SÉRGIO ELIAS VIEIRA CURY

**EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS CITOQUERATINAS
7 E 8 EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES
DE ASSOALHO BUCAL**

São Paulo
2008

Sérgio Elias Vieira Cury

**Expressão imunoistoquímica das citoqueratinas 7 e 8 em
Carcinomas epidermóides de assoalho bucal**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade de São Paulo, para obter o
título de Doutor pelo Programa de Pós-
Graduação em Odontologia.

Área de concentração Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr.

São Paulo
2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cury SEV. Expressão imunoistoquímica das citoqueratinas 7 e 8 em carcinomas epidermóides de assoalho bucal [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo, / /2008

Banca Examinadora

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A você Dorotéia, minha esposa meu amor, com admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença, e incansável apoio ao longo do período de ausência em nosso lar, dedico não só este trabalho, mas toda a minha vida.

Aos meus filhos Sérgio e Raphael, com amor, orgulho e carinho. Nada aconteceria se não fosse por vocês, razão do meu viver.

Ao amigo e irmão Décio e sua família (Marister, Gabriel e Bruna) pelo carinho e amizade demonstrada. Vocês fizeram com que os dias longe da minha família fossem mais amenos.

Aos amigos e irmãos Helder e Flávia por toda ajuda, não só nesse trabalho, mas em todo o curso. Pelo carinho, amizade e convívio no dia a dia em São Paulo. Somos hoje, juntamente com a família Décio, uma única e nova grande família.

À amiga e irmã Loreley pelo grande incentivo e por ter sido o início da minha luz na Patologia.

Aos meus pais José e Eth, pela educação e pelos esforços para a minha formação.

A minha querida irmã Zuzeth, responsável pela minha carreira na Odontologia.
Sei que mesmo não estando mais conosco, jamais deixou de me acompanhar.

Às minhas irmãs Lucia Helena, Maria Cacilda, Ana Amélia, Márcia Lygia, Izabel
Christina e Sônia Regina, pelo incentivo e pela torcida. Amo todas vocês.

A Deus por ter me proporcionado a vida, os amores e os amigos que dela
fazem parte.

A Nossa Senhora Aparecida, que durante as minhas viagens, sempre me
acompanhou de volta ao meu lar e aos braços da minha família.

Aos brasileiros portadores de câncer, que mesmo diante do sofrimento
causado pela doença, ainda encontram forças para manter um espírito capaz
de expressar felicidade.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Jr, que com sabedoria soube orientar-me não só para conclusão desse trabalho, mas durante todos os meus dias como aluno, não medindo esforços para compartilhar seus conhecimentos, acompanhando de perto toda nossa evolução como patologista.

Aos amigos Hélder e Érika por toda ajuda durante as reações imunoistoquímicas.

À Yonara pela ajuda na formatação das imagens.

Ao amigo Marcos Squadrans por todo apoio, logística e amizade.

Ao amigo e irmão Brunno, companheiro de todos os dias na USP.

Ao amigo Roberto, pela amizade e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Fábio Daumas pela amizade, companheirismo e ensinamentos.

À Professora Suzana Orsini pela compreensão diante de nossas dificuldades, pela confiança depositada, pelo conhecimento científico compartilhado, e, principalmente, pela doçura que sempre pautou sua conduta como chefe da disciplina. Serei eternamente grato.

Às Professoras Marina, Marília, Andréa e Karen pelo convívio, amizade e aprendizado.

Aos Professores do UniFOA Loreley Luderer e Marcus Vinícius Carvalho, pela paciência e colaboração durante minha ausência.

Aos Dirigentes da FOA - UniFOA, passados e atuais: Prof. Sérgio Lobo e Prof^a. Maria Isabel de Abreu na Odontologia; Prof^a Mirian na Nutrição; Prof. Dr. Jairo Jogaib e Prof. Jessé Cordeiro na Reitoria; Prof. Alexandre Habibe e Prof^a Cláudia Utgawa na Pró-Reitoria; e Sr. Dauro Aragão na Presidência; o meu muito obrigado por toda a colaboração durante minha ausência.

Ao amigo Augusto Bellini por apresentar-me ao Prof. Décio e ao Departamento de Patologia da USP, o primeiro passo para que esse sonho se realizasse.

Às amigas Camila Rodini, Márcia e Tatiana, pelo convívio, parceria, carinho e amizade.

Aos colegas Adriano, Alexander, Alexandra, Alexandre, Aluana, Ana Carolina, Arlindo, Brunno, Camila, Camila Rodini, Cristhiane, Cristiane Barbosa, Érika, Fabiana, Fábio Coracin, Fabrício Passador, Felipe Torquato, Fernanda, Fernanda Yamamoto, Filipe Modolo, Flávia Caló, Flávia Pontes, Fraige, Hélder, Juliana, Karen Renata, Katiuchia, Kivia, Lineu, Luciana, Luis, Marcelo, Márcia, Márcio, Marina, Michelly, Nathalie, Patrícia, Patrícia Ricardo, Paulo Braz, Paulo

Sérgio, Renata Acay, Ricardo, Roberto, Sérgio Alves, Tatiana, Tessa, Thaís, Vanessa, e Yonara, pelo convívio e pela amizade.

À amiga Edna, que com muito carinho me acompanhou nos primeiros passos dentro do Laboratório de Imunoistoquímica, e com sua sabedoria e simplicidade soube cativar uma grande amizade.

Às amigas Elisa e Bia, por toda ajuda na elaboração desse trabalho, mas em especial pela amizade e carinho no dia a dia em São Paulo.

Às funcionárias Zilda, Nair, Néia e Patrícia, por toda amizade, ajuda e principalmente paciência.

Às funcionárias do Setor de Pós-graduação da FOU SP por toda a colaboração.

À Gláucia e à Vânia, Bibliotecárias da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pela valiosa ajuda na formatação desse trabalho.

Aos meus amigos de Volta Redonda e Barra Mansa pelo incentivo e pelo carinho.

*"És para mim uma flor tão bela como o luar,
e eu um beija-flor a te beijar. És como um
regato de águas cristalinas, e eu um barquinho
em ti a navegar. És o arco-íris que coloriu a
minha vida, és linda como o mar, sonho lindo e
formoso que eu quero sonhar. É muito bom
poder te amar, minha Dorô"*

Sérgio Cury

Cury SEV. Expressão imunoistoquímica das citoqueratinas 7 e 8 em carcinomas epidermóides de assoalho bucal [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

Objetivo: Verificar a presença da expressão imunoistoquímica das Citoqueratinas (CKs) 7 e 8 nas células do Carcinoma epidermóide localizado em assoalho bucal (CEAB), estabelecendo a especulação de que essa neoplasia tem origem no epitélio de transição entre o ducto excretor da glândula salivar e a mucosa oral de superfície. **Métodos:** Noventa e dois casos de CEAB foram avaliados através da técnica imunoistoquímica da streptavidina/biotina, utilizando-se anticorpos monoclonais anti-CKs 7 e 8. **Resultados:** Setenta e oito casos (84,78%) mostraram positividade para as CKs estudadas. Quarenta e cinco casos (48,9%) mostraram positividade para CK7 e Sessenta seis casos (71,7%) para CK8. **Conclusão:** Houve uma intensa marcação celular das CKs estudadas. Os resultados encontrados indicam a participação do epitélio de transição entre os ductos excretores das glândulas salivares e a mucosa bucal de revestimento, na gênese dos carcinomas epidermóides nessa localização.

Palavras-chave: Carcinoma epidermóide bucal; Mucosa do assoalho bucal; Imunoistoquímica; Citoqueratinas.

Cury SEV. Citokeratin 7 and Citokeratin 8 immunohistochemical expression in Oral Squamous Cell Carcinoma of the floor of the mouth [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to verify the presence of Citokeratin7 (CK7) and Citokeratin 8 (CK8) positive cells of OSCC of the floor of the mouth establishing a speculation if this neoplasia has origin in excretory salivary duct epithelia transition to floor of the mouth mucosa. **Methods:** Ninety two cases of OSCC of the floor of the mouth were evaluated by straptavidin/biotin complex immunohistochemical technique and anti-CK7 and anti-CK8 monoclonal antibodies were used. **Results:** Seventy eight cases (84,78%) showed positive for one of the CKs; Forty five cases (48,9%) showed positive for CK7 and Sixty six cases (71,7%) showed positive for CK8. **Conclusions:** There is a high and significantly incidence of the immunoexpression of this citokeratins. These results suggest that the excretory salivary duct epithelia transition to floor of the mouth mucosa participates on the genesis of the OSCC in this location.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma; Floor of the mouth mucosa; Immunohistochemical; Citokeratins

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 5.1 A - Imunomarcacão – CK7	42
Figura 5.1 B - Imunomarcacão – CK7	42
Figura 5.2 A - Imunomarcacão – CK7	43
Figura 5.2 B - Imunomarcacão – CK7	43
Figura 5.3 A - Imunomarcacão – CK8	44
Figura 5.3 B - Imunomarcacão – CK8	44
Figura 5.4 A - Imunomarcacão – CK8	45
Figura 5.4 B - Imunomarcacão – CK8	45
Figura 5.5 A - Proliferaçao neoplásica CEAB – H&E	46
Figura 5.5 B - Proliferaçao neoplásica CEAB – H&E	46
Figura 5.5 A - Proliferaçao neoplásica CEAB – H&E	47
Figura 5.6 B - Proliferaçao neoplásica CEAB – H&E	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 – Distribuição das Citoqueratinas	19
Tabela 5.1 – Análise Imunoistoquímica: números absolutos	40
Tabela 5.2 – Análise Imunoistoquímica: marcação positiva	41

LISTA DE QUADROS

Quadro 4.1 – Distribuição das amostras de CEB em outros sítios anatômicos	36
Quadro 4.2 – Anticorpos utilizados.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEB	Carcinoma epidermóide bucal
CEAB	Carcinoma epidermóide de assoalho bucal
CK	Citoqueratina
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
et al	Do Latin e Colaboradoes
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
H&E	Hematoxilina e Eosina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
kDa	Quilodaltons
n	Número de indivíduos
nº	Número
PBS/BSA	Solução salina fosfato-tamponada com albumina bovina
pH	Potencial hidrogeniônico
TNM	Sistema de estadiamento clínico tumoral (T – extensão do tumor primário; N – metástases em linfonodos regionais; M – metástases à distância)
TRIS	Tri-hidroxi-metil-aminometano

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
μm	Micrômetro
X	Vezez
%	Por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	p. 17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Citoqueratinas	18
2.2 Carcinoma epidermóide.....	25
2.3 Assoalho Bucal	32
3 PROPOSIÇÃO	34
4 MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1 Amostras dos tecidos	35
4.2 Técnica imunoistoquímica	36
4.3 Análise do perfil imunoistoquímico.....	39
4.3 Procedimentos	39
5 RESULTADOS	40
5.1 Carcinomas epidermóides de outros sítios anatômicos na boca.....	40
5.2 Carcinomas epidermóides de assoalho bucal.....	40
6 DISCUSSÃO	48
7 CONCLUSÃO.....	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXOS.....	68

1 INTRODUÇÃO

É relatado na literatura que os carcinomas epidermóides de boca (CEB) ocorrem especialmente nas regiões dos epitélios de transição na mucosa bucal como borda lateral de língua, lábio inferior e limite entre o palato duro e o palato mole (SAWAF; OHAYOUN; FOREST, 1991). O assoalho bucal é uma região de acometimento freqüente desta neoplasia (NEVILLE et al., 2004), entretanto não é bem clara a transição epitelial nesta localização anatômica. A região é rica em ductos excretores de glândulas salivares, apresentando grande potencial em gerar inúmeros sítios de transição epitelial com a mucosa de revestimento, locais de possível desenvolvimento de um carcinoma epidermóide. No intuito de estudar a participação dessa transição epitelial na gênese dos carcinomas epidermóides localizados em assoalho bucal, foram avaliados 92 casos em relação à expressão imunoistoquímica das Citoqueratinas 7 (CK7) e 8 (CK8).

Apesar da comprovada influência de fatores extrínsecos na sua patogênese, deve-se lembrar que esta neoplasia é uma doença associada a fatores genéticos, tornando-se importante maior investigação a seu respeito, podendo seu estudo ser fonte determinante para descobertas em relação a sua prevenção e terapêutica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Citoqueratinas (CKs)

Os Filamentos Intermediários são proteínas que formam uma parte essencial do citoesqueleto e fornecem topologia às células e tecidos. Estes recursos resultam de sua propriedade intrínseca de auto-organização e da sua resposta a sinais extrínsecos (HELFAND; CHANG; GOLDMAN, 2004; KIRFELA; MAGINB; REICHELTB, 2003). São estruturas altamente dinâmicas, trocando proteínas continuamente em resposta a uma variedade de estímulos celulares, e submetidos a processos reversíveis de desmontagem e remontagem, como os que ocorrem durante a mitose (FILLIES et al., 2006; STEINERT; MAREKOV; PARRY, 1993; STEINERT; NORTH; PARRY, 1994; SKALLI; CHOU; GOLDMAN, 1992).

As CKs são um grupo de proteínas dos filamentos intermediários encontradas em grande quantidade nas células epiteliais e essenciais para o seu desenvolvimento e diferenciação. Em torno de 20 diferentes tipos de CKs foram identificados e codificados por dois genes distintos, sendo classificados como heterodímeros compostos por uma proteína ácida, menor (Tipo I – CKs 9 a 20), e heterodímeros compostos por uma proteína básica, maior (Tipo II – CKs 1 a 10). As CKs têm sido catalogadas didaticamente com numeração específica, de acordo com seu peso molecular e valores isoeletrônicos de pH, como demonstrado na Tabela 2.1 (ALMEIDA JR., 2004; CHU; WEISS, 2002; CRIVELINI, 1994; HEATLEY, 1996;

MOLL; FRANKE; SCHIULLER, 1982; MOLL et al., 1992; MOLL, 1994; MORGAN et al., 1987; STEINERT et al., 1993; WU et al., 2002). A sua principal função é a de transmitir a resistência mecânica das células. Funções adicionais incluem a sua participação na resposta ao estresse, sinalização celular e apoptose (KIRFELA; MAGINB; REICHELTB, 2003).

Tabela 2.1 – Distribuição das Citoqueratinas (MOLL; FRANKE; SCHIULLER, 1982)

número	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
peso molecular	68	66	63	59	58	56	54	53	64	57	56	55	54	50	50	48	46	45	40	46
pH isoeletrico	7.8	7.8	7.5	7.3	7.4	7.8	6.0	6.1	5.4	5.3	5.3	4.9	5.1	5.3	4.9	5.1	5.1	5.7	5.2	6.1

Estudos relatam que existe uma nítida associação entre as CKs do Tipo I e do Tipo II na formação dos filamentos intermediários, e que cada célula individualmente expressa seu próprio tipo de queratina. A composição desses pares de CKs pode variar de acordo com o tipo celular e seu grau de diferenciação (DA SILVA, 1999; MEDEIROS et al., 2004; OGDEN et al., 1993; SAWAF; OHAYOUN; FOREST, 1991; WU; RHEINWALD, 1981).

Os filamentos de CKs, que mostram relações bioquímicas e imunológicas de diversos graus, são expressos, em diferentes epitélios, em diferentes combinações de polipeptídios, variando em seu pH isoeletrico entre 5 a 8, e em pesos moleculares de 40 a 68 kDa (MOLL, 1994). Epitélios queratinizados como o encontrado na pele, expressam as CKs 1, 2 e 10, porém as mesmas também podem ser encontradas em epitélios não queratinizados. As CKs 3 e 12 somente são encontradas na córnea humana. Os epitélios pavimentosos não queratinizados expressam CKs 4 e 13,

sendo as CKs 5, 14 e 15 encontradas na camada basal de todos os epitélios estratificados nos queratinócitos que compõem os folículos pilosos. As CKs 6 e 16 são observadas nas células epiteliais em estado de hiperproliferação. Os epitélios simples possuem em geral de 2 a 4 polipeptídios, representados sempre pelos pares de CKs 7 e 19 e CKs 8 e 18. A citoqueratina 20 tem sido observada nas células de Merkel. Um dado epitélio ou células epiteliais pode, portanto, ser caracterizada pelo padrão específico das CKs dos seus componentes (COOPER; SCHERMER; SUN, 1985; CRIVELINI et al., 2003; DA SILVA, 1999; MOLL; FRANKE; SCHIULLER 1982; MORGAN et al., 1987).

O alto de grau de especificidade tecidual apresenta-se como a principal característica das CKs, que além de ser o maior componente do citoesqueleto das células epiteliais, possuem padrão típico de expressão nos tecidos epiteliais normais. De acordo com o tipo de tecido epitelial e estado de diferenciação celular, a expressão dessas proteínas sofre variações (DA SILVA, 1999; MORGAN et al., 1987; SAWAF; OHAYOUN; FOREST, 1991).

O estudo das alterações epiteliais em estados patológicos, tem se baseado no conjunto de características apresentadas pelas CKs, onde o alto grau de conservação e resistência a degradação, somado a grande fidelidade de expressão e antigenicidade, transformaram-se num importante instrumento de diagnóstico diferencial entre as neoplasias epiteliais (ARAÚJO; SOUZA, 1996; CASELITZ et al., 1982; CRIVELINI, 1994; FIGUEIREDO, 1995; MORGAN et al., 1987; SAWAF; OHAYOUN; FOREST, 1991; SOUZA, 1994; SOUZA et al., 1995).

Moll, Franke e Schiuller (1982), relataram que durante a transformação celular e o desenvolvimento de uma neoplasia, a especificidade dos filamentos intermediários do citoesqueleto das células de origem se mantinha preservada, o que contribuía para a classificação dos tumores pelo seu tipo de filamento intermediário, o que teria grande valor para o diagnóstico.

Alterações na expressão de CKs foram observadas durante a transformação neoplásica (HU et al., 1991; TRASK et al., 1990). Vários estudos têm demonstrado que a diminuição da expressão das CKs está relacionada com maior potencial metastático (HENDRIX et al., 1992; THOMPSON et al., 1992).

As diferentes expressões dos subtipos de citoqueratinas fazem delas, um proveitoso marcador histopatológico, provendo relevante informação no que concerne a diferenciação e origem dos carcinomas, podendo auxiliar no diagnóstico diferencial entre carcinomas primários e metastáticos de vários órgãos (KIM et al., 2004; MOLL, 1994; SILVEIRA et al., 2007). Sua utilização em patologia tem sido avaliada no diagnóstico de neoplasias indiferenciadas e determinação de subtipos tumorais. Dados sugerem que a expressão das CKs pode ser modulada por alterações na diferenciação e proliferação celular (CHU; WEISS, 2002; MIETTINEN, 1993; NAGLE et al., 1983; RAMAEKERS; HUYSMANS; MOESKER, 1983; SILVEIRA et al., 2007; SUN; SKELTON; GREEN, 1979; UPSANI; VAIDYA; BHISJEY, 2004).

Guo, Li e Gao (2007) relatam que as metástases linfáticas, características do CEB, não são completamente entendidas. Os autores realizaram um estudo no intuito de explorar a precisão e a aplicabilidade da expressão imunoistoquímica das

CKs em metástases nos linfonodos cervicais. A precisão no diagnóstico dessas metástases foi maior quando se utilizou reações imunoistoquímicas com anticorpos anti-CKs, do que nos exames histopatológicos com coloração em H&E.

A expressão imunoistoquímica de CKs em neoplasias de glândula salivar, tem se constituído de grande valor na obtenção de dados mais concretos sobre a histogênese e diferenciação neoplásica nestas glândulas. As CKs traduzem, de forma mais fidedigna, a natureza e a diferenciação do tecido epitelial (ARAÚJO; SOUZA, 1996; FIGUEIREDO, 1995; GUSTAFSSON et al., 1988; MARTINS et al., 2002; SOUZA, 1994; SOUZA et al., 1995).

Moll, Schiller e Werner (1990) relata que a expressão das CKs em epitélios simples como os encontrados em glândulas, são basicamente reduzidas a três grupos: CKs 8 e 18; CK s 8, 18 e 19; e CKs 7 e 8 e CKs 18 e 19.

Baseados em estudos prévios, anticorpos monoclonais específicos anti-CKs 7 e 8 têm sido utilizados como marcadores para neoplasias de glândulas salivares (ALTEMANI et al., 2005; ARAUJO; SOUZA, 1996; CRIVELINI et al., 2003; FOSCHINI; MARUCCI; EUSEBI, 2002; HIROTA et al., 2007; LOYOLA et al., 1998; SOUZA, 1994; SOUZA et al., 1995; SOUZA et al., 2001).

A CK7 é uma proteína dos filamentos intermediários de 54kDa, sendo uma das principais CKs do tipo II. É comumente encontrada na maioria dos epitélios simples glandulares e de transição, não sendo encontrada nos epitélios pavimentosos estratificados. Nos epitélios glandulares a CK7 é observada nas

células ductais dos ductos excretores e intercalados, e em menor intensidade nas células acinares (ARAÚJO; SOUZA, 1996; CHU; WEISS, 2002; FARREL; CHANG, 2007; NIKITAKIS et al., 2004; ROSSI et al., 2004).

A CK8 possui peso molecular de 53 kDa, sendo encontrada nos ductos excretores e intercalados e nos ácinos glandulares, não sendo encontrada nos epitélios pavimentosos estratificados (ARAÚJO; SOUZA, 1996; CHU; WEISS, 2002).

Loyola et al. (1998) estudaram 17 casos de carcinoma mucoepidermóide em relação aos seus tipos celulares. As células acinares foram positivas para as Cks 7 e 8, bem como as células luminais do ducto excretor. As células do ducto intercalado também foram positivas para as CKs 7 e 8, bem como as células do ducto estriado. As células epidermóides foram negativas para ambas as CKs estudadas.

Guirado, Martins e Araújo (1998) realizaram um estudo em mucosa oral normal, utilizando anticorpos para CKs nos diversos epitélios presentes nas diferentes localizações da cavidade oral. Foram utilizados anticorpos para as CKs 7, 8, 10, 13, 14, 16, 17, 18, 19 e 20. Os autores relataram que as CKs 7 e 8 não se expressaram em nenhuma região estudada.

Da Silva em 1999, realizou um trabalho no qual a expressão imunoistoquímica das CKs 7, 8, 10, 13, 14, 16, 18, 19 e 20 foi estudada em 47 carcinomas epidermóides bucais. Entre os tumores, 13 eram de assoalho bucal, 10 de língua, 5 de gengiva ou rebordo alveolar, 9 do palato e 10 do lábio inferior. Os

resultados obtidos mostraram que as CKs 7 e 8 foram negativas em todos os tumores, independente da localização.

Regauer, Beham e Mannweiler (2000) relataram que os carcinomas epidermóides localizados na região do Anel de Waldeyer, são negativos para a CK7, com exceção de um subconjunto de tumores metastáticos, que, segundo os autores, parecem ter se originado a partir dos ductos de glândulas salivares menores, com apenas limitado envolvimento da superfície epitelial. Os autores completam citando que a CK7 possui um consistente papel como marcador para tumores de origem ductal.

Sobral et al. (2002), analisaram a expressão imunoistoquímica de diversas citoqueratinas em carcinomas mucoepidermóides e carcinomas epidermóides de parótida. Nos casos estudados, as CKs 7 e 8 foram negativas para os carcinomas epidermóides e positivas para o carcinoma mucoepidermóide.

Martins et al. (2002) estudaram glândulas salivares localizadas no lábio, palato, língua e assoalho bucal, obtidas a partir de 13 fetos humanos (forense post-mortem). Segundo os autores, uma das primeiras CKs expressas no desenvolvimento das glândulas salivares menores foi a CK7. Inicialmente aparecia como uma fraca marcação nas células lumbais do ducto excretor. Com a citodiferenciação, essas células exibiram forte marcação para a CK7, e começaram a expressar a CK8. Relatam que nas células acinares, independente do estágio de diferenciação, as CKs 7 e 8 foram expressas.

Vários estudos têm demonstrado que as CKs 7 e 8 são expressas nas células luminais e acinares em glândulas salivares do adulto (GUSTAFSSON et al., 1988; MARTINS et al., 2002; SU et al., 1993).

Fillies et al. (2007) estudaram 308 casos de carcinomas epidermóides localizados em assoalho bucal e tratados cirurgicamente. Foi investigada a imunoexpressão de uma variedade de filamentos intermediários incluindo CKs de alto e baixo peso molecular tais como CKs 5, 6, 8, 18, 1, 10, 14, 19 e a vimentina. Correlações entre as características clínicas e a expressão das CKs e vimentina foram avaliadas. Dentre os resultados encontrados, os autores citam que a expressão da CK8 foi significativamente maior, correlacionada com um mau prognóstico clínico. Em conclusão os autores relatam que a expressão da CK8 seria um marcador prognóstico independente, e indicaria um pior prognóstico e uma diminuição global na sobrevida do paciente.

Meer e Altini em 2007, relatam a utilização da CK7 como fator diferencial entre as neoplasias glandulares e o Carcinoma epidermóide.

2.2 Carcinoma epidermóide

As neoplasias malignas da boca representam cerca de 5% de todas as malignidades mundiais em humanos e até 9% no Brasil (COTRAN et al., 2000; FRANCESCHI et al., 2000; INCA, 2000a; PARKIN; PISANI; FERLAY, 1999). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2007), o câncer bucal é a

quinta e sétima neoplasia maligna responsável pelo maior número de óbitos no Brasil entre homens e mulheres, respectivamente, e esperam-se 14.160 novos casos para o ano de 2008, sendo 10.380 para homens e 3.780 para mulheres.

Mais de 90% dos casos de câncer que ocorrem na boca são carcinomas epidermóides (AGUIAR JUNIOR; KOWALSKI; ALMEIDA, 2007; AMARAL et al., 2004; BRUGERE et al., 1996; OKAMOTO et al., 2002), seguidos por outros carcinomas (verrucosos, indiferenciados, de glândulas salivares menores), sarcomas, e raramente, por melanoma (INCA, 2000b; PARISE JUNIOR, 2000). A doença ocorre caracteristicamente em indivíduos entre a quarta e sexta décadas de vida; predominantemente aqueles do sexo masculino expostos aos fatores de risco (notavelmente uso de fumo, ingestão crônica de bebidas alcoólicas e radiação solar), associados a fatores genéticos (BANERJEE; BHATTACHARYYA; VISHWANATHA, 2005; FRANCESCHI et al., 2000; HINDLE et al., 2000; KRAUNZ et al., 2006; NEVILLE et al., 2004; OGDEN; WIGHT, 1998; TSUNEYAMA et al., 2004; YOUNG et al., 2007). Com relação ao fumo e álcool, foi estimado que o tabagismo, e o consumo de álcool são responsáveis por 75% de todos os casos de Carcinomas epidermóides orais (SASAKI et al., 2005).

O Carcinoma epidermóide é, em grande parte, diagnosticado tardiamente, quando então já alcançou estágios avançados (FARIA; CARDOSO; LOYOLA, 1999; INCA, 2000b; MASHBERG, 2000). Em conseqüência, menos de 50% dos pacientes sobrevivem decorridos os primeiros cinco anos de seguimento (HOSSFELD; SHERMAN; LOVE, 1990; MASHBERG, 2000).

Aparecem clinicamente como lesões brancas, eritroplásicas ou, mais comumente, como ulcerações nos tecidos bucais, acometendo com maior frequência lábio inferior, língua, e assoalho bucal (EVERSOLE, 1984; FARIA; CARDOSO; LOYOLA, 1999; HOSSFELD; SHERMAN; LOVE, 1990; INCA, 2000b; PRINCE; BAYLEY, 1999).

Como o papel de alguns fatores etiológicos não está totalmente esclarecido, tem sido sugerido na literatura que mesmo na ausência de agentes causadores, o carcinoma epidermóide pode surgir, indicando que alterações genéticas estão intimamente ligadas ao aparecimento da doença (BOYD; READE, 1988; JIN et al., 1999; WARNAKULASURYA; JOHNSON, 1999). Sendo assim, o estudo da carcinogênese pautou-se numa série de eventos relacionados a mutações genéticas, envolvendo alterações específicas em oncogenes e genes supressores de tumor, que resultaria na interrupção de sinais celulares, alterando o mecanismo de reparação do dano do DNA. Essa alteração acarretaria uma ausência da eliminação de células não funcionais, culminando com um crescimento desordenado, através de uma proliferação desregulada de um clone celular (GOODGER et al., 1997; MINETA et al., 1997; SCULY; PORTER, 2001).

Suas características clínicas variam de acordo com o tempo de duração e padrão de crescimento. As lesões podem apresentar coloração avermelhada ou esbranquiçada, com superfície plana ou rugosa, na maioria das vezes ulcerada, e apresentando bordas endurecidas. O local de maior incidência na boca é o lábio, e, na região intra-oral, a língua, seguida do assoalho, palato mole e rebordo alveolar.

Inicialmente é assintomático, o que dificulta a procura por cuidados, afetando diretamente o curso evolutivo da doença (NEVILLE et al., 2004).

Os aspectos histopatológicos do carcinoma epidermóide demonstram um padrão sólido de crescimento caracterizado por cordões, ilhas ou ninhos formados por células epiteliais morfológicamente alteradas, com grande potencial invasivo. Os queratinócitos atípicos podem apresentar alterações morfológicas caracterizadas por nucléolos proeminentes, pleomorfismo e hipercromatismo nuclear, perda da relação núcleo-citoplasma, diskeratose e figuras de mitoses atípicas. Em alguns casos, os queratinócitos atípicos mantêm a capacidade de produção de queratina, que formam arranjos no interior dos agregados tumorais denominados pérolas de queratina ou pérolas córneas (NEVILLE et al., 2004; SAPP; EVERSOLE; WISOCKI, 1998).

O tratamento do carcinoma epidermóide bucal varia consideravelmente, mas o procedimento de rotina inclui cirurgia com ou sem dissecação do pescoço, seguido por radioterapia adjuvante e/ou quimioterapia. Na prática clínica, o tratamento, planejamento e prognóstico para pacientes portadores da doença baseiam-se, principalmente na classificação TNM. No entanto, os resultados clínicos nem sempre seguem a expectativa desses parâmetros, indicando que outros fatores relacionados ao doente ou a características biológicas do tumor, poderiam ser relevantes. Apesar de todos os esforços terapêuticos, a taxa global de cinco anos de sobrevida não melhorou notavelmente nas últimas duas décadas, e ainda está entre as mais baixas dentre as neoplasias malignas (AGUIAR JUNIOR; KOWALSKI; ALMEIDA, 2007; CROWE; MILO; SHULER, 1999).

Os efeitos crônicos e seqüelas do tratamento, em especial os da radioterapia, são graves e muitas das vezes irreversíveis. Xerostomia, cáries dentárias, fibrose e úlceras crônicas acompanhadas de osteorradionecrose são citados na literatura (COOPER et al., 1995; SALOMÃO, 2003; THORN et al., 2000).

Estudos têm mostrado que o prognóstico do Carcinoma epidermóide bucal depende do estadiamento e classificação da diferenciação tumoral. Outras informações relativas ao potencial maligno das células tumorais tornaram-se obrigatórias. Seu comportamento imprevisível tem levado investigadores, a pesquisar fatores que podem ser utilizados como índices para o diagnóstico, prognóstico e tratamento, culminando na utilização de diferentes marcadores biológicos (AL-AZZAWI; AL-TALABANI; AL-SALIHI, 2006). Outra distinção deve ser feita entre os diferentes locais na cavidade oral. Há diferenças na incidência, no comportamento tumoral, no tratamento, nos resultados obtidos, nas possíveis complicações e prognóstico, baseados na localização do tumor (MCGUIRT JR et al., 1995).

A atividade biológica do Carcinoma epidermóide bucal normalmente é avaliada pela classificação da célula tumoral como bem, moderadamente ou mal diferenciada. A definição precisa do grau de diferenciação dos tumores é, no entanto falha, e a classificação do Carcinoma epidermóide bucal de acordo com o grau de maturação das células neoplásicas apresenta valor limitado, como base para a escolha do tratamento e prognóstico (ANNEROT; BATSAKIS; LUNA, 1986).

A formulação do prognóstico é importante tanto para orientação do paciente como para planejamento da abordagem terapêutica, e é realizada a partir da análise das características individuais de cada caso. Tais características, podem estar relacionadas à uma série de fatores como condição sistêmica do paciente (como seu estado nutricional), aos achados clínicos do tumor (como a localização e o tamanho da lesão), o comportamento biológico do tumor representada pela sua invasividade e potencial de metástases, e a achados histológicos (grau de invasão e proliferação celular) ou moleculares (mutações ou induções) (CARDOSO, 2001; PINTO JUNIOR, 1991).

As taxas de recorrência do Carcinoma epidermóide bucal variam de 18% a 76% para os pacientes submetidos tratamento padrão, e é considerado o principal motivo para a não melhora das taxas de sobrevivência. Recorrências locais e regionais são dependentes principalmente do local do tumor primário, estadiamento clínico, algumas características histológicas específicas, tratamento e abordagem. A recorrência local é definida como a ocorrência de um novo carcinoma menos de 2 cm do local de surgimento do tumor primário. Ocorre mesmo em casos submetidos a uma ampla excisão cirúrgica com margens microscopicamente negativas. Em teoria, recorrências locais podem desenvolver tanto de células neoplásicas remanescentes, que, ocasionalmente, não foram detectadas nas margens após avaliação histológica, ou a partir de células geneticamente modificadas adjacentes ao local de ressecção do tumor primário (AGUIAR JUNIOR; KOWALSKI; ALMEIDA, 2007).

A invasão local e a ocorrência de metástases nos linfonodos regionais por estes tumores são as principais causas da alta taxa de mortalidade (LIMA et al.,

2004; SHAH; CANDELA; PODAR, 1990; TEICHGRAEBER; CLAIRMONT, 1984; ZHONG et al., 2006), sendo a taxa de sobrevida 50% menor, se o carcinoma progride de localizado para um estágio regional (GRENLEE et al., 2001; MATSUZAKI et al., 2007). A difusão desses tumores metastáticos geralmente ocorre através do sistema linfático localizado no pescoço. A incidência de metástases do carcinoma epidermóide bucal ocultas em linfonodos do pescoço, em doentes nos estádios I e II, varia de 23,7% a 42%. Sendo mais elevada nos carcinomas localizados na língua e no assoalho da bucal, do que em outros sítios da boca (AMARAL et al., 2004; BRUGERE et al., 1996; CROWE; MILO; SHULER, 1999; OKAMOTO et al., 2002).

O padrão de metástases do Carcinoma epidermóide bucal é ditado pela localização anatômica do tumor primário. Tumores de assoalho bucal invadem precocemente pela mucosa em direção a glândula salivar sublingual, musculatura da linha média e estendem-se pela mucosa gengival e osso mandibular. Metástases nodais freqüentemente ocorrem em pacientes portadores de lesões localizadas em assoalho bucal, com incidências variando de 11 a 53%, fato esse que diminui consideravelmente a taxa de sobrevivência de pacientes com lesões nessa região (LINDBERG, 1972; SALOMÃO, 2003; SHAH; ANDERSEN, 1995; ZUPI et al., 1998).

Byers, White e Yue (1981) observaram entre 25% a 30% a incidência de metástases ocultas nos pacientes portadores de carcinomas epidermóides localizados em assoalho bucal. Já Dias et al. (2006), encontraram a incidência de metástases para linfonodos regionais de 38,4% (45 de 117 pacientes).

Eversole (1971) relata a ocorrência do que o autor chamou de “Carcinoma epidermóide de origem na glândula salivar”, sugerindo que as células do ducto excretor seriam capazes de gerar elementos epidermóides, originando carcinomas. Cita ainda que pequenas diferenças na "informação armazenada" no mesênquima podem contribuir para a ocorrência de diversas neoplasias decorrentes do epitélio salivar e podem estar diretamente relacionadas às capacidades inerentes de diferenciação dos ductos salivares durante a gênese tumoral.

O carcinoma epidermóide localizado em assoalho bucal representa em torno de 35% dos cânceres intra-orais, e é o que possui maior probabilidade de surgir de uma leucoplasia pré-existente. O assoalho é ainda o sítio mais freqüentemente associado a metástases de carcinomas epidermóides primários de outros locais do trato digestivo ou de órgãos distantes (NEVILLE et al., 2004). A habitual proximidade da doença nessa localização para a mandíbula, bem como a pobre barreira mecânica existente no local, contribui para a propagação tumoral (HICKS JR. et al., 1997; LEEMAU; RAMMOHAN; NANTA, 1991; ZELEFSKY; HARRISON; FASS, 1992).

2.3 Assoalho Bucal

Representa a porção da mucosa oral que recobre o fundo do sulco lingual, formando a transição entre a gengiva inserida e a porção ventral da língua. Apresenta uma superfície lisa e brilhante, de coloração rosa e contendo pequenas dobras. Seu epitélio é fino e permeável, com aproximadamente 180µm de espessura. Além de não conter estrato espinhoso, suas células deixam amplos

espaços entre elas (DE FERRARIS; MUÑOZ, 2006; KATCHBURIAN; ARANA, 2004). A permeabilidade pode ainda desempenhar um papel na etiologia de certas doenças da mucosa oral, incluindo câncer (SQUIER, 1991). Sua lâmina própria possui poucas e baixas papilas conjuntivas, e poucas fibras colágenas. A submucosa está relacionada com a porção secretora da glândula salivar sublingual, e com inúmeras outras glândulas salivares acessórias, formando regiões de transição entre o epitélio superfície, do tipo pavimentoso estratificado, e o epitélio da porção terminal dos ductos excretorios, do tipo cúbico e/ou colunar estratificado. A lâmina própria e a submucosa do assoalho bucal apresentam ainda grande vascularização, através de ramos das artérias lingual, facial e submentoniana, bem como da veia sublingual (GENESER, 2003; KATCHBURIAN; ARANA, 2004; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

3 PROPOSIÇÃO

Através do método imunoistoquímico, avaliar a expressão das CK7 e CK8 nos carcinomas epidermóides de assoalho bucal e discutir a potencial participação do epitélio de transição entre os ductos excretores das glândulas salivares regionais e a mucosa oral de revestimento na gênese do tumor.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras dos tecidos

Através de uma análise retrospectiva, foram obtidos 92 casos de Carcinoma epidermóide localizados em assoalho bucal, do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). As lesões foram analisadas inicialmente em relação aos aspectos histopatológicos, sendo o exame anatomopatológico realizado em secções teciduais de 5 µm de espessura, e corados pela técnica da hematoxilina-eosina. Posteriormente as mesmas foram avaliadas em relação à expressão imunoistoquímicas das CKs 7 e 8 através da técnica da steptavidina/biotina.

No intuito de dirimir dúvidas em relação à exclusividade glandular de marcação das CKs estudadas, também, através de uma análise retrospectiva, foram obtidos 60 casos de Carcinomas epidermóides localizados em outros sítios anatômicos na boca, do mesmo arquivo da FOUSP (Quadro 4.1).

Sítio	Número de casos
LÁBIO INFERIOR	10
LÍNGUA (borda)	5
LÍNGUA (ventre)	5
PALATO (duro)	5
PALATO (mole)	5
GENGIVA	10
MUCOSA JUGAL	10
REBORDO ALVEOLAR (superior)	5
REBORDO ALVEOLAR (inferior)	5
TOTAL	60

Quadro 4.1 – Distribuição das amostras de CEB em outros sítios anatômicos

4.2 Técnica imunoistoquímica

Após serem selecionadas, as lesões, previamente fixadas em formol 10% e emblocadas em parafina, foram submetidas a cortes de 3 μm de espessura e fixadas em lâminas previamente tratadas com organosilano (3-aminopropyltriethoxy-silano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), necessário para maior aderência dos cortes. Em seguida, os mesmos foram desparafinizados em dois banhos de xilol, sendo primeiro por 30 minutos a 60° C e o segundo por 20 minutos em temperatura ambiente, e em seguida reidratados em banhos descendentes, com passagem em etanol absoluto por três vezes, etanol 95% e etanol 85% por cinco minutos cada.

Posteriormente, para remoção do pigmento formólico, os cortes foram imersos por dez minutos em solução de hidróxido de amônia a 10% em etanol a 95%.

Para a recuperação antigênica as lâminas foram mergulhadas em solução de ácido cítrico monoidratado 10mM, pH 6,0 e colocadas em banho Maria por 30 minutos a 95°C. Posteriormente, os cortes foram lavados em água destilada por 10 minutos.

O último bloqueio realizado foi o da peroxidase endógena, mergulhando-se as lâminas em uma solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes em álcool metílico 1X1, em dois banhos de 15 minutos cada. As lâminas foram então lavadas por 10 minutos em água destilada.

Antes da incubação do anticorpo primário, foram realizados 3 banhos de 5 minutos com solução tampão TRIS (Tri-hidroxi-metil-aminometano - Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) pH de 7,4.

As etapas seguintes foram realizadas automaticamente, com o auxílio do sistema de coloração universal Autostainer DAKO (DAKO Corporation, Glostrup, Denmark). Após serem acomodadas no equipamento, as lâminas contendo os cortes foram submetidas à incubação com os anticorpos primários diluídos em solução TRIS, pH 7,4 acrescido de albumina bovina a 1%, contendo azida sódica a 0,1% (BSA- Biotest S/A – São Paulo, Brasil). Para a identificação da expressão das CKs utilizadas, os anticorpos primários anti-CK 7 e anti-CK8 foram diluídos em solução PBS/BSA a 2%. O Quadro 4.2 mostra a relação dos anticorpos primários utilizados, a diluição de trabalho e o tempo de incubação no qual foram realizadas as reações.

Em seguida as lâminas foram lavadas em água destilada e em solução tampão de TRIS, pH 7,6. Como soro secundário e complexo terciário, foi utilizado o kit Envision DAKO (DAKO Corporation, Glostrup, Denmark) por 30 minutos cada.

A revelação da reação foi feita através da imersão das lâminas em solução do cromógeno diaminobenzidina (DAB, 3,3 – diaminobenzidina, Sigma Chemical CO., St Louis, MO/USA) por dez minutos. Os cortes foram então lavados em TRIS pH 7,6, e água destilada e contra-corados com hematoxilina de Mayer por dez minutos. Posteriormente os cortes foram lavados em água destilada.

Especificidade	Peso molecular (kD)	Clone	Diluição	Tempo de incubação (minutos)	Fabricante
CK 7	54	0V-TL 12/30	1:50	30	BIOGENEX, San Ramon, CA, USA
CK 8	52,5	35βH11	1:50	30	BIOGENEX, San Ramon, CA, USA

Quadro 4.2 – Anticorpos utilizados

Após esta passagem, as lâminas foram retiradas do equipamento e processadas manualmente para as etapas de desidratação em cadeia ascendente de etanol e diafanização em três banhos de xilol. As lâminas foram montadas em Permount (Fisher Scientific, Fair Law, NJ/USA) para exame ao microscópio de luz.

Como controle negativo não foi realizado a incubação com o anticorpo primário, e como controle positivo foi utilizado fragmento de mucosa bucal normal

com localização anatômica em assoalho bucal e abrangendo áreas de epitélio de transição ducto/mucosa, para visualização da expressão das CKs 7 e 8.

4.3 Análise do perfil imunoistoquímico

A análise do perfil imunoistoquímico foi realizada por um único observador, utilizando-se um microscópio de luz (Olimpus CH2 – Olympus Optical Co. Ltd – Japan), com aumento final de 400X para a avaliação da imunomarcagem das CKs utilizadas.

Foram consideradas células positivas, aquelas com citoplasma de coloração castanho escuro.

4.4 Procedimentos

Para avaliação dos critérios éticos, um Protocolo foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP, que emitiu parecer favorável à sua realização e com encaminhamento para registro na comissão Nacional de Ética em Pesquisa do Ministério da Saúde (CEP 46/06 - Anexos A e B).

5 RESULTADOS

5.1 Carcinomas epidermóides de outros sítios anatómicos na boca

As reações com os anticorpos anti CKs 7 e 8 foram negativas em todos os cortes estudados, motivo pelo qual não foram inseridas em tabela.

5.2 Carcinomas epidermóides de assoalho bucal

Setenta e oito casos (84,78%) mostraram-se positivos para os anticorpos utilizados (Tabela 5.1). Quarenta e cinco (48,9%) positivos para a CK7 (Tabela 5.2 e Figuras 5.1 A e B e 5.2 A e B), e 66 (71,7%) positivos para a CK8 (Tabela 5.2 e Figuras 5.3 A e B e 5.4 A e B).

Tabela 5.1 – Análise Imunoistoquímica: números absolutos

	<i>n</i>	%
Positivos	78	84,78
Negativos	14	15,22
TOTAL	92	100

Tabela 5.2 – Análise Imunoistoquímica: marcação positiva

<i>Anticorpos</i>	<i>Positivos</i>	<i>Positivos %</i>
CK 7	12	13,04
CK8	33	35,87
CK7 + CK8	33	35.87
TOTAL	78	84,78

As células positivas apresentaram quase que exclusivamente marcação citoplasmática para ambas as CKs estudadas. Exceção apenas para alguns grupos de células com marcação nuclear, localizadas nas áreas de formação de pérolas córneas. Devido a essa localização, e como as CKs são proteínas do citoesqueleto citoplasmático, a marcação nuclear foi interpretada como presente nas células em estágio de apoptose, não apresentando importância relacionada ao núcleo da célula neoplásica.

Figura 5.1 - Imunomarcação CK7

Figura 5.2 - Imunomarcação CK7

Figura 5.3 - Imunomarcção CK8

Figura 5.4 - Imunomarcação CK8

Figura 5.5 - Proliferação neoplásica no CEAB (esboço glandular – H&E)

Figura 5.6 - Proliferação neoplásica no CEAB (esboço glandular – H&E)

6 DISCUSSÃO

O uso da imunoistoquímica propiciou, com maior precisão, a natureza dos diversos tecidos neoplásicos, utilizando pesquisa de antígenos, possibilitando assim uma melhor compreensão da composição celular e sua morfo-histogênese, contribuindo para o diagnóstico e elaboração de classificações mais precisas (COOPER; SCHERMER; SUN, 1985; LOYOLA et al., 1998; SOUZA, 1994).

Há mais de 30 anos, pesquisas vêm sendo realizadas no intuito de, através da imunoistoquímica, caracterizar os tipos de CKs expressas em determinados grupos celulares que sofreram transformação maligna, buscando seu diagnóstico diferencial com outras neoplasias originadas no mesmo tecido ou mesmo em tecidos diferentes. As informações obtidas trouxeram inúmeros avanços na compreensão de diversas neoplasias malignas, demonstrando a importância de sua utilização na pesquisa laboratorial, e posterior aplicação nos serviços de diagnóstico anatomopatológico.

Recentes progressos na compreensão da biologia das CKs, juntamente com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais, têm dado suporte para o estudo da expressão dessas CKs em epitélios normais e patológicos. As mesmas têm sido observadas em carcinomas epidermóides orais, e têm sido associadas com aspectos específicos no comportamento tumoral (RAM-PRASSAD; NIRMALA; KOTIAN, 2005).

As CKs são proteínas estáveis, até certo ponto resistentes à degradação, com grande potencial antigênico, revelando, durante o exame imunoistoquímico, um alto grau de conservação em células neoplásicas (ARAÚJO; SOUZA, 1996; COOPER; SCHERMER; SUN, 1985; MOLL; FRANKE; SCHIULLEER, 1982; MORGAN et al., 1987; NIKITAKIS et al., 2004; SOUZA et al., 1995). Neste estudo, as CKs mantiveram-se conservadas nas amostras utilizadas, o que confirmou essas características, e permitiu melhor entendimento da morfologia do carcinoma epidermóide localizado em assoalho bucal. Soma-se a isso, o atributo de serem específicas para cada tipo de epitélio, justificando, portanto, a sua utilização.

Sendo o carcinoma epidermóide, a neoplasia maligna mais comum na região oral e maxilofacial (DE VICENTE et al., 2001; SCULLY; PORTER, 2001; ZHONG et al., 2006), muitos esforços têm sido realizados no intuito do aperfeiçoamento de técnicas de diagnóstico precoce da doença, todos com vistas à melhora no tratamento e recuperação do paciente. O prognóstico, porém, continua pobre, em especial nas lesões localizadas em assoalho bucal.

Baseado na observação de que grande parte dos carcinomas reserva o perfil de suas CKs de origem, diferentes reações imunoistoquímicas têm sido utilizadas na exata identificação e classificação dos diferentes tipos de carcinomas (NIKITAKIS et al., 2004). Sendo de origem epitelial, o carcinoma epidermóide oral expressa CKs, onde as mesmas têm sido associadas com aspectos específicos no comportamento neoplásico (CROWE; MILO; SHULER, 1999; DA SILVEIRA et al., 2007; RAMPRASSAD; NIRMALA; KOTIAN, 2005; STEINERT, 1993).

Diante do exposto, este estudo baseou-se principalmente pela observação do fato de que em muitos carcinomas localizados em assoalho bucal, a proliferação celular neoplásica, adquiria um padrão de invasão por vezes formando ilhas com formato arredondado, composta por queratinócitos atípicos de tamanhos aumentados, até certo ponto robustos, com abundante citoplasma e por vezes claros. Este padrão se assemelhava freqüentemente com os adenocarcinomas. (Figuras 5.5 A e B e 5.6 A e B), lembrando um esboço glandular, o que motivou a análise imunoistoquímica da lesão utilizando-se as CKs que são expressas em células epiteliais de glândula salivar.

Outro ponto foi a falta de estudos a respeito da localização da transição epitelial no assoalho bucal, pois sendo o assoalho, uma região de ocorrência freqüente desta neoplasia (NEVILLE et al., 2004), e como a mesma pode acometer especialmente regiões de epitélios de transição na mucosa bucal (SAWAF; OHAYOUN; FOREST, 1991), não estava bem clara a transição epitelial nesta localização anatômica. O assoalho bucal é uma região rica em ductos excretores de glândulas salivares, com uma grande quantidade de ductos se exteriorizando para a mucosa, fato esse que propicia a geração de inúmeros sítios de transição epitelial. A hipótese da transição epitelial dos ductos das glândulas salivares com o epitélio de revestimento no assoalho bucal ser responsável pela possível participação na gênese tumoral gerou a idéia do estudo da expressão das CKs glandulares.

Finalmente, somado à possível diferença morfológica observada microscopicamente, estava a de que, a localização da lesão em assoalho bucal é uma das mais agressivas em potencial letal das neoplasias da cavidade oral (HICKS

JR. et al., 1997; LEEMAUS; RAMMOHAN; NANTA, 1991; ZELEFSKY; HARRISON; FASS, 1992). Estudos relatam ainda que, em pacientes diagnosticados com carcinoma epidermóide bucal e submetidos à radioterapia, a incidência de osteorradioneecrose é significativamente maior nos pacientes com carcinomas localizados no assoalho bucal, que nos pacientes com localização em outros sítios anatômicos (TURNER et al., 1996; CURI; DIB, 1997; WONG; WOOD; MCLEAN 1997; THORN et al., 2000).

O estudo da morfologia do Carcinoma epidermóide bucal tem sido fundamental para o aperfeiçoamento do diagnóstico, para a melhor compreensão do padrão de crescimento, bem como de sua histogênese. São praticamente inexistentes relatos na literatura sobre a participação de células ductais na gênese do Carcinoma epidermóide localizado em assoalho, aparecendo somente uma pequena menção no estudo de Eversole em 1971, onde o autor cita que as células do ducto excretor glandular seriam capazes de gerar elementos epidermóides, originando carcinomas, porém sem explicação se esses carcinomas seriam epidermóides ou mucoepidermóides, por exemplo. Sendo assim, caso o autor estivesse relatando a formação de Carcinomas epidermóides, a forte marcação imunoistoquímica das CKs 7 e 8 por nós encontrada, reafirma essa menção feita por Eversole, e demonstra a participação de células ductais na composição celular do Carcinoma epidermóide localizado em assoalho bucal.

Até a presente data, nenhum estudo avaliou especificamente a expressão imunoistoquímica das CKs 7 e 8 em Carcinomas epidermóides localizadas em assoalho bucal, com exceção do trabalho de Da Silva em 1999, no qual o autor

estudou a expressão imunoistoquímica das CKs em Carcinomas epidermóides bucais. Na amostragem utilizada pelo autor, abrangendo língua, gengiva, rebordo alveolar, palato e lábio inferior, encontravam-se incluídos 13 casos em assoalho, porém em nenhum sítio estudado, inclusive no assoalho, ocorreu positividade para CKs 7 e 8. Esse fato foi observado neste estudo, diferenciando apenas nos casos localizados em assoalho bucal. Essa diferença pode ter sido provocada por modificações técnicas (técnica imunoistoquímica, clone e fabricante do anticorpo utilizado), empregadas em nosso estudo. Foi de extrema importância utilizarmos paralelamente, a avaliação da expressão das CKs 7 e 8 em sítios anatômicos diferentes do assoalho bucal, levando-se em conta a pequena amostragem utilizada no estudo de Da Silva. Esse levantamento foi fundamental para que não houvesse dúvidas a respeito da exclusividade da expressão do painel estudado em células de origem glandular, considerando, principalmente, que não existe na literatura indicação específica da participação das CKs 7 e 8 em Carcinomas epidermóides localizado em assoalho bucal. Soma-se a esse fato, a presença de estudos anteriores realizados por Chu e Weiss em 2002 e Nikitakis et al. em 2004, onde ficou demonstrado que os Carcinomas Epidermóides de diversas origens são predominantemente negativos para a CK7.

Ainda segundo Da Silva (1999), o padrão das CKs em carcinomas epidermóides bucais é diferente do observado na mucosa normal, independente da região estudada. Há uma variação de acordo com a diferenciação celular, lembrando o comportamento da célula embrionária. Neste estudo, como as células neoplásicas epidermóides apresentaram positividade para as CKs glandulares, há a possibilidade das mesmas estarem se comportando como a célula embrionária

glandular, o que mais uma vez corrobora nossa especulação da participação das células do ducto excretor na composição celular do Carcinoma epidermóide em assoalho bucal.

A associação da doença a um prognóstico pobre, em muito é devido à elevada incidência de recorrência e metástases, e sendo o assoalho bucal, um dos locais de maior incidência dessas complicações (AMARAL et al., 2004; ILDSTAD; BIGELOW; REMENSNYDER, 1985; STROME et al., 1999), existe a possibilidade da participação do sistema de ductos das glândulas salivares na evolução e poder de invasão tumoral, o que justificaria a maior ocorrência de recidivas e metástases nessa localização anatômica. Como, em nosso estudo, existe uma forte indicação da participação de células ductais na composição celular do Carcinoma epidermóide em assoalho bucal, e sendo ele um dos mais agressivos em potencial letal dentre as neoplasias da cavidade oral (HICKS JR. et al., 1997; LEEMAUS; RAMMOHAN; NANTA, 1991; ZELEFSKY; HARRISON; FASS, 1992), surge uma nova especulação de que o Carcinoma epidermóide em assoalho bucal, que expressa CKs 7 e 8, poderia ser considerado como possuidor de um maior poder de invasão, o que justificaria sua agressividade, e, conseqüentemente, indicaria um pior prognóstico. Há de se levar em conta que, como este trabalho foi realizado em cortes histológicos de arquivo, o valor prognóstico da expressão das CKs 7 e 8 não pôde ser confirmado

Analisando os resultados, os aspectos morfológicos associados à expressão imunoistoquímica encontrada, foi observado que a proliferação neoplásica apresentou uma tendência de diferenciação num padrão semelhante àquele

encontrado nos ductos excretores das glândulas salivares. Isso ficou mais evidente quando as ilhas neoplásicas dispersas no tumor tentavam a organização glandular e expressavam as CKs utilizadas. A organização celular, a partir dos resultados verificados, demonstram, até certo ponto, que as células que expressaram as CKs 7 e 8, teriam um papel fundamental na proliferação tumoral.

Ainda que tenhamos um marcador específico para a diferenciação epidermóide, a forte marcação das CKs 7 e 8 encontrada neste estudo, trás indagações à respeito da origem dos CEABs, e do seu comportamento. A expressão das CKs 7 e 8 é predominantemente em células epiteliais de origem glandular (ARAÚJO; SOUZA, 1996; LOYOLA et al., 1998; SOUZA, 1994), sendo assim, a proximidade dessas células com o início da proliferação neoplásica de um carcinoma epidermóide, onde estaria localizada uma transição epitelial, poderia induzir a aquisição de uma arquitetura adenóide para essa proliferação, o que justificaria o padrão histológico encontrado. A célula tumoral, sendo de um epitélio de transição composto por células epidermóides e células ductais, poderia gerar inúmeras outras, com potencial para expressar citoqueratinas que normalmente são expressas somente nos componentes ductais de glândula salivar. Admitindo uma relação histogenética do Carcinoma epidermóide com o ducto excretório, através de uma transição epitelial, é possível que exista um filamento de queratina precursor comum, o que justificaria a presença das CKs estudadas na proliferação epidermóide.

7 CONCLUSÃO

Estudada a expressão imunoistoquímica das Citoqueratinas 7 e 8 em Carcinomas epidermóides localizados no assoalho bucal, pode-se concluir que:

Houve uma intensa marcação celular das CKs estudadas.

Os resultados encontrados indicam a participação do epitélio de transição entre os ductos excretores das glândulas salivares e a mucosa bucal de revestimento, na gênese dos carcinomas epidermóides nessa localização.

REFERÊNCIAS¹

Aguiar Junior FCA, Kowalski LP, Almeida OP. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. *Oral Oncol* 2007;43(6):593-601.

Al-Azzawi IM, Al-Talabani NG, Al-Salihi AR. DNA histochemical analysis in oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biol* 2006;51(1):64-8.

Almeida-Jr HL. Cytokeratins. *An Bras Dermatol* 2004;79(2):135-45.

Altemani A, Martins MT, Freitas L, Soares F, Araújo NS, Araújo VC. Carcinoma ex pleomorphic adenoma (CXPA): immunoprofile of the cells involved in carcinomatous progression. *Histopathology* 2005;46(6):635-41.

Amaral TMP, Freire ARS, Carvalho AL, Pinto ALP, Kowalski LP. Predictive factors of occult metastasis and prognosis of clinical stages I and II squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Oral Oncol* 2004;40:780-6.

Anneroth G, Batsakis JG, Luna M. Malignancy grading of Squamous cell carcinoma in the floor of the mouth related to clinical evaluation. *Scand J Dent Res* 1986;94:347-58.

Araújo VC; Souza SOM. Expression of different keratins in salivary gland tumours. *Eur J Câncer B Oral Oncol* 1996;33B(1):14-8.

Banerjee AG, Bhattacharyya I, Vishwanatha JK. Identification of genes and molecular pathways involved in the progression of premalignant oral epithelia. *Mol Cancer Ther* 2005;4:865-75.

Boyd NM, Reade PC. Mechanisms of carcinogenesis with particular reference to the oral mucosa. *J Oral Pathol* 1988;17(5):193-201.

¹ De acordo com estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Brugere JM, Mosseri VF, Mamelie G, David J.M, Buisset E, Vallicioni J. Nodal failures in patients with N0 N+ oral squamous cell carcinoma with capsular rupture. *Head Neck* 1996;18:133-7.

Byers RM, White D, Yue A. Squamous carcinoma of the oral cavity: choice of therapy. *Yearbook Oncol* 1981;6:1-27.

Cardoso SV. Estudo da expressão imunoistoquímica da metalotioneína em carcinoma epidermóide bucal [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte: Faculdade de Odontologia da UFMG; 2001.

Caseltz J, Osborn M, Wustrow J, Seifert G, Weber K. The expression of different intermediate-sized filaments in human salivary glands and their tumours. *Pathol Res Pract* 1982;175(2-3):266-78.

Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms *Histopathology* 2002;40:403-39.

Cooper D, Schermer A, Sun TT. Classification of human epithelia and their neoplasms using monoclonal antibodies to keratins: strategies, applications and limitations. *Lab Invest* 1985;52(3):243-56.

Cooper JS, Fu K, Marks J, Silverman S. Late effects of radiation therapy in the head and neck region. *Int J Radioat Oncol Biol Phys* 1995;31(5):1141-64.

Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins: patologia estrutural e funcional. 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2000.

Crivelini MM. Carcinoma de células acinares de glândulas salivares menores: estudo clínico, histológico e imunohistoquímico [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1994.

Crivelini MM, Araújo VC, Sousa SOM, Araújo NS. Cytokeratins in epithelia of odontogenic neoplasms. *Oral Dis* 2003;9:1-6.

Crowe DL, Milo GE, Shuler CF. Keratin 19 Downregulation by Oral Squamous Cell Carcinoma Lines Increases Invasive Potential. *J Dent Res* 1999;78(6):1256-63.

Curi MM, Dib LL. Osteoradionecrosis of the jaws: Retrospective Study of the Background Factors and Treatment in 104 cases. J Oral Maxillofac Surg 1997;55:540-4.

Da Silva JV. Expressão de citoqueratinas em Carcinoma epidermóides bucais [Tese Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1999.

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

De Ferraris MEG, Muñoz AC. Histologia e embriologia bucodental. 2 Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2006.

De Vicente JC, Recio OR, Pendas SL, Lopez-Arranz JS. Oral squamous cell carcinoma of the mandibular region: a survival study. Head Neck 2001;23:536-43.

Dias FL, Lima RA, Farias AS, Kligerman JTP, Manfro G, Sá GM. Relevance of skip metastases for squamous cell carcinoma of the oral tongue and the floor of the mouth. Otolaryngol Head Neck Surg 2006;134:460-5.

Eversole LR. Histogenic classification of salivary tumors. Arch Pathol 1971;92:433-43.

Eversole LR. Clinical outline of Oral Pathology: diagnosis and treatment. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Fabiger; 1984.

Faria PR, Cardoso SV, Loyola AM. Carcinoma epidermóide bucal: perfil diagnóstico dos serviços médicos e odontológicos (UFU-MG). Arq Odontol FOUFG 1999;35(supl):43.

Farrell T, Chang YL. Basal cell adenocarcinoma of minor salivary glands. Arch Pathol Lab Med 2007;131(10):1602-604.

Figueiredo CRLV. Estudo imuno-histoquímico do carcinoma adenóide cístico [Tese Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1995.

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

Fillies T, Jogschies M, Kleinheinz J, Brandt B, Joos U, Buerger H. Cytokeratin alteration in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2007;18(3):639-43.

Foschini MP, Marucci G, Eusebi V. Low-grade mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: characteristic immunohistochemical profile and evidence of striated duct differentiation. *Virchows Arch* 2002;440:536–42.

Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Muñoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: ethiological clues. *Oral Oncol* 2000;36:106-15.

Geneser F. *Histologia*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2003.

Goodger NM, Gannon J, Hunt T, Morgan PR. Cell cycle regulatory proteins-an overview with relevance to oral cancer. *Oral Oncol* 1997;33(2):61-73.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. *CA Cancer J Clin* 2001;51:15-36.

Guirado F, Martins MT, Araújo VC. Padrão de Citoqueratinas na mucosa bucal normal. *RPG* 1998;5(4):309.

Guo CB, Li YA, Gao Y. Immunohistochemical staining with cytokeratin combining semi-serial sections for detection of cervical lymph node metastases of oral squamous cell carcinoma. *Auris Nasus Larynx* 2007;34(3):347-51.

Gustafsson H, Kjorell U, Eriksson A, Virtanen I, Thornell LE. Distribution of intermediate filament proteins in developing and adult salivary glands in man. *Anat Embryol* 1988;178:243-51.

Heatley MK. Cytokeratins and citokeratin staining in diagnostic histopathology. *Histopathology* 1996;28(5):479-83.

Helfand BT, Chang L, Goldman RD. Intermediate filaments are dynamic and motile elements of cellular architecture. *J Cell Sci* 2004;117:133-41.

Hendrix MJ, Seftor EA, Chu YW, Seftor RE, Nagle RB, McDaniel KM. Coexpression of vimentin and keratins by human melanoma tumor cells: correlation with invasive and metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:165-74.

Hicks Jr WR, Loree TR, Garcia RI, Maamoun S, Marchall D, Orner JB, et al. Squamous cell carcinoma of the floor of mouth: a 20-year review. *Head Neck* 1997;19:400-5.

Hindle I, Downer MC, Moles DR, Speight PM. Is alcohol responsible for more intra-oral cancer ? *Oral Oncol* 2000;36:328-33.

Hirota SK, Modolo F, Albuquerque MAP, Lehn N, Sugaya NN, Souza SOM, et al. Recurring acinic cell carcinoma of the buccal mucosa: a case report. *Quintessence Int* 2007;38(4):289-94.

Hossfeld DK, Sherman CD, Love RR. Manual de oncologia clínica 2^a. Edição Brasileira. Berlin: Springer-Verlag; 1990.

Hu L, Crowe DL, Rheinwald JG, Chambon P, Gudas LJ. Abnormal expression of retinoic acid receptors and keratin 19 by human oral and epidermal squamous cell carcinoma lines. *Cancer Res* 1991;51:3972-81.

Ildstad ST, Bigelow ME, Remensnyder JP. Clinical behavior and results of current therapeutic modalities for SCC of the buccal mucosa. *Surg Gynecol Obstet* 1985;160:254-58.

INCA. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2000a [documento eletrônico]. Ministério da Saúde [citado em 10 de agosto de 2004]. Disponível na internet <http://www.inca.org.br/epidemiologia/estimativa2000/brasil.html>.

INCA. Registro Hospitalar de Câncer: dados das unidades hospitalares do INCA – Relatório anual 1993. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2000b. p. 63-67.

INCA. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2007 [documento eletrônico]. Ministério da Saúde [citado em 6 de abril de 2008]. Disponível na internet <http://www.inca.gov.br/Estimativa/2008/>

Jin Y, Martins C, Jin C, Salemark L, Jonsson N, Persson B, et al. Nonrandom karyotypic features in squamous cell carcinomas of the skin. *Genes Chromosomes. Cancer* 1999;26(4):295-303.

Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2004.

Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2004.

Kim MA, Lee HS, Yang HK, Kim WH. Cytokeratin expression profile in gastric carcinomas. *Human Pathol* 2004;35(5):576-81.

Kirfela J, Maginb TM, Reicheltb J. Keratins: a structural scaffold with emerging functions. *Cell Mol Life Sci* 2003;60:56-71.

Kraunz KS, McClean MD, Nelson HH, Peters E, Calderon H, Kelsey KT. Duration but not intensity of alcohol and tobacco exposure predicts p16INK4A homozygous deletion in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 2006;66:4512-5.

Leemaus CR, Rammohan T, Nanta J. Discontinuous vs. continuity in neck dissection in carcinoma of the oral cavity. *Arch Otol* 1991;117:1003-6.

Lima YV, Kimb JW, Kook YW, Kima K, Kima HJ, Kima KM, et al. Perivascular–submandibular lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth. *EJSO* 2004;30:692-8.

Lindberg R. Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 1972;29:1446-9.

Loyola AM, De Souza SO, Araujo NS, Araujo VC. Study of minor salivary gland mucoepidermoid carcinoma differentiation based on imunohistochemical expression of cytokeratins, vimentin and muscle-specific actin. *Oral Oncol* 1998;34:112-8.

Martins MD, Araujo VC, Raitz R, Araujo NS. Expression of cytoskeletal proteins in developing human minor salivary glands. *Eur J Oral Sci* 2002;110:316-21.

Mashberg A. Diagnosis of early oral oropharyngeal squamous carcinoma: obstacles and their amelioration. *Oral Oncol* 2000;36:253-5.

Matsuzaki K, Shima K, Muramatsu T, Ro Y, Hashimoto S, Shibahara T, et al. Osteopontin as biomarker in early invasion by Squamous cell carcinoma in tongue. J Oral Pathol Med 2007;36:30-4.

McGuirt Jr WF, Johnson JT, Myers EN, Rothfield R, Wagner RBSN. Floor of mouth carcinoma: The management of the clinically negative neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg 1995;121:278-82.

Medeiros KB, Lins RDAU, Godoy GP, Silveira EJD, Queiroz G. Histomorfological and immunohistochemical evaluation of cytokeratin intermediate filaments in chronic gingivitis. Cienc Odontol Bras 2004;7(4):67-73.

Meer S, Aaltini M. CK7/CK20 - immunoexpression profile is typical of salivary gland neoplasia. histopathology 2007;51(1):26-32.

Miettinen M. Keratin immunohistochemistry: update on applications and pitfalls. Pathol Annu 1993;8:113-43.

Mineta H, Borg A, Dictor M, Wahlberg P, Wennerberg J. Correlation between p53 mutation and cyclin D1 amplification in had and neck squamous cell carcinoma. Oral Oncol 1997;33(1):42-6.

Moll R, Franke WW, Schiuller DL. The catalog of human cytokeratins: patyerns of expression in normal epithelia, tumors ans culture cell. Cell 1982;31:11-24.

Moll R, Schiller DL, Werner WF. Identification of protein IT of the intestinal cytoskeleton as a novel type I cytokeratin with unusual properties and expression patterns. J Cell Biol 1990;111:567-80.

Moll R, Lowe A, Laufer J, Frankie WW. Cytokeratin 20 in human carcinoma. A new histodiagnostic marker detected by monoclonal antibodies. AM J Pathol 1992;140(2):427-47.

Moll R. Cytokeratins in the histological diagnosis of malignant tumors. Int J Biol Markers 1994;9(2):63-9.

Morgan PR, Shirlaw PJ, Johnson NW, Leigh IM, Lane ED. Potential applications of anti-keratin antibodies in oral diagnosis. J Oral Pathol 1987;16(4):212-22.

Nagle RB, McDaniel KM, Clark VA, Payne CM. The use of antikeratin antibodies in the diagnosis of human neoplasms. *Am J Clin Pathol* 1983;79:458-66.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquout J. *Patologia oral & maxillofacial*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2004.

Nikitakis NG, Tosios KI, Papanikolaou VS, Rivera H, Papanicolaou SI, Ioffe OB. Immunohistochemical expression of cytokeratins 7 and 20 in malignant salivary gland tumors. *Mod Pathol* 2004;17:407-15.

Ogden GR, Chisholm MD, Adi M, Lane EB. Cytokeratin expression in oral cancer and its relationship to tumor differentiation. *J Oral Pathol Med* 1993;22(2):82-6.

Ogden GR, Wight AJ. Aetiology of oral cancer: alcohol. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1998;36:247-51.

Okamoto M, Nishimine M, Kishi M, Kirita T, Sugimura M, Nakamura M. Prediction of delayed neck metastasis in patients with stage I/II squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Pathol Med* 2002;31:227-33.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;80(6):827-41.

Parisi Junior O. *Cancer de boca – aspectos básicos e terapêuticos*. 1ª ed. São Paulo: Editora Sarvier; 2000.

Pinto Junior DS. Critérios de avaliação do prognóstico – tipo histológico, marcadores imunoistoquímicos – em biópsias de carcinoma epidermóide de boca [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1991.

Prince S, Bailey BMW. Squamous carcinoma of the tongue: review. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999;37:164-74.

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

Ramaekers FC, Huysmans A, Moesker O. Monoclonal antibody to keratin filaments, specific for glandular epithelia and their tumors. *Lab Invest* 1983;49:353-61.

Regauer S, Beham A, Mannweiler S. CK7 expression in carcinomas of the Waldeyer's ring area. *Hum Pathol* 2000 Sep;31(9):1096-101.

Rossi MD, Marchioni AM, Milani M, Scotti R, Foroni M; Cesmar A, et al. TTF-1, Cytokeratin 7, 34BE12, and CD56/NCAM immunostaining in the subclassification of large cell carcinomas of the lung. *Am J Clin Pathol* 2004;122:884-93.

Salomão, C. Fatores de prognóstico no carcinoma epidermóide bucal [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2003.

Sapp JP, Eversole LR, Wysocki GP. *Patologia oral y maxilofacial contemporánea*. 1ª ed. Madrid: Harcourt Brace; 1998.

Sawaf MH, Ohayoun JP, Forest N. Cytokeratin profiles in oral epithelia: a review and a new classification. *J Biol Buccale* 1991;19(3):187-98.

Scully C, Porter S. Oral cancer. *West J Med* 2001;174:348-51.

Shah JP, Andersen PE. Evolving role of modifications in neck dissection for oral squamous carcinoma. *Br J Oral and Maxillofac Surg*. 1995;33:3-8.

Shah JP, Candela FC, Podar AK. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1990;66:109-13.

Silveira EJD, Godoy GP, Lins RD, Arruda ML, Ramos CC, Freitas RA, et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol* 2007;15(4):376-83.

Skalli O, Chou Y-H, Goldman RD. Intermediate filaments: not so tough after all. *Trends Cell Biol* 1992;2(10):308-12.

Sobral APV, Loducca SVL, Kowalski LP, Santos IRB, Almeida OP, Araujo NS, et al. Immunohistochemical distinction of high-grade mucoepidermoid carcinoma and epidermoid carcinoma of the parotid region. *Oral Oncol* 2002;38:437-40.

Souza SOM. Expressão da citoqueratina em neoplasias de glândula salivar [Tese - Livre Docência]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1994.

Souza SOM, Mantesso A, Araujo NS, Araujo VC. Inverted ductal papiloma of minor salivary gland. Morphological aspects and citokeratins expression. *Eur Arch Othorin*. 1995;252(6):370-3.

Souza SOM, Araujo NS, Corrêa L, Soubhia AMP, Araújo VC. Immunohistochemical aspectos of basal cell adenoma and canalicular adenoma of salivary glands. *Oral Oncol* 2001;37:365-8.

Squier CA. The permeability of oral mucosa. *Crit Rev Oral Biol and Med* 1991;2(1):13-32.

Steinert PM. Structure, function, and dynamics of keratin intermediate filaments. *J Invest Dermatol* 1993;100(6):729-34.

Steinert PM, Marekov LN, Parry DAD. Diversity of Intermediate Filament Structure. *J Biol Chem* 1993;268(33):24916-25.

Steinert PM, Marekov LN, Fraser RDB, Parry DAD. Keratin intermediate filament structure. *J Mol Biol* 1993;230:436-52.

Steinert PM, North AC, Parry DA. Structural features of keratin intermediate filaments. *J Invest Dermatol* 1994;103(5 Suppl):19S-24S.

Strome SE, To W, Strawderman M, Gersten K, Devaney KO, Bradford CR, et al. Squamous cell carcinoma of the buccal mucosa. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;120:375-9.

Su L, Morgan P, Harrison DL, Waseem A, Lanes B. Expression of keratin mRNAs and proteins in normal salivary epithelia and pleomorphic adenomas. *J Pathol* 1993;171:173-81.

Sun TT, Skelton HG, Green H. Keratin cytoskeletons in epithelial cells of internal organs. *Proc Nat Acad Sci USA* 1979;76:2813-7.

Teichgraeber FJ, Clairmont AA. The incidence of occult metastasis for cancer of the oral tongue and floor of mouth: treatment rationale. *Head Neck Surg* 1984;7:15-21.

Thompson EW, Paik S, Brunner N, Sommers CL, Zugmaier G, Clarke R. Association of increased basement membrane invasiveness with absence of estrogen receptor and expression of vimentin in human breast cancer cell lines. *J Cell Physiol* 1992;150:534-44.

Thorn JJ, Hansen HS, Specht L, Bastholt L. Osteoradionecrosis of the jaws: clinical characteristics and relation to the field of irradiation. *J Oral Maxillofac Surg* 2000;58(10):1088-93.

Trask DK, Band V, Zajchowski DA, Yaswen P, Suh T, Sager R. Keratins as markers that distinguish normal and tumor derived mammary epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci* 1990;87:2319-23.

Tsuneyama K, Ssaki M, Shimonishi T, Nakanuma Y. Expression of MAGE-A3 in intrahepatic cholangiocarcinoma and its precursor lesions. *Pathol Int* 2004;54:181-6.

Turner SL, Slevin NJ, Gupta NK, Swindell R. Radical external beam radiotherapy for 333 squamous carcinomas of the oral cavity – evaluation of late morbidity and a watch policy for the clinically negative neck. *Rad Oncol* 1996;41:21-9.

Upsani OS, Vaidya MM, Bhisjey AN. Database on monoclonal antibodies to cytokeratins. *Oral Oncol* 2004;40:236-56.

Warnakulasuriya KA, Johnson NW. Dentists and oral cancer prevention in the UK: opinions, attitudes and practices to screening for mucosal lesions and to counselling patients on tobacco and alcohol use: baseline data from 1991. *Oral Dis* 1999;5(1):10-4.

Wong JK, Wood, RE, McLean M. Conservative management of osteoradionecrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1997;84(1):16-21.

Wu F, Nishioka M, Fujita J, Murota M, Ohtsuki Y, Ishida T, et al. Expression of cytokeratin 19 in human hepatocellular carcinoma cell lines. *Int J Oncol* 2002;20:31-7.

Wu YJ, Rheinwald JG. A new small (40 kDa) keratin filament protein made by some cultured human squamous cell carcinomas. *Cell* 1981;25:627-35.

Young MRI, Neville BW, Chi AC, Lathers DMR, Gilliespie MB, Day TA. Oral premalignant lesions induce immune reactivity to both premalignant oral lesions and head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Immunol Immunother* 2007;56(7):1077-86.

Zelevsky M, Harrison L, Fass D. Post operative radiation therapy for squamous cell carcinoma of the oral cavity and oral pharynx: impact of therapy on patients with positive surgical margins. *Int J Rad Biol Phys* 1992;25:17-21.

Zhong LP, Zhao SF, Chen GF, Ping FY, Xu ZF, Hu JA. Increased levels of CK19 mRNA in oral squamous cell carcinoma tissue detected by relative quantification with real-time polymerase chain reaction. *Arch Oral Biol* 2006;51(12):1112-9.

Zupi A, Califano L, Mangone GM, Longo F, Piombino P. Surgical management of the neck in squamous cell carcinoma of the floor of the mouth. *Oral Oncol* 1998;34:472-5.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética da FOU SP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

2ª. VIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 46/06

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "Expressão imunoistoquímica das citoqueratinas 7 e 19 em carcinomas epidermóides de assoalho de boca", de responsabilidade do Pesquisador **Sérgio Elias Vieira Cury**, sob orientação do Professor **Doutor Décio dos Santos Pinto Júnior**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 27 de maio de 2008.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

ANEXO B – Adendo ao Parecer do Comitê de Ética da FOUSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

**DECLARAÇÃO
PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 46/06**

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente a alteração de um dos anticorpos inicialmente utilizado (CK19), por não ter respondido satisfatoriamente aos testes realizados, sendo substituído pela citoqueratina 8 e dessa forma, o projeto mudou sua denominação para: **"Expressão imunoistoquímica das citoqueratinas 7 e 8 em carcinomas epidermóides de assoalho bucal"** de responsabilidade do Pesquisador **Sérgio Elias Vieira Cury**, sob orientação do Professor Doutor **Décio dos Santos Pinto Júnior**.

São Paulo, 27 de maio de 2008

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP