reação imuno-histoquímica (RIMM et al 2001; HEDVAT et al 2002).

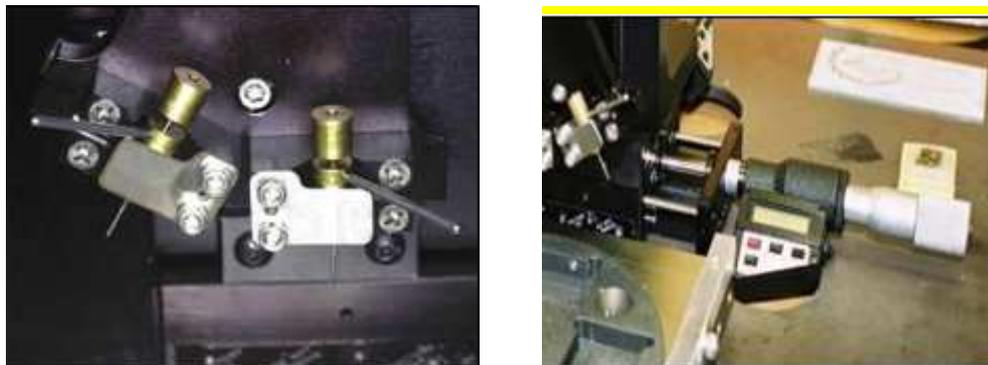


Figura 1. Fotos do aparelho tissue arrayer da marca Beecher Instruments® (Silver Spring MD)

Liver Core	2257	2434	2484	2500	2501	2512	2518	2544	2548	2576	3006	3008	3018	3020	3028
3091	3124	3141	3147	3160	3186	3202	3249	3290	3292	3294	3335	3357	3364	3368	3412
3416	3431	3435	3444	3460	3474	3478	3498	3507	3541	3547	3557	3559	3563	3608	4062
4084	4088	4124	4135	4136	4144	4159	4160	4168	4179	4221	4239	4304	4392	4424	4435
4538	4441	4451	4469	4483	4538	4549	4553	4589	4649	4659	4686	5066	5073	5182	5215
5234	5248	5251	5266	5280	5295	5361	5375	5437	5509	5523	5557	5578	5633	5666	5695

Liver Core	2257	2434	2484	2500	2501	2512	2518	2544	2548	2576	3006	3008	3018	3020	3028
3091	3124	3141	3147	3160	3186	3202	3249	3290	3292	3294	3335	3357	3364	3368	3412
3416	3431	3435	3444	3460	3474	3478	3498	3507	3541	3547	3557	3559	3563	3608	4062
4084	4088	4124	4135	4136	4144	4159	4160	4168	4179	4221	4239	4304	4392	4424	4435
4538	4441	4451	4469	4483	4538	4549	4553	4589	4649	4659	4686	5066	5073	5182	5215
5234	5248	5251	5266	5280	5295	5361	5375	5437	5509	5523	5557	5578	5633	5666	5695

Figura 2. Mapa do bloco de *tissue array* construído com 95 amostras mais uma de fígado como marcador da posição dos casos inseridos.

4.2.3 Imuno-histoquímica

Uma vez selecionados os casos e construído o bloco de *tissue microarray* dos blocos de tumores e selecionados blocos das margens o painel imuno-histoquímico (IHQ) foi completado, realizando-se reações para os anticorpos: anti K17 e K19 com respectivos clones e origem de fabricação referidos no quadro abaixo.

Quadro 4. Listagem dos anticorpos utilizados no projeto em relação ao antígeno, clone e origem.

Anticorpo	Clone	Origem	Diluição
Anti-K 17	E3	DakoCytomation®	1/40
Anti-K 19	KS 19.1	Santa Cruz®	1/100

As reações de imuno-histoquímicas foram realizadas pela técnica de complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (StreptABC, DAKO®) (Anexo II). Foi realizado um controle positivo e três controles negativos para cada reação.

Após a hidratação do tecido em álcool com progressiva graduação, seguiu-se a inibição da peroxidase endógena utilizando o tratamento com peróxido de hidrogênio a 3% durante 15 minutos. Após lavagem em Tris, as lâminas foram imersas em tampão citrato (pH 6,0) e aquecidas em panela a vapor a 90°C por 30 minutos.

Realizada incubação com anticorpo primário, diluído em título estabelecido em tampão PBS contendo albumina bovina BSA a 1% (SIGMA) e azida sódica (NaN₃) 0,1%, em câmara úmida, 18 horas (*over-night*). Após nova lavagem com PBS, as lâminas foram incubadas com os anticorpos secundário e terciário durante 40 minutos. A revelação empregou substrato cromogênico, contra-corado por hematoxilina de Harrys.

4.2.4 Metodologia de análise

Para o *tissue array*, foram confeccionadas duas lâminas por anticorpo. Como cada lâmina do *tissue array* possui dois *spots* de tecido tumoral do mesmo paciente, foram analisados 4 *spots* por paciente e calculada uma média aritmética do resultado das análises. As margens tumorais foram analisadas em cortes histológicos convencionais.

Os critérios utilizados para a quantificação das proteínas por imuno-histoquímica variaram de acordo com a localização, intensidade de expressão e a frequência de marcação SOINI et al (2000).

A Intensidade da marcação pode ser subdividida em 4 graus com a seguinte graduação demonstrada no Quadro 5.

Quadro 5. Gradação da reação imuno-histoquímica de acordo com a intensidade.

Descrição da intensidade	Grau
Coloração negativa	0
Coloração de intensidade fraca	1
Coloração de intensidade moderada	2
Coloração de intensidade forte	3

Quanto à frequência, foi dividida em 5 graus com a seguinte graduação demonstrada no Quadro 6. Posteriormente foram multiplicadas a intensidade e a frequência de células coradas em cada spot. Após o cálculo do escore final nas quatro observações, foi calculada a média entre eles (SOINI et al, 2000 modificado).

Quadro 6. Gradação da reação imuno-histoquímica de acordo com o número de células coradas.

Descrição do número de células coradas	Grau
Menor que 5 %	0
Entre 5 % e 10 %	1
Entre 11 % e 50 %	2
Entre 51 % e 90 %	3
Maior que 90 %	4

A interpretação foi dividida em 3 graus, negativo, positivo fraco e positivo forte com a graduação demonstrada no quadro 7.

Quadro 7. Interpretação da média calculada nos spots.

Média	Interpretação
0 a 3	Negativo
Entre 3,1 e 5,0	Positivo fraco
Maior que 5,1	Positivo forte

As margens foram interpretadas da mesma forma, não sendo necessário realizar média por ser somente um valor de intensidade e número de células coradas.

4.2.5 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Heliópolis em 14 de dezembro de 2007, sob número 446 e é subprojeto do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço, também aprovado pelo CEP do Hospital Heliópolis sob número 386 aprovado em 15 de abril de 2005 (Anexo I).

O material utilizado para a realização do estudo consistiu de tecido parafinado que foi coletado e armazenado regularmente após o ato cirúrgico pelo Serviço de Anatomia Patológica.

Os participantes do estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido do Projeto Genoma Clínico do Câncer de Cabeça e Pescoço e muitos foram a óbito dada a agressividade da doença.

A relação entre a genética e os benefícios diretos aos pacientes está bem estabelecida em câncer medular de tireóide, câncer de mama e cólon, na qual marcadores moleculares são utilizados na prática clínica. Porém para os marcadores em questão, ainda

em estudos preliminares, muito possivelmente, não haverá benefícios diretos em decorrência da pesquisa aos pacientes deste estudo, porém, os resultados poderão beneficiar, no futuro, outros pacientes.

Se os resultados obtidos em relação à análise genética trouxerem benefícios em relação ao diagnóstico ou prognóstico da doença, asseguraremos o contato com os pacientes envolvidos no estudo e divulgação dos dados obtidos e caso seja necessário, o aconselhamento genético, conforme a resolução no. 347 do Conselho Nacional de Saúde (13 de janeiro de 2005). Os resultados obtidos desse trabalho serão enviados à publicação em revista científica, garantindo o sigilo e respeito a confidencialidade dos sujeitos envolvidos no trabalho.

4.2.6 Metodologia Estatística

A diferença entre margens e tumores segundo a expressão da proteína estudada foi verificada pela análise bivariada calculada através do Qui-quadrado e teste exato de Fisher com o teste do nível de significância de Lilliefors (significância de $p < 0,05$). Igualmente foram analisadas as características clínico-patológicas descritas no Quadro 7, onde o tamanho do tumor e metástase regional seguem a classificação internacional do TNM e têm o diagnóstico confirmado pela Anatomia Patológica (pT e pN).

O *odds ratio* (OR) e o intervalo de confiança (IC 95%) foram calculados através da regressão logística binária. A regressão logística multivariada foi utilizada para ajustar os valores OR, onde foram consideradas as variáveis que apresentaram o valor de $p < 0,20$ quando testada a associação coma característica analisada.

Quadro 8. Demonstrativo das características clínico-patológicas com suas respectivas categorias.

Características clínico-patológicas	Categorias
Tamanho do tumor (pT)	1) pT1, 2) pT2, 3) pT3 e 4) pT4
Linfonodo acometido (pN)	1) ausente e 2) presente
Invasão extracapsular	1) ausente e 2) presente
Grau de diferenciação	1) bem, 2) moderadamente e 3) pouco diferenciado
Embolização linfática	1) ausente e 2) presente
Invasão perineural	1) ausente e 2) presente
Infiltrado inflamatório peritumoral	1) ausente+escasso e 2) moderado+intenso
Desmoplasia	1) leve, 2) moderada e 3) intensa
Necrose	1) ausente e 2) presente

5. RESULTADOS

O resultado da análise da marcação para K17 mostrou que do total de 90 casos de tecido tumoral, 65 (72,2%) casos apresentaram expressão, destes 44 (48,9%) foi positiva forte e 21 (23,3%) positiva fraca (figuras 3 e 4). As margens foram avaliadas, sendo que em 75 (93,7%) casos não houve expressão de K 17 ($p=0,000$) (Figura 5). Em 5 (6,3%) casos a expressão foi positiva fraca na margem do tumor ($p=0,005$) (Figura 6). Esses dados podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Relação entre a expressão imuno-histoquímica da K17 no tumor e na margem cirúrgica de segurança.

K17	Tumor		Margem		p value
	N	%	n	%	
Positiva forte	44	48,9%	0	0	0,005
Positiva fraca	21	23,3%	5	6,3%	
Negativa	25	27,8%	75	93,7%	0,000
Total	90	100%	80	100%	

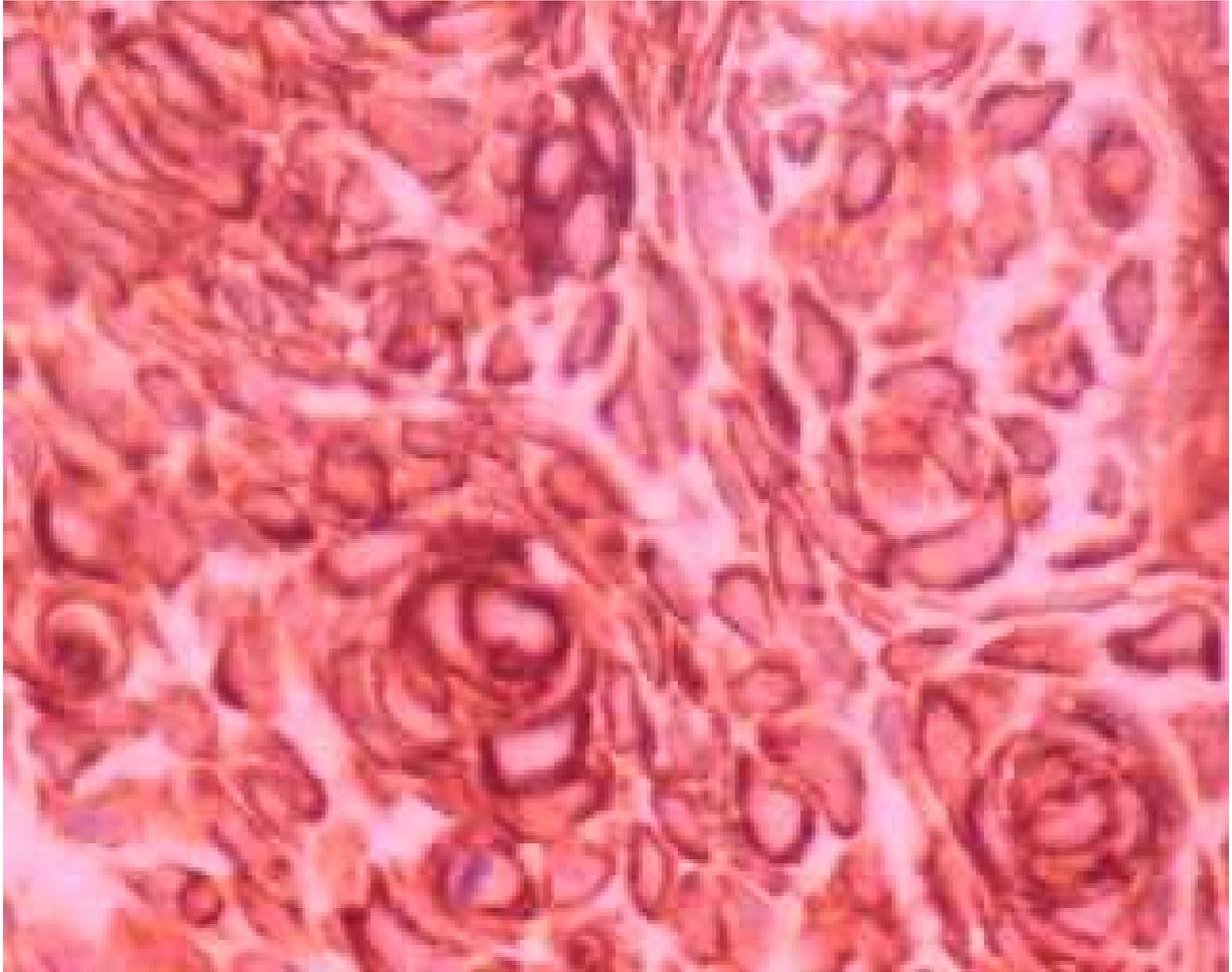


Figura 3. Foto da expressão positiva forte da K17 em aumento de 400x em carcinoma epidermóide representado no TMA.

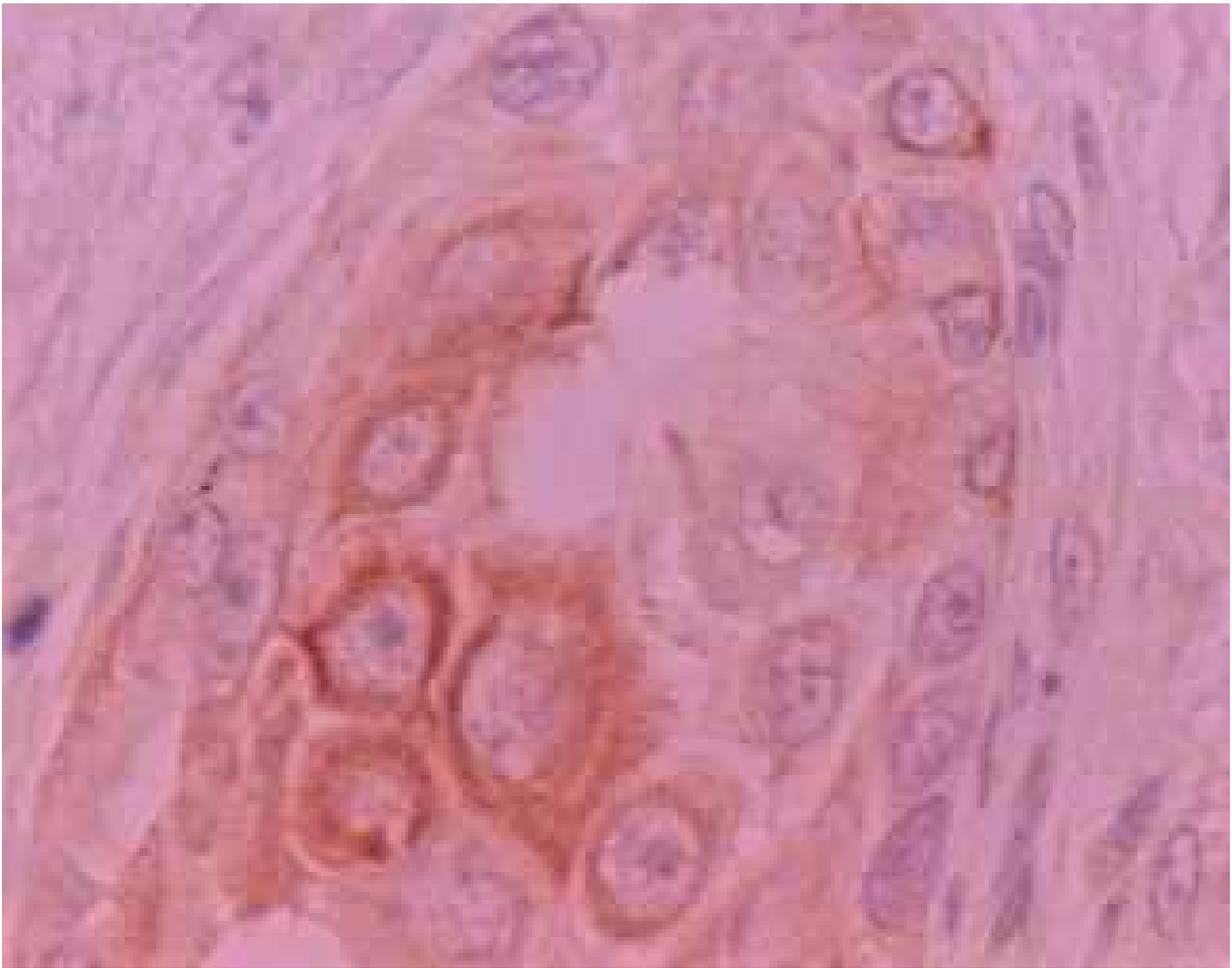


Figura 4. Foto da expressão positiva fraca da K17 em aumento de 400x em carcinoma epidermóide representado no TMA.

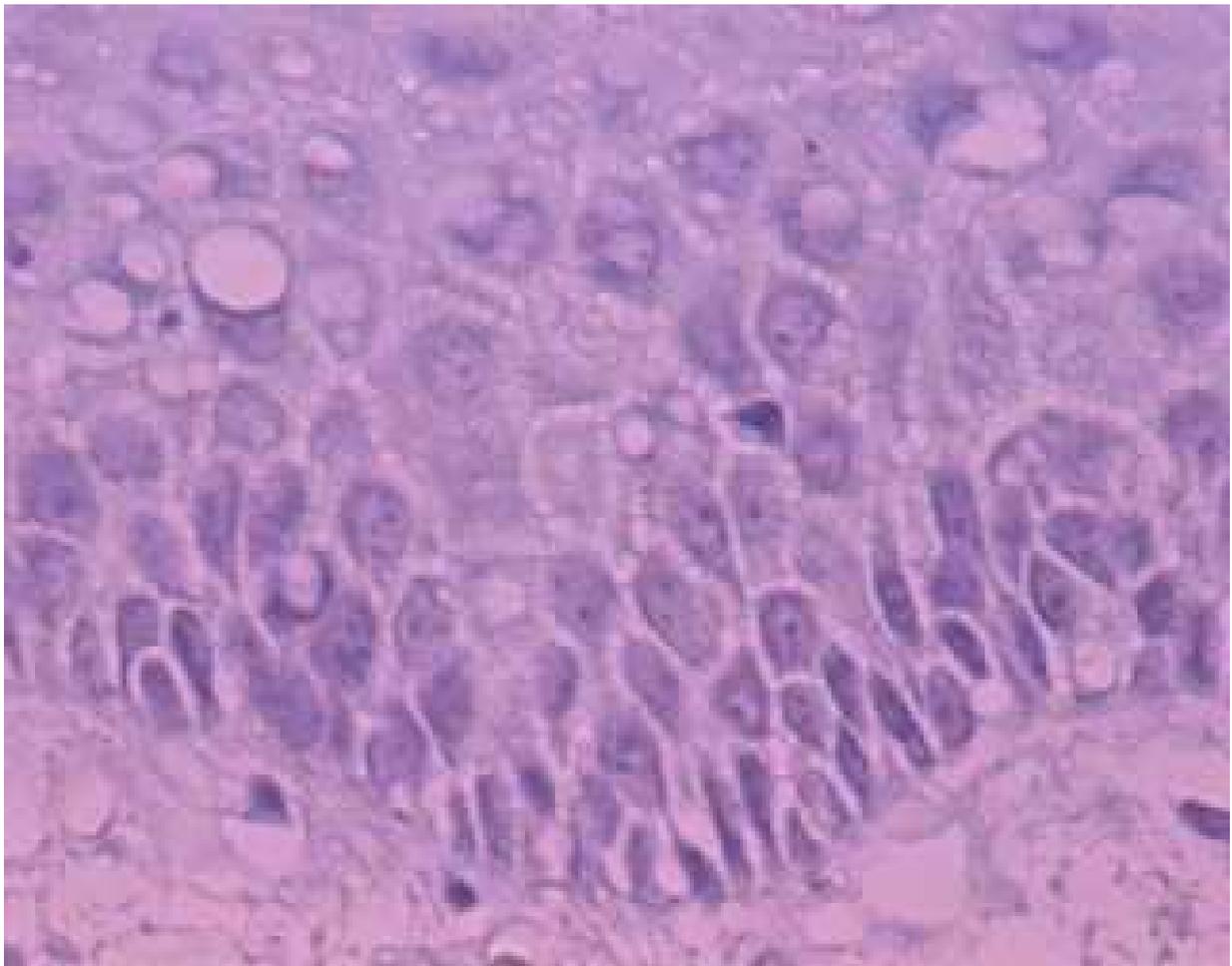


Figura 5. Foto da expressão negativa da K17 no aumento de 400x em margem de carcinoma epidermóide

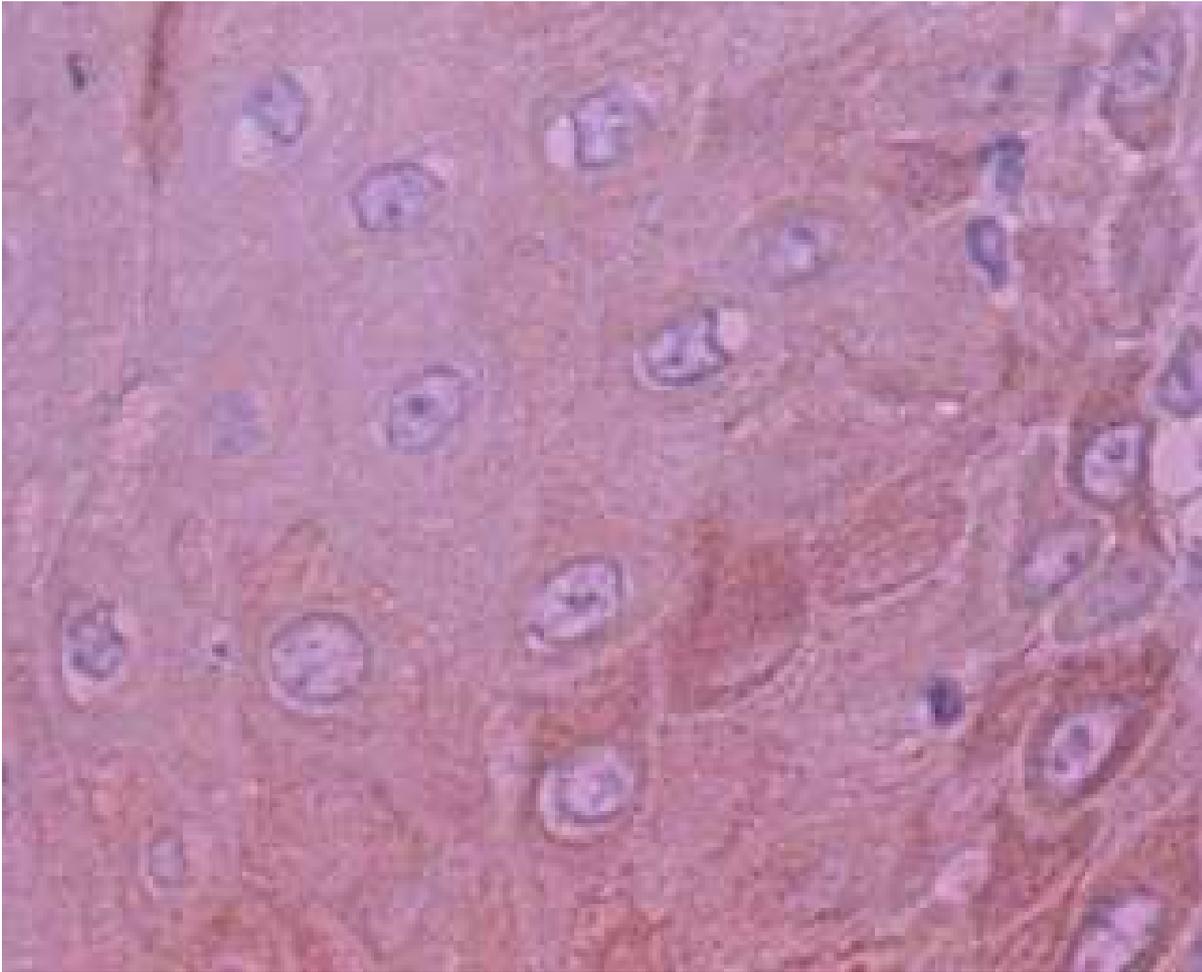


Figura 6. Foto da expressão positiva fraca da K17 no aumento de 400x em margem de carcinoma epidermóide.

A comparação da expressão da proteína K17 com os fatores histopatológicos mostrou que entre os 65 casos positivos, 43 (66,1%) correspondem a pacientes com linfonodos comprometidos pela neoplasia ($p=0,09$).

Dentre os casos com infiltração da neoplasia em vasos linfáticos (Figura 7) 48 (53,3%) apresentaram marcação positiva para a K17 ($p=0,043$). Já entre os casos com necrose peritumoral (Figura 8) a positividade ocorreu em 58 casos (65,1%; $p=0,004$). Os dados estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Relação entre infiltração de vasos linfáticos e necrose e a expressão da K17.

Características	K17 Positivo		K17 Negativo		<i>p value</i>
	n	%	n	%	
Infiltração linfática					
Ausente	17	18,8	12	13,3	0,043
Presente	48	53,3	13	14,4	
Não avaliável	0	0	0	0	
Necrose peritumoral					
Ausente	6	6,7	9	10,0	0,004
Presente	58	64,4	16	17,7	
Não avaliável	1	1,1	0	0	

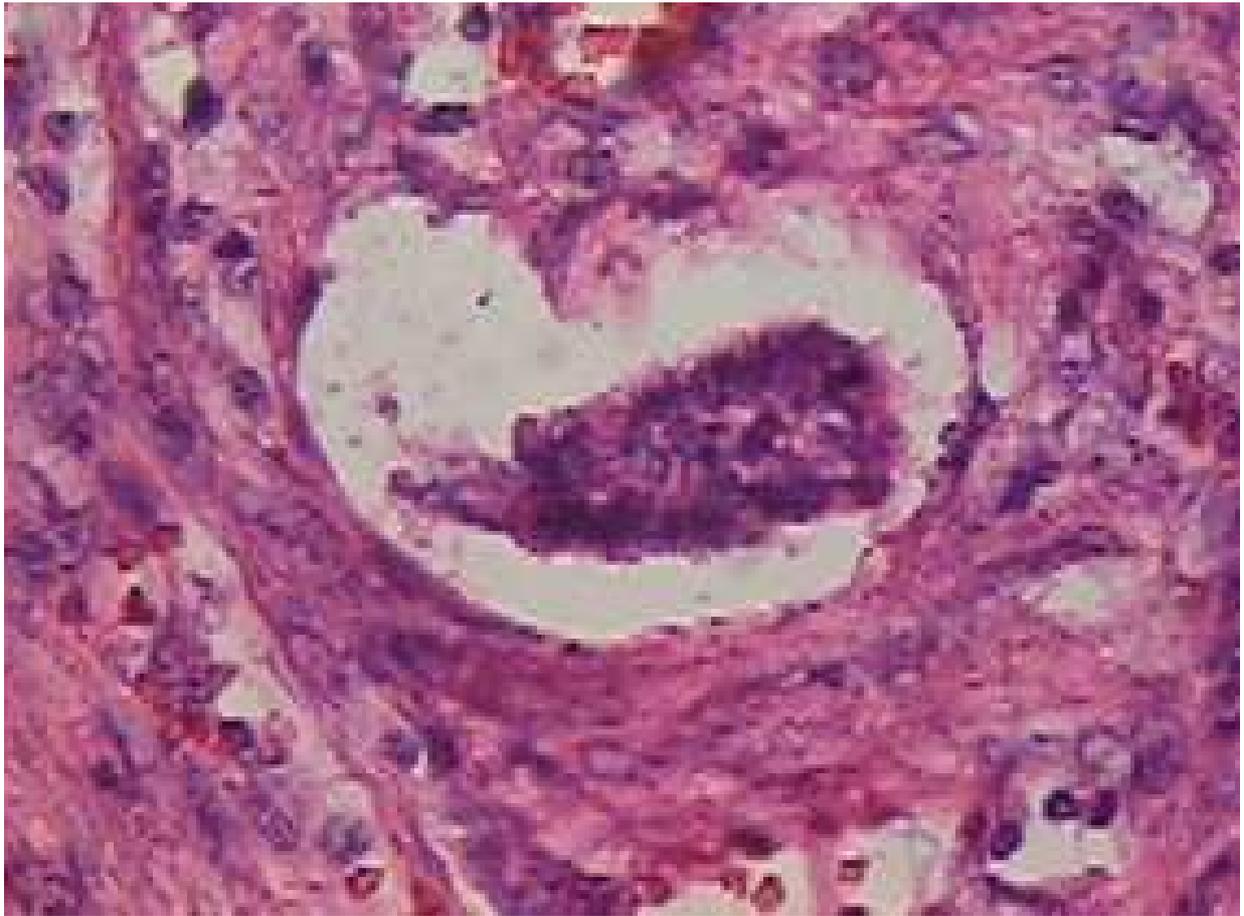


Figura 7. Foto de lâmina corada em H.E. demonstrando infiltração vascular linfática em carcinoma epidermóide - 400x.

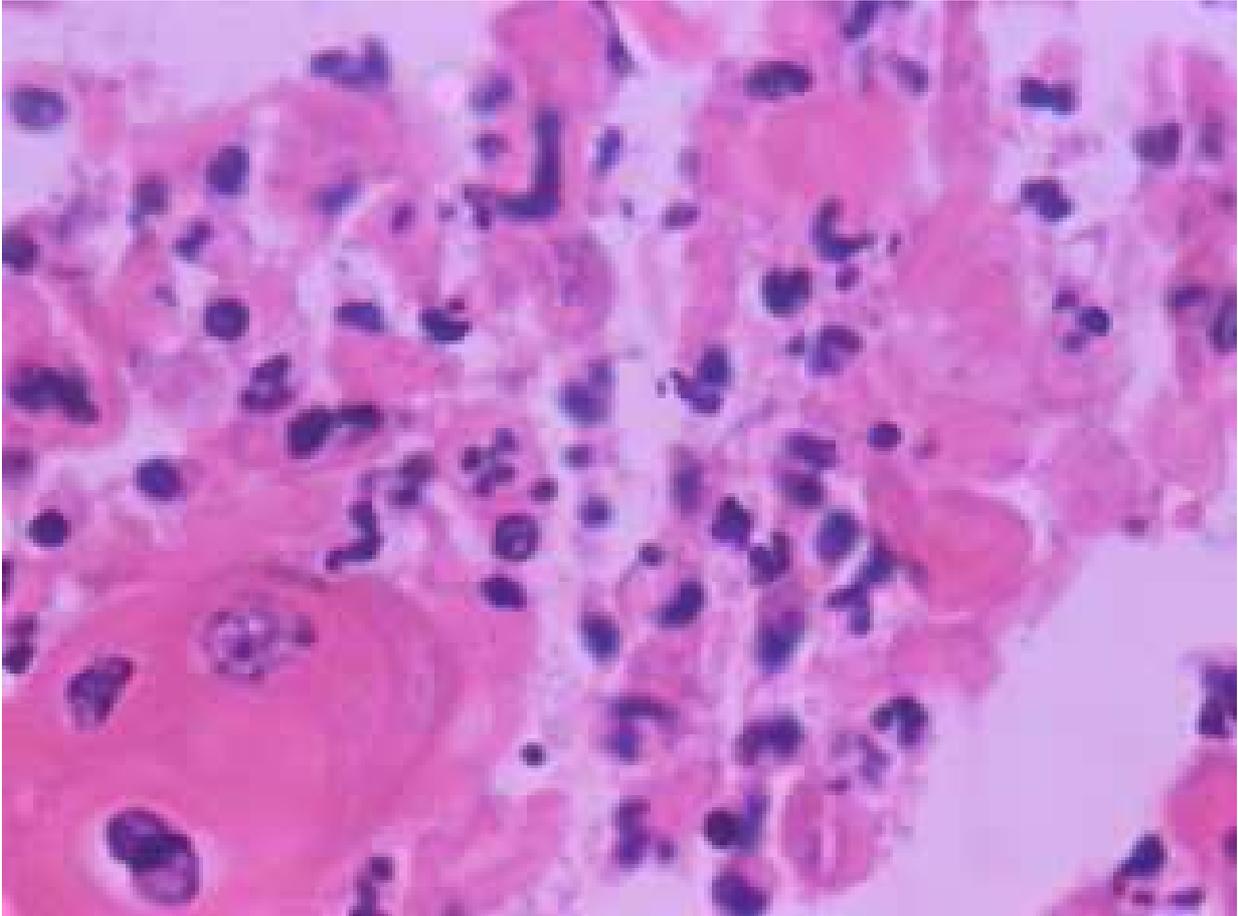


Figura 8. Foto de lâmina corada em H.E. demonstrando necrose tumoral em carcinoma epidermóide no aumento de 400x.

Não houve relação estatística entre a positividade para a K17 e o estadiamento patológico, diferenciação histológica do tumor, infiltração vascular sanguínea, invasão perineural, intensidade do infiltrado inflamatório e a intensidade de desmoplasia (Tabela 3).

Tabela 3. Relação entre as características do tumor e a marcação para K17

Características	K17 Positivo		K17 Negativo		<i>p value</i>
	n	%	n	%	
Tumor					
T1	2	3,1	3	3,3	0,274
T2	22	24,3	10	11,0	
T3	16	17,7	6	6,5	
T4	25	27,6	6	6,5	
Diferenciação					
Pouco	4	4,5	4	4,5	0,254
Moderadamente	32	35,6	9	10,0	
Bem diferenciado	28	31,0	12	13,3	
Não avaliável	1	1,1	0	0	
Infiltração sanguínea					
Ausente	60	66,6	23	25,5	0,542
Presente	4	4,5	2	2,3	
Não avaliável	1	1,1	0	0	
Invasão perineural					
Ausente	32	35,6	13	14,5	0,526
Presente	32	35,6	12	13,3	
Não avaliável	1	1,1	0	0	
Infiltrado inflamatório					
Ausente escasso	27	30,0	8	8,9	0,261
Moderado intenso	37	41,1	17	18,9	
Não avaliável	1	1,1	0	0	
Desmoplasia					
1	29	32,3	13	14,5	0,564
2	21	23,3	9	10,0	
3	14	15,5	3	3,3	
Não avaliável	1	1,1	0	0	

Dos 90 casos avaliados ocorreu expressão positiva para a K 19 em 12 (13,3%), destes, 8 (8,9%) foi positiva forte e 4 (33,3%) positiva fraca (Figuras 9 e 10). Com relação à margem cirúrgica de segurança não ocorreu expressão em 79 (96,3%) casos ($p=0,021$) (Figura 11). Três casos (3,5%) expressaram a K19 (Figura 12), sendo que em uma a positividade foi fraca e em duas forte. Dados representados na Tabela 4.

Tabela 4. Relação entre a expressão imuno-histoquímica da K19 no tumor e na margem cirúrgica de segurança.

K19	Tumor		Margem		<i>p value</i>
	N	%	n	%	
Positiva forte	8	8,9%	2	2,5%	0,736
Positiva fraca	4	4,4%	1	1,2%	
Negativa	78	86,7%	79	96,3%	0,021
Total	90	100%	82	100%	

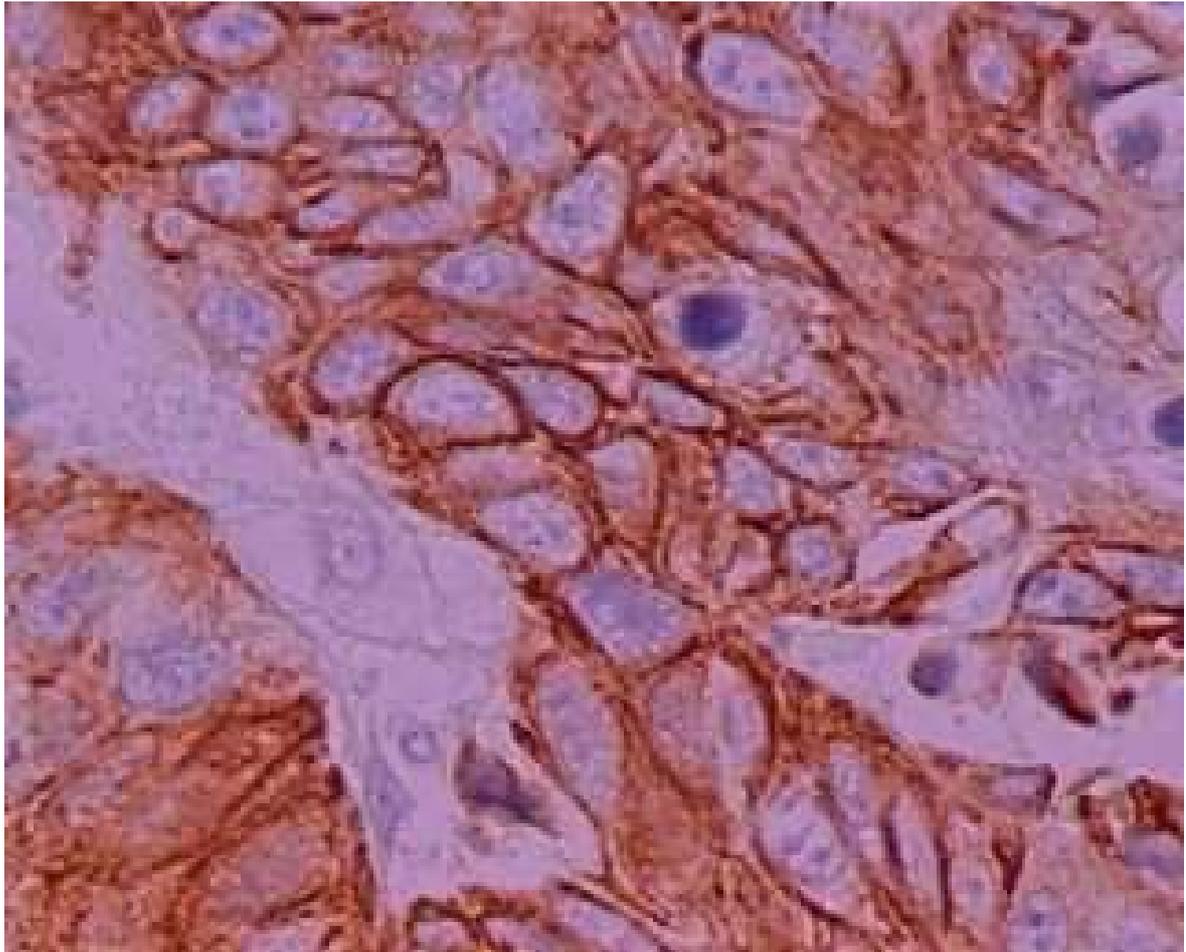


Figura 9. Foto da expressão positiva forte da K19 em carcinoma epidermóide representado no TMA - 400x.

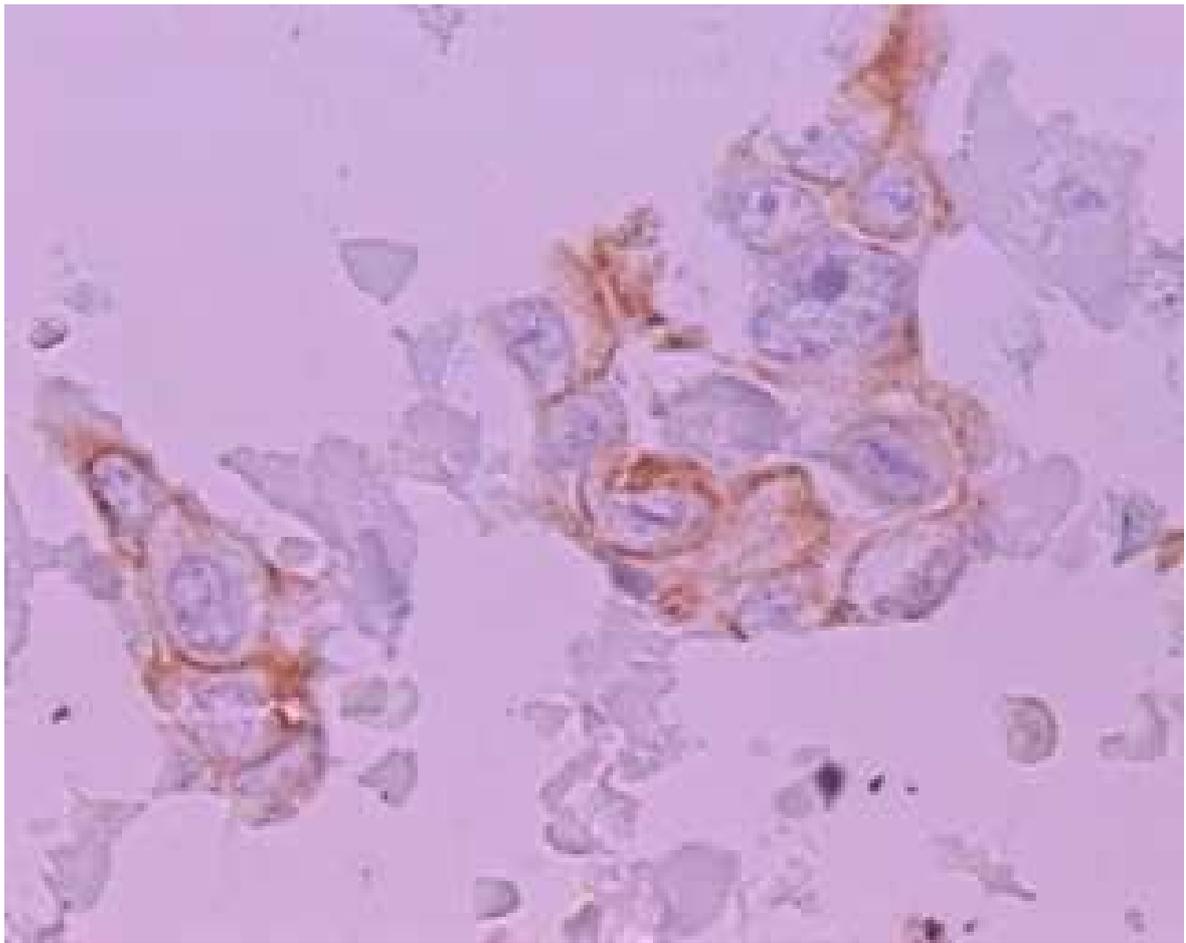


Figura 10. Foto da expressão positiva fraca da K19 em carcinoma epidermóide representado no TMA – 400x.

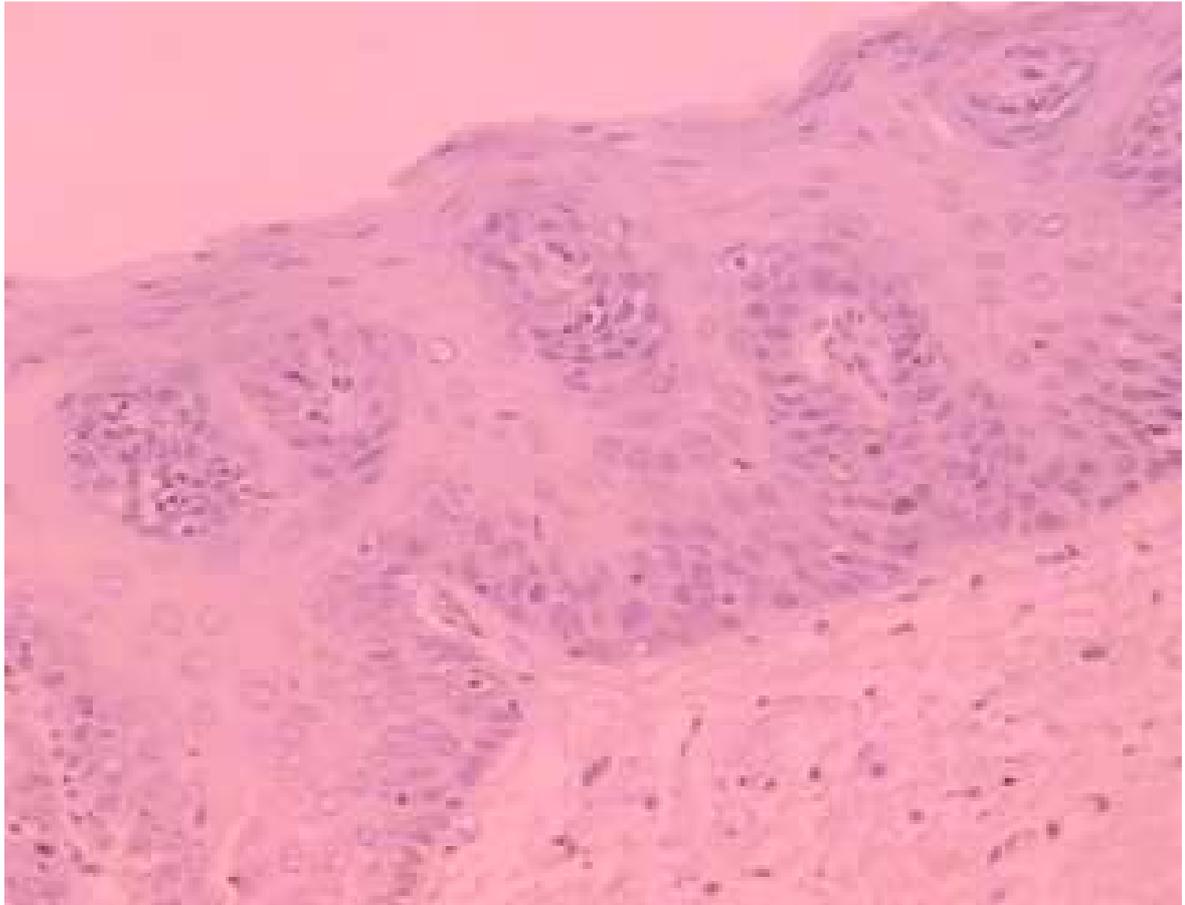


Figura 11. Foto da expressão negativa da K19 em margem de carcinoma epidermóide – 400x.

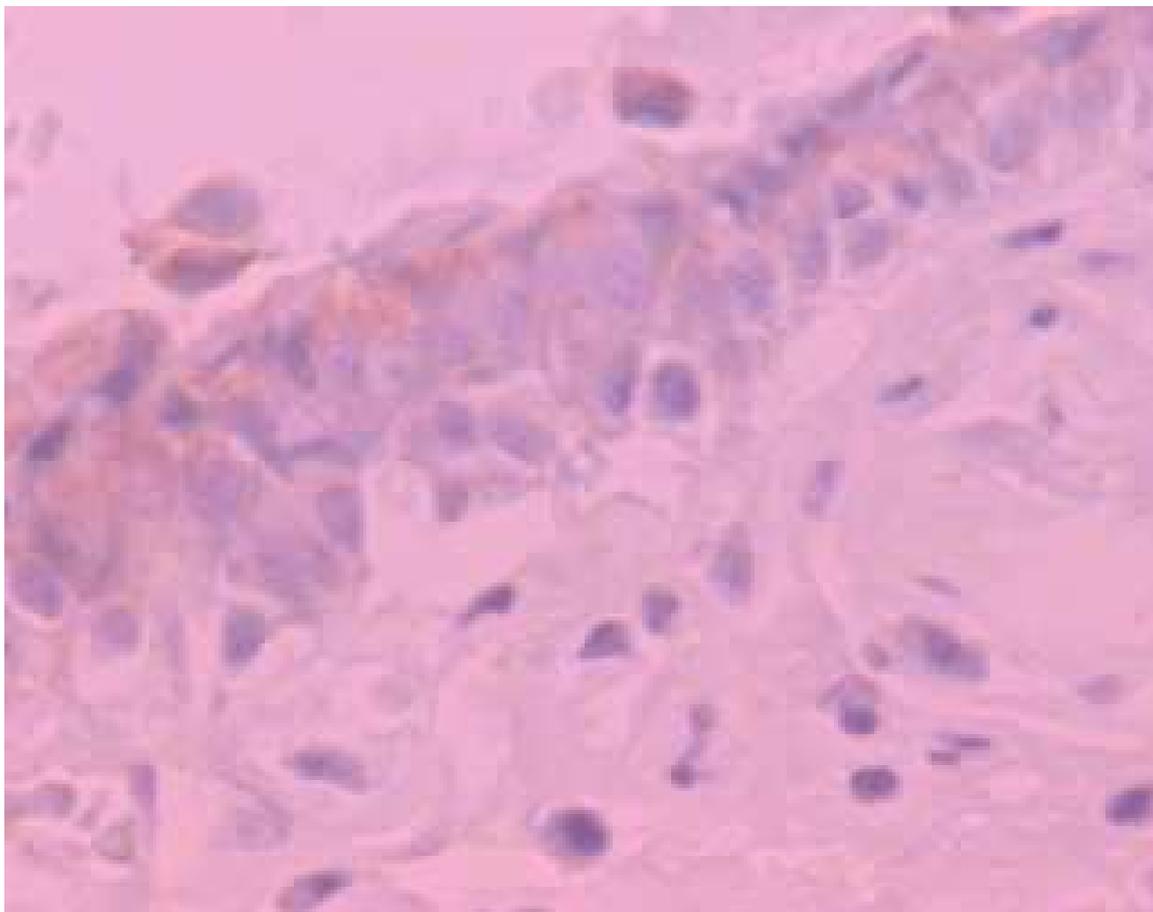


Figura 12. Foto da expressão positiva fraca da K19 em margem de carcinoma epidermóide – 400x.

Dos casos com presença de necrose 13,3% (12 casos) apresentaram marcação positiva para a K 19 ($p=0,092$). Não houve correlação estatística entre a positividade para a K 19 e o estadiamento patológico, linfonodos comprometidos, diferenciação histológica do tumor, infiltração vascular e linfática, invasão perineural e intensidade de desmoplasia (Tabela 5).

Tabela 5. Relação entre as características do tumor e a marcação para K19

Características	K19 Positivo		K19 Negativo		p value
	n	%	n	%	
Tumor					
T1	1	1,1	4	4,4	0,873
T2	5	5,5	27	30,0	
T3	3	3,3	19	21,1	
T4	3	3,3	28	31,1	
Linfonodos					
N(-)	5	5,5	30	33,3	0,534
N(+)	7	7,7	48	53,3	
Diferenciação					
Pouco	1	1,1	7	7,7	0,645
Moderadamente	7	7,7	34	37,7	
Bem diferenciado	4	4,4	36	40,0	
Não avaliável	0	0	1	1,1	
Infiltração sanguínea					
Ausente	12	13,3	71	78,8	0,408
Presente	0	0	6	6,6	
Não avaliável	0	0	1	1,1	
Infiltração linfática					
Ausente	2	2,2	27	30,0	0,184
Presente	10	11,1	51	56,6	
Não avaliável	0	0	0	0	
Invasão perineural					
Ausente	6	6,6	39	43,3	0,604
Presente	6	6,6	38	42,2	
Não avaliável	0	0	1	1,1	
Infiltrado inflamatório					
Ausente escasso	5	5,5	30	33,3	0,548
Moderado intenso	7	7,7	47	52,2	
Não avaliável	0	0	1	1,1	
Desmoplasia					
1	4	4,4	38	42,2	0,427
2	6	6,6	24	26,6	
3	2	2,2	15	16,6	
Não avaliável	0	0	1	1,1	
Necrose					
Ausente	0	0	15	16,6	0,092
Presente	12	13,3	62	68,8	
Não avaliável	0	0	1	1,1	

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foi realizada correlação da expressão imuno-histoquímica das queratinas 17 e 19 no carcinoma epidermóide de boca e orofaringe com as variáveis histológicas e clínicas. A literatura mostra que a transformação maligna é frequentemente associada a alterações na expressão dos filamentos normais das células, porém não foram encontrados na literatura muitos estudos relacionando as queratinas 17 e 19 com o CEC de cavidade oral e orofaringe. Diversos trabalhos referem estas queratinas em outros sítios e outros tipos histológicos de tumores como, por exemplo, a queratina 17 foi estudada em neoplasia intraepitelial cervical e CEC de colo uterino, CEC de laringe, tumores ovarianos e carcinoma mamário; já a queratina 19 foi utilizada em estudos de neoplasia epitelial tireoideana, carcinoma gástrico, CEC de pele, adenocarcinoma de colon, entre outros (HAMADA et al, 2008, IKEDA et al, 2008; REGAUER e REICH, 2008; PASCHOAL et al, 2007; SUO et al, 2006; ROSA et al, 2005; COHEN-KEREM et al, 2004; VAN DE RIJN et al, 2002).

Neste estudo, dos 90 casos avaliados a maioria (72,2%) era positiva para a K17 e dos positivos 48,9% tinham marcação forte. Quando comparamos a marcação positiva para a K17 no tecido neoplásico e na margem cirúrgica, encontramos correlação estatística ($p=0,005$), da mesma forma comparando a não marcação para a K17 entre o tumor e a margem, também encontramos correlação estatística ($p=0,000$), como observado na tabela 1. A presença desta proteína foi demonstrada por Moll et al em 1982, pelo método em gel de eletroforese, estando a proteína presente em carcinomas epidermóides, assim como em tecido glandular normal, mas aparentemente ausente em epitélio escamoso estratificado não queratinizado. No trabalho de Toyoshima et al, 2008, foram analisadas 10 amostras de carcinoma epidermóide da cavidade oral e 5 amostras de mucosa normal, avaliando a expressão de 31 keratinas. Entre todas as queratinas, a K17 foi a que mostrou maior correlação com a neoplasia, quando

comparada com a mucosa normal. Além disso, a hiper-expressão foi significativamente associada com o diagnóstico de carcinoma ($p=0,002$). Somando os dados encontrados no presente estudo com os da literatura pode-se sugerir que a K17 pode ser um potencial marcador diagnóstico de lesão precoce.

Quando relacionada a infiltração em vasos linfáticos com a marcação positiva para a K17, observamos correlação estatística, sendo que em 53,3% deste casos a K17 era positiva ($p=0,043$), fato este não demonstrado pela literatura.

No estudo de Toyoshima et al (2008), a forte expressão da K17 foi significativamente associada com metástases em linfonodos cervicais ($p<0,05$). Em nosso estudo, apesar de não encontrarmos relação estatisticamente significativa, pudemos verificar que em 66,1% dos casos com linfonodos cervicais comprometidos, a K17 tinha marcação positiva ($p=0,09$). O fato de não ter comprovação estatística significativa pode ser explicado pelo pequeno tamanho da amostra, porém deve ser levado em consideração, pois a presença de metástase em linfonodos é o fator prognóstico mais importante para a sobrevida do paciente (HASHIMOTO et al, 2005).

A necrose tumoral está relacionada com o rápido crescimento de um tumor maligno, isto é diretamente ligado a um pior prognóstico (LEEK et al, 1999). Neste trabalho houve significativa correlação entre a positividade da K17 com necrose peritumoral ($p=0,004$).

Não houve relação estatística significativa entre a positividade para a K17 e o estadiamento patológico e diferenciação histológica. Este achado também foi semelhante no trabalho de Yoshida (2007), onde foram analisadas 134 amostras de carcinoma epidermóide, não se encontrando correlação entre os graus histológicos do tumor e a expressão da K17. Não houve correlação com infiltração vascular sanguínea, invasão perineural, intensidade do infiltrado inflamatório e desmoplasia.

A avaliação mostrou diferentes resultados quando comparados o tumor e a margem com a positividade para a K19, sendo que dos 90 casos somente 13,3% foram positivos no tumor. Na margem cirúrgica a maioria dos casos (92,9%) não expressou a K19. Dados diferentes foram observados por Silveira et al em 2007, onde a K19 teve imunomarcagem no epitélio adjacente ao tumor, em 18 dos 30 casos estudados. Uma avaliação da K19 em epitélio escamoso saudável mostrou positividade na camada basal (FILLIES et al, 2006).

No caso da necrose peritumoral a marcação para a K19 também foi bem diferente da K17, sendo que somente 12 casos (16,2%) com necrose apresentaram marcação positiva para a K19, não sendo encontrados relatos na literatura sobre este fato.

Não foi encontrada correlação estatística entre a marcação para a K19 e a presença de metástases em linfonodos. Na literatura só há relatos em outros sítios e em outros tipos histológicos de neoplasia como, por exemplo, o adenocarcinoma, demonstrado em 2006 por Suo et al, onde a K19 foi sensível e específica para o diagnóstico de micrometástases em linfonodos regionais de carcinomas gástricos.

Não houve correlação estatística entre a K19 e o estadiamento patológico, diferenciação histológica, infiltração vascular sanguínea e linfática, invasão perineural, intensidade do infiltrado inflamatório e desmoplasia (Tabela 5). Da mesma forma Silveira et al (2007) em seu estudo, também não observaram correlação estatística significativa entre a expressão da K19 e o grau histológico e parâmetros clínicos.

Dessa forma podemos observar que tanto a presença da K17 como a ausência da K19 tem relação com o carcinoma epidermóide de boca e orofaringe e podem ser utilizados em estudos futuros para um melhor entendimento destes tumores. Devido à relação encontrada entre a expressão positiva da K17 e a infiltração da neoplasia em vasos linfáticos e a necrose peritumoral, podemos sugerir que a presença desta proteína em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço está relacionada a um pior prognóstico, por se tratarem de

tumores mais agressivos. A K17 juntamente com outros marcadores poderia compor um painel imuno-histoquímico para avaliação de prognóstico de pacientes com CEC de boca e orofaringe.

A maioria das margens cirúrgicas não expressou a K17, diferentemente do tecido tumoral, por este motivo podemos sugerir sua utilização na prática diária, quando da avaliação histopatológica de margens cirúrgicas, principalmente nos casos duvidosos.

A realização de outras pesquisas relacionadas às queratinas poderá mostrar mais claramente, qual a relação entre a presença dessas proteínas e o comportamento tumoral.

7. CONCLUSÕES

De acordo com nossos resultados chegamos às seguintes conclusões:

1 – A expressão da K17 foi mais frequente do que a K19 nos tumores e ambas não estiveram presentes de forma significativa nas margens, sugerindo a participação destas proteínas na carcinogênese do carcinoma epidermóide de boca e orofaringe.

2a – Não houve relação das K17 e K19 com as variáveis clínicas, sugerindo que essas proteínas não poderiam servir como marcadores de prognóstico.

2b – Houve relação positiva entre a expressão da K17 com a agressividade tumoral.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amar A, Rapoport A, Carvalho MB. Valor prognóstico da espessura tumoral no carcinoma epidermóide de boca e orofaringe. Rev Col Bras Cir 2002; 29 (3):127-30.

Almeida Jr HL. Citoqueratinas. Anais Bras Dermatol 2004; 79(2):135-45.

Araújo Jr RF, Costa ALL, Ramos CF. Parâmetros clínicos patológicos como indicadores de prognóstico em carcinoma epidermóide oral. Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada. 2006; 6(2):125-30.

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.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2007. www.inca.gov.br

Ceratto N, Dobkin C, Carter M, Jenkins E, Yao XL, Cassiman JJ, Aly MS, Bosco P, Leube R, Langbein L, Feo S, Romano V. Human type I cytokeratin genes are a compact cluster. Cytogenet Cell Genet 1997; 77(4):169-74.

Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. J Dent Res 2008; 87(1):14-32.

Cohen-Kerem R, Madah W, Sabo E, Rehat MA, Geenberg E, Elmalah I. Cytokeratin 17 as a potential marker for squamous cell carcinoma of the larynx. Ann Otol Rinol Laryngol 2004; 113(10):821-7.

Coulombe PA, Ma L, Yamada S, Wawersik M. Intermediate filaments at a glance. *J Cell Science* 2001; 114(24):4345-7.

Crowe DL, Milo GE, Shuler CF. Keratin 19 down regulation by oral squamous cell carcinoma lines increases invasive potential. *J Dental Res* 1999; 78:1256-63.

Dantas DDL, Ramos CCF, Costa ALL, Souza LB, Pinto LP. Clinical-pathological parameters in squamous cell carcinoma of the tongue. *Braz Dent J* 2003; 14(1):22-5.

Epstein JB, Gorsky M, Cabay RJ, Day T, Gonsalves W. Screening for and diagnosis of oral premalignant lesions and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Can Fam Physician* 2008; 54(6):870-5.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5):759-67.

Fillies T, Werkmeister R, Packeisen J, Brandt B, Morin P, Weingart D, Joos U, Buerg H. Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *BMC Cancer* 2006; 6:10.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidranski D. Head & Neck Cancer. *New Engl J Med* 2001; 345(26):1890-990.

Freeman HP. Poverty, culture, and social injustice: determinants of cancer disparities. *CA Cancer J Clin* 2004; 54(2):72-7.

Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science* 1998; 279(5350):514-9.

Fudge D, Russel D, Beriault D, Moore W, Brigitte L, Vogl AW. The intermediate filaments network in culture human keratinocytes is remarkably extensible and resilient. *Plos One* 2008; 36(6):23-27

Gillison ML. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck* 2007; 29(8) 779-92.

Gleich LL, Salamone FN. Molecular genetics of head and neck cancer. *Cancer Control* 2002; 9(5):369-78.

Ha PK, Califano JA. The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14(5):363-9.

Hamada T, Kiyokawa T, Nomura K, Hano H. Immunohistochemical analysis of reserve cell-like cells of ovarian müllerian mucinous/mixed epithelial borderline tumor. *Int J Gynecol Pathol* 2008; 27(2):199-206.

Hashimoto Y, Ito T, Inoue H, Okumura T, Tanaka E, Tsunoda S, Higasiyama M, Watanabe G, Imamura M, Shimada Y. Prognostic significance of overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005; 11(7):2597-605.

Hedvat CV, Hedge A, Chaganti RS, Chen B, Qin J, Filippa DA, Nimer SD, Teruya-Feldstein J. Application of tissue microarray technology to the mstudy of non-Hodgkin's and Hodgkin's lymphoma. *Hum Pathol* 2002; 33(10):968-74.

Ikeda K, Tate G, Susuki T, Mitsuya T. Coordinate expression of cytoqueratin 8 and cytoqueratin 17 immunohistochemical staining in cervical intraepithelial neoplasia an cervical squamous cell carcinoma: an immunohistochemical analysis and review of the literature. *Gynecol Oncol* 2008; 108(3): 598-602.

Lalli A, Tilakaratne WM, Ariyawardana A, Fitchett C, Leigh IM, Hagi-Pavli E, Cruchley AT, Parkinson EK, The MT, Fortune F, Waseem A. An altered keratinocyte phenotype in oral submucous fibrosis: correlation of keratin K17 expression with disease severity. *J Oral Pathol Med* 2008; 37(4):211-20.

Leek RD, Landers RJ, Harris AL, Lewis CE. Necrosis correlates with high vascular density and focal macrophage infiltration in invasive carcinoma of the breast. *Br J Cancer* 1999; 79(5):991-5.

Liu L, Kumar SK, Sedghizadeh PP, Jayakar AN, Shuler CF. Oral squamous cell carcinoma incidence by subsite among diverse racial and ethnic populations in California. *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 105(4):470-80.

Moll R, Franke WW, Schiller DL. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 1982; 31:11-24.

Moll R, Divo M, Langbein L. The human keratins: biology and pathology. *Histochem Cell Biol* 2008; 129(6):705-33.

Myers EN, Fagan JJ. Treatment of the N+ neck in squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. *Otolaryngol Clin North Am* 1998; 31(4):671-86.

Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52:195-215.

Ojopi EPB, Neto ED. Genes e Câncer, alguns eventos moleculares envolvidos na formação de um tumor. *Biotechnol Desenvolv* 2002; 27:28-38.

Paschoal J, Carolli-Bottino A, Ribeiro JF, Pannain VL. Metástase Hepática de adenocarcinoma colorretal com disseminação endobiliar: expressão das citoqueratinas 7, 19 e 20. *J Bras Patol Med Lab* 2007; 43(1):51-4.

Pradal M, Menezes AM, Di Dio R, Barbério JC. Marcadores tumorais. Breve revisão. Parte II. *Rev Soc Bras Cancerol*. 1999. 5:20-30.

Ram Prasad VV, Nirmala NR, Kotian MS. Immunohistochemical evaluation of expression cytokeratin 19 in different histological grades of leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *J Dent Res* 2005; 16(1):6-11.

Raybaud H, Odin G, Fafet A, Santini J, Monteil RA. Anomalies géniques dans les carcinomas épidermoïdes des vois aérodigestives supérieures: analyse de la littérature internationale. *Pathol Biol* 2003; 51:176-84.

Regauer S, Reich O. CK 17 and p16 expression patterns distinguish (atypical) immature squamous metaplasia from high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN III). *Histopathology* 2007; 52(4):629-35.

Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14(1):47-62.

Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J* 2001;7(1):24-31.

Rosa MP, Kanamura CT, Carvalho MB. Expressão da galectina-3 e citoqueratina 19 nas neoplasias epiteliais da glândula tireóidea e correlação histopatológica. *Bras Patol Med Lab* 2005; 41(1):61-70.

Scully C, Burkhardt A. Tissue markers of potentially malignant human oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med* 1993; 22(6):246-56.

Silveira AJD, Godoy GP, Lins RDAU, Arruda MLS, Ramos CCF, Freitas RA, Queiroz LMG. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Internat J Surg Pathol* 2007; 15(4):376-83.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* 1953; 5:963-8.

Soini Y, Kahlos K, Punhkka A, Lakari E, Saily M, Paakko P, Kinnula V. Expression of inducible nitric oxide synthase in healthy pleura and in malignant mesothelioma. *Brit J Cancer* 2000; 83(7):880-6.

Suo J, Wang Q, Jin HJ, Li H, Zhao H. K19 mRNA RT-PCR in detecting micrometastasis in regional lymph nodes of gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12(32):5219-22.

Toyoshima T, Vairaktaris E, Nkenke E, Schlegel KA, Neukam FW, Ries J. Cytoqueratin 17 mRNA expression has potential for diagnostic marker of oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008; 134(4):515-21.

Troyanovsky SM, Leube RE, Franke WW. Characterization of the human gene encoding cytokeratin 17 and its expression pattern. *Eur J Cell Biol* 1992; 59(1):127-37.

Uppaluri R, Dunn GP, Lewis JS Jr. Focus on TILs: Prognostic significance of tumor infiltrating lymphocytes in head and neck cancers. *Cancer Immunity* 2008; 8:16-26.

Van de Rijn M, Perón CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Komonen H, Torhorst J, Sauter G, Zuber M, Kochli OR, Mross F, Dieterich H, Seitz R, Ross Doug, Botstein D, Brown P. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol* 2002; 161:1991-6.

Venturi BRM, Pamplona ACF, Cardoso, AS. Carcinoma de células escamosas da cavidade oral em pacientes jovens e sua crescente incidência: revisão de literatura. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2004; 5(70):679-86.

Ward E, Jemal A, Cokkinides V, Singh GK, Cardinez C, Ghafoor A et al. Cancer disparities by race/ethnicity and socioeconomic status. *CA Cancer J Clin* 2004; 54(2):78-93.

Wittekind C, Sobin LH: TNM Classificação dos tumores malignos. Instituto Nacional do Câncer – INCA. 5ª edição. 1998; 19-26.

Yoshida Y. Effective biological marker to detect oral squamous cancer cells – expression patterns of CK 10, 17, 19 and SCCA mRNA. *J Stomatol Soc, Japan* 2007; 73(3):37-42.

Zhen W, Karnell LH, Hoffman HT, Funk GF, Buatti JM, Menck HR. The National Cancer Data Base report on squamous cell carcinoma of the base of tongue. *Head Neck* 2004; 26(8):660-74.

FONTES CONSULTADAS

<http://www.cancer.gov>

<http://www.inca.gov.br>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

<http://www.robbinspathology.com>

ANEXOS

Anexo I



**UNIDADE DE GESTÃO ASSISTENCIAL – HOSPITAL HELIOPÓLIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

São Paulo, 18 de julho de 2008.

A Prezada

Dra. Berenice Di Angelis Coelho

APROVAÇÃO

Referente: “**Avaliação da expressão dos genes NDRG1, Citoqueratinas 19,17 e 4 LEPR e DAPI em pacientes com carcinoma epidermóide de vias aerodigestivas superiores e relação com a agressividade tumoral**”.

Registro CEP: 446

Tendo como investigadora principal a Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva, conforme segue:

O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis avaliou e aprovou em 14/12/2007 após a análise do relator Dr. Odilon Victor Porto Demardin, todas as questões apontadas pelo mesmo onde o novo título do protocolo é o citado acima.

OBS: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis segue a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP), bem como a Resolução 196/96 CNS/MS e as demais resoluções e legislações vigentes e pertinentes a Pesquisa Clínica em nosso país.

Estamos a disposição para quaisquer esclarecimentos.

Atenciosamente


Dr. Jozias de Andrade Sobrinho
COORDENADOR CEP

Rua Cônego Xavier, 276 – Sacomã – São Paulo – PS-Externo – CEP 04231-030.
Fone: 2215-1001 / 2274-7600 ramal 105 / Fax: 6162-6764
E-mail: cep_heliopolis@yahoo.com.br

Anexo II

Protocolo para reação imuno-histoquímica

A - Desparafinização em xilol frio três banhos de 5 minutos.

B – Hidratação dos cortes em: etanol absoluto; etanol a 95%; etanol a 80% (5x cada); lavagens em água corrente e destilada.

C – Recuperação antigênica: Fervura em panela a vapor com solução de ácido cítrico 10 mM/pH 6.0 por 40 minutos a 90°C. Aguardar 20 minutos para baixar a temperatura.

D – Bloqueio da peroxidase endógena: Peróxido de Hidrogênio a 3% em três banhos de 5 minutos cada. Lavagem em água destilada e 2 banhos de 5 minutos no Tampão Tris (hidroximetil) aminometano.

E – Incubação com anticorpo primário (específico para o antígeno), diluído em tampão Tris contendo solução de albumina bovina BSA a 1% e azida sódica a 0,1%, em câmara úmida, 18 horas (over-night) a 4°C. Lavagens em tampão Tris (dois banhos de 5 minutos).

F – Incubação com reagente secundário biotilado em câmara úmida: 30 minutos em temperatura ambiente. Lavagens em tampão Tris (2x).

G – Incubação com Estreptoavidina- HRP, em câmara úmida: 30 minutos a temperatura ambiente. Lavagens em tampão Tris (2x).

H – Revelação com substrato cromogênico (DAB® substrate buffer) 2 minutos a temperatura ambiente. Lavagens em água corrente e destilada.

I – Contracoloração (leve) com Hematoxilina de Harrys. Lavagens em água corrente e destilada.

- Solução saturada de Carbonato de Lítio (3x). Lavagens em água corrente

K – Desidratação dos cortes em: etanol a 50%; etanol a 80%; etanol a 95%; etanol absoluto (3X); xilol (3X) e montagem em meio permanente (Entellan®).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)