

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Mário José Romãach Gonzalez Sobrinho

Cirurgião-Dentista

**CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS E
IMUNOHISTOQUÍMICAS DO CARCINOMA DE CÉLULAS
FUSIFORMES DE CABEÇA E PESCOÇO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em Estomatopatologia na área de Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Ramôa Pires

PIRACICABA

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

G589c	<p>Gonzalez Sobrinho, Mário José Romañach. Características clinicopatológicas e imunohistoquímicas do carcinoma de células fusiformes de cabeça e pescoço. / Mário José Romañach Gonzalez Sobrinho. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.</p> <p>Orientador: Fábio Ramôa Pires. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Carcinoma de células escamosas. 2. Imunohistoquímica. I. Pires, Fábio Ramôa. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.</p> <p>(mg/fop)</p>
-------	--

Título em Inglês: Clinicopathological and immunohistochemical features of spindle cell carcinoma of the head and neck

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Carcinoma, squamous cell. 2. Immunohistochemistry

Área de Concentração: Estomatologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Fábio Ramôa Pires, Danyel Elias da Cruz Perez, Pablo Agustin Vargas

Data da Defesa: 29-02-2008

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 29 de Fevereiro de 2008, considerou o candidato MARIO JOSÉ ROMANACH GONZALEZ SOBRINHO aprovado.

A handwritten signature in blue ink, reading "Fábio Ramôa Pires".

PROF. DR. FÁBIO RAMÔA PIRES

A handwritten signature in blue ink, reading "Danyel Elias da Cruz Perez".

PROF. DR. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ

A handwritten signature in blue ink, reading "Pablo Agustin Vargas".

PROF. DR. PABLO AGUSTIN VARGAS

DEDICATÓRIA

Ao meu pai **Rubens Raymundo Júnior**, o exemplo da minha vida. Sempre respeitou minhas escolhas, acreditou em mim e esteve ao meu lado. Me trouxe à Piracicaba e me ensinou que nossos sonhos são muito maiores que nós mesmos. Obrigado por tudo. Eu te amo.

À minha mãe **Márcia Angélica Romãach**, minha adoração de vida e minha maior saudade em Piracicaba.

À **Michelle Agostini**, minha companheira de todas as horas e pessoa maravilhosa. Com todo meu amor, muito obrigado.

Ao **Prof. Fábio Ramôa Pires** serei eternamente grato pela minha primeira oportunidade de conhecer um laboratório de Patologia Oral no Rio de Janeiro e pela orientação exemplar no mestrado.

Ao **Prof. Oslei Paes de Almeida**, agradeço o carinho, o exemplo e as oportunidades que eu tive em Piracicaba.

AGRADECIMENTOS

Esta dissertação foi realizada com o apoio de algumas pessoas e instituições, dentre as quais gostaria de agradecer:

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**.

Ao **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Aos **Profs. Drs. Oslei Paes de Almeida, Edgard Graner, Ricardo Della Coletta, Márcio Ajudarte Lopes, Pablo Agustin Vargas, Jacks Jorge Júnior e Oswaldo Di Hipólito Júnior**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, por todos os ensinamentos transmitidos.

Ao **Prof. Román Carlos**, pelo fornecimento de parte dos casos deste estudo e pelo grande exemplo de esforço e dedicação através do seu trabalho desenvolvido na Guatemala.

Ao patologista **Paulo Saiki**, uma das referências em Patologia e Citologia em Piracicaba. Seu laboratório particular forneceu um dos casos deste estudo aos arquivos da Área de Patologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pela concessão da bolsa de mestrado.

Aos **Profs. Renato Kobler Pinto Lopes Sampaio e Fernando Lima Abrantes**, meus primeiros professores de Patologia e Histologia, respectivamente.

À **Profª Sandra Torres** pelo incentivo, carinho e amizade.

Aos colegas do Mestrado **Adrielle, Carolina e Maria Fernanda** pelos bons momentos vividos durante o curso e em especial ao **Alan** e ao **Luiz**, pela excelente rotina e pelo inesquecível aprendizado.

Ao **Jorge** pela amizade e pelo exemplo.

Aos colegas da pós-graduação em Estomatopatologia, **Ana Lúcia, Andréia, Lucielma, Eduardo, Ademar, Lília, Patrícia, Laís, Michele, Marco, Débora, Fabiana, Fernanda, Ana Terezinha, Lívia, Víctor, Guillermo** e em especial à **Rebeca** pela amizade, convivência e colaboração neste trabalho.

Às funcionárias **Aparecida e Débora** e aos dentistas **Rogério, Valéria e Ângela** pelos ótimos momentos compartilhados no Orocentro e à dentista **Christiane** pelo trabalho em equipe no CEO em Rio Claro.

Aos funcionários do laboratório de Patologia, **Valéria Alessandra Prado Defávani Franco, Adriano Luís Martins, João Carlos Gomes da Silva Júnior** e em especial à **Ana Cristina do Amaral Godoy** pela realização das reações imunohistoquímicas deste trabalho e por toda a ajuda.

Por fim, a todos aqueles que contribuíram de alguma forma com a realização desta etapa em minha vida.

EPÍGRAFE

“Não há nada em uma lagarta que diga que ela se tornará uma borboleta.”

Richard Fuller (1895-1983)

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) é a neoplasia maligna mais comum da boca, possuindo diversas variantes clinicopatológicas incomuns, incluindo o carcinoma de células fusiformes (CCF), que diferem quanto ao comportamento clínico, critérios diagnósticos e prognóstico. Os objetivos deste estudo foram analisar a expressão imunohistoquímica de marcadores epiteliais no CCF de cabeça e pescoço, avaliando sua importância diagnóstica, comparar os achados histopatológicos e imunohistoquímicos do CCF de cabeça e pescoço com os CECs convencionais da cavidade oral e definir um perfil sócio-demográfico e clinicopatológico do CCF oral. Para isso, foram analisados ao todo 20 casos de CECs: 10 casos de CCF, e 10 casos de CECs orais convencionais como controle, sendo 5 casos de CECs bem diferenciados e 5 casos de CECs pouco diferenciados. A metodologia incluiu avaliação de todos os casos em microscopia óptica em cortes corados em hematoxilina e eosina e reações imunohistoquímicas para anticorpos contra citoqueratinas, vimentina, desmina, actina músculo-específica, actina de músculo liso, proteína S100, EMA, p53 e ki-67, usando a técnica da peroxidase. Os achados morfológicos dos CCFs estudados mostraram maior proximidade entre estes tumores e os CECs pouco diferenciados e a expressão imunohistoquímica das citoqueratinas AE1/AE3, 6, 8 e 14 e de EMA nos componentes carcinomatoso e fusocelular do CCF mostrou-se útil como auxiliar em seu diagnóstico final. Ainda, os CCFs apresentaram índices de expressão de p53 e de Ki-67 superiores àqueles encontrados nos CECs bem diferenciados. O CCF oral apresentou predileção por homens na 6ª década de vida, manifestando-se através de úlceras infiltrativas ou lesões polipóides ulceradas, usualmente dolorosas, localizadas preferencialmente no rebordo alveolar e lábios.

Palavras-chave: carcinoma espinocelular, carcinoma de células fusiformes, oral, critérios diagnósticos, imunohistoquímica, citoqueratinas, EMA, p53, ki-67.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common malignant oral tumor and several uncommon clinicopathological variants, including spindle cell carcinoma (SpCC), which differ on clinical behaviour, diagnostic criteria and prognosis, have been described. The aims of this study were to analyze the immunohistochemical expression of epithelial markers on head and neck SpCC, evaluating their diagnostic relevance, to compare the histopathological and immunohistochemical features of head and neck SpCC and conventional oral SCC, and to define a socio-demographic and clinicopathological profile of oral SpCC. Material included a total of 20 cases, including 10 cases of head and neck SpCC, and 10 cases of oral SCC used as controls (5 well-differentiated SCC and 5 poorly-differentiated SCC). Methods included evaluation of hematoxylin and eosin-stained histological slides from all cases through optic microscopy and immunohistochemical reactions for antibodies against cytokeratins, vimentin, desmin, smooth-muscle actin, muscle-specific actin, S-100 protein, EMA, p53 and ki-67, using the peroxidase technique. Morphological features of SpCC showed similarities to the features from poorly differentiated SCC and immunohistochemical expression of the cytokeratins AE1/AE3, 6, 8 and 14, and EMA on both carcinomatous and spindle cell components of the tumor, proved to be useful as an auxiliary tool on final diagnosis. In addition, SpCC presented higher p53 and ki-67 expression indexes when compared to well-differentiated SCC. Oral SpCC showed predilection for males on their 6th decade of life, presenting clinically either as painful infiltrative ulcers or ulcerated exophytic polypoid masses, preferally located on the alveolar mucosa and lips.

Key words: squamous cell carcinoma, spindle cell carcinoma, oral, diagnostic criteria, immunohistochemistry, cytokeratins, EMA, p53, ki-67.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Carcinoma espinocelular oral (CECO)	2
2.2 Carcinoma de células fusiformes (CCF)	4
2.3 Marcadores imunohistoquímicos	15
2.3.1 Citoqueratinas	15
2.3.2 Proteína p53	19
2.3.3 Antígeno Ki-67	19
2.3.4 Antígeno epitelial de membrana (EMA)	20
2.4 Expressão imunohistoquímica de citoqueratinas, p53, Ki-67 e EMA no CECO e no CCF	20
2.4.1 Citoqueratinas	20
2.4.2 Proteína p53, antígeno Ki-67 e EMA	23
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Seleção da amostra	26
4.2 Análise histopatológica	26
4.3 Análise imunohistoquímica	28
5 RESULTADOS	32
5.1 Características sócio-demográficas e clínicas	32
5.2 Características histopatológicas	35
5.3 Características imunohistoquímicas	41
6 DISCUSSÃO	49
7 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO	72

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) é a neoplasia maligna mais comum da boca e acomete predominantemente adultos na quinta e sexta décadas de vida que são usuários de álcool e tabaco. Histopatologicamente se caracteriza pela presença de uma proliferação de células derivadas da camada espinhosa do epitélio de revestimento da cavidade oral, apresentando crescimento invasivo, pleomorfismo celular, mitoses atípicas e diferentes graus de diferenciação escamosa (Johnson *et al.*, 2005). O carcinoma espinocelular oral (CECO) apresenta variantes clinicopatológicas que diferem quanto aos critérios diagnósticos e curso clínico, incluindo CEC verrucoso, CEC basalóide, CEC papilar, Carcinoma de células fusiformes, CEC acantolítico, Carcinoma adenoescamoso e Carcinoma *cuniculatum*. Além disso, suas peculiaridades microscópicas são essenciais para seu correto diagnóstico e para sua gradação histológica, assim como na determinação de seu tratamento e prognóstico (Cotrim *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007). O carcinoma de células fusiformes (CCF) é uma variante rara do CECO que apresenta comportamento mais agressivo e menores índices de sobrevida (Su *et al.*, 2006). Histopatologicamente, o CCF é constituído por um componente de células fusiformes displásicas associado a um componente carcinomatoso que por vezes pode representar um desafio diagnóstico. Embora esta lesão seja considerada a neoplasia de células fusiformes mais freqüente da região de cabeça e pescoço, seu diagnóstico diferencial deve contemplar outros tumores de células fusiformes desta região tais como as proliferações de células fusiformes benignas ou reativas (como a fasciíte nodular e o tumor miofibroblástico inflamatório), sarcoma miofibroblástico de baixo-grau, histiocitoma fibroso maligno pleomorfo, leiomiossarcoma, fibrossarcoma, tumor maligno da bainha do nervo periférico, melanoma de células fusiformes, carcinossarcoma, carcinoma mioepitelial e, especialmente o sarcoma sinovial (Takata *et al.* 1991; Wenig & Pilch, 2000; Jordan & Regezi, 2003; Cardesa & Zidar, 2005). Até os dias atuais, foram relatados

aproximadamente apenas 150 casos de CCF na cavidade oral, e somente a metade destes casos apresentou confirmação imunohistoquímica da natureza epitelial das células fusiformes displásicas. O objetivo deste estudo é comparar as características clínicas, histopatológicas e imunohistoquímicas do CCF da cavidade oral com os CECOs orais na tentativa de reforçar seus critérios diagnósticos e descrever seu perfil imunohistoquímico, assim como sua utilidade diagnóstica.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma espinocelular oral (CECO)

O carcinoma espinocelular (CEC) é a neoplasia maligna mais comum da boca. O carcinoma espinocelular oral (CECO) é uma neoplasia epitelial invasiva que acomete predominantemente adultos a partir da quinta década de vida. O uso do tabaco, especialmente quando associado ao consumo abusivo de álcool, constitui o fator de risco dominante para o desenvolvimento do CECO, mas estudos recentes sugerem que uma fração dos CECOs esteja associada à infecção pelo HPV, principalmente os subtipos 16 e 18. A localização intra-oral mais freqüente do CECO é borda lateral de língua, seguida do assoalho oral e da área abrangendo o palato mole/pilar anterior das tonsilas/área retromolar. Considera-se que o CECO tenha origem no epitélio de revestimento com aparência clínica normal ou a partir de lesões precursoras – leucoplasias, eritropias e leucoeritropias – sendo a prevalência destas últimas sujeita à variação geográfica. Seu aspecto clínico pode ser variável, mas sua apresentação mais comum é na forma de lesões ulceradas com bordas elevadas e centro necrótico, infiltrando os tecidos adjacentes (Johnson *et al.*, 2005).

As principais características histopatológicas do CECO incluem: (1) crescimento invasivo que é manifestado pela perda da definição da interface entre

o epitélio oral e o tecido conjuntivo subjacente, com perda da membrana basal e substituição das células da camada basal do epitélio por células grandes, irregulares, com processos citoplasmáticos estendendo-se ao tecido conjuntivo e presença de reação do estroma; (2) pleomorfismo celular variável e mitoses atípicas; (3) diferenciação escamosa que é evidenciada através da formação de pérolas de queratina, especialmente em tumores de baixo grau de malignidade; e (4) presença variável de invasão angiolinfática e perineural, consideradas sinais adicionais de malignidade (Anneroth *et al.*, 1987; Bryne, 1998; Cardesa *et al.*, 2005).

Histopatologicamente, o CECO pode ser classificado em graus de diferenciação, incluindo o CECO bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado (indiferenciado). Os critérios para sua distinção incluem especialmente a semelhança com o epitélio de origem, pleomorfismo celular, presença de mitoses atípicas, presença de necrose e formação de pérolas de queratina. A maioria dos CECOs é diagnosticada como moderadamente diferenciado, entretanto admite-se atualmente que a classificação quanto à diferenciação celular tem valor prognóstico limitado quando comparada ao padrão de invasão expansivo ou infiltrativo do tumor. O padrão de crescimento expansivo é caracterizado por grandes ilhas tumorais com margens bem definidas como se estivessem empurrando o tecido adjacente e está associado a um melhor prognóstico. O padrão de crescimento infiltrativo é caracterizado por pequenos cordões irregulares dispersos ou células tumorais únicas, com margens infiltrantes pobremente definidas e está associado com um curso clínico mais agressivo. CECO invasivo é quase sempre acompanhado por uma reação do estroma que consiste em desmoplasia com deposição de matriz extracelular, proliferação de miofibroblastos e neovascularização (Anneroth *et al.*, 1987; Bryne, 1998; Johnson *et al.*, 2005; Kellermann *et al.*, 2007).

O CECO apresenta variantes com características clinicopatológicas, critérios diagnósticos e cursos clínicos distintos do habitual, as quais são classificadas em sete diferentes entidades: Carcinoma verrucoso, CEC basalóide,

CEC papilar, Carcinoma de células fusiformes, CEC acantolítico, Carcinoma adenoescamoso e Carcinoma *cuniculatum*. Apesar desta classificação, poucos trabalhos na literatura têm avaliado isoladamente suas variantes, buscando definir adequadamente seus critérios diagnósticos específicos, comportamento biológico e prognóstico (Cotrim *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007).

2.2 Carcinoma de células fusiformes (CCF)

O carcinoma de células fusiformes (CCF) é uma neoplasia maligna rara, morfológicamente composta por dois tipos histológicos: um carcinoma espinocelular, tanto *in situ* quanto invasivo, e um componente de células fusiformes malignas com aparência mesenquimal, mas também de origem epitelial (Takata *et al.*, 1991; Cardesa & Zidar, 2005).

A etiologia do CCF está relacionada à associação do fumo e ao consumo de álcool, assim como exposição prévia à radiação (Cardesa & Zidar, 2005). Tem sido sugerido que o CCF pode ocorrer após radioterapia em um CEC incompletamente ressecado, representando uma progressão anaplásica de um tumor primário (Chuang & Crowe, 2007).

O CCF tem sido descrito em diferentes regiões do corpo humano, como esôfago, bexiga, timo, cérvix, próstata, pênis, cólon, pulmão, endométrio, pele, vesícula biliar, ânus, fígado, vagina, boca, sendo mais comum na laringe e hipofaringe e com predileção por homens tabagistas e etilistas na sétima década de vida (Ellis *et al.*, 1987; Wenig & Pilch, 2000; Cardesa & Zidar, 2005).

O perfil bimorfo desta lesão fez com que durante os últimos anos fossem utilizadas diferentes nomenclaturas para este tumor, como tumor de Lane, carcinossarcoma, pseudossarcoma, carcinoma pleomórfico, carcinoma sarcomatóide e carcinoma de células fusiformes, as quais refletem a dúvida na interpretação do componente sarcomatóide como sendo de natureza mesenquimal reacional ou epitelial neoplásica (Takata *et al.*, 1991; Yanamoto *et al.*, 2007).

Embora a natureza maligna a partir das células epiteliais seja a mais aceita atualmente, sua histogênese ainda permanece controversa. Muitos autores, baseados nos achados histopatológicos, ultraestruturais, imunohistoquímicos e, mais recentemente, nos estudos moleculares, concordam com a idéia da natureza epitelial do componente sarcomatóide, entretanto, esta visão ainda não é aceita de forma unânime e, como conseqüência, não existe um consenso de sua freqüência, de suas características clínicas, de seu prognóstico e do tratamento ideal a ser empregado (Lichtiger *et al.*, 1970; Battifora, 1976; Choi *et al.*, 2003; Rizzardi *et al.*, 2003; Chuang & Crowe, 2007).

O CCF envolvendo a cavidade oral é considerado uma entidade rara, e acomete predominantemente o lábio inferior, a língua e o rebordo alveolar de homens leucodermas com média etária de 50 anos. Apresenta-se principalmente como uma massa exofítica polipóide sintomática, embora também possa ter configuração nodular séssil e endofítica, em média com cerca de 2 cm em seu maior diâmetro, podendo ou não exibir superfície ulcerada, com ou sem centro necrótico. Curiosamente, as mulheres são acometidas em idade mais avançada (sétima década de vida), e as lesões de lábio geralmente possuem crescimento endofítico, enquanto que em outras áreas da cavidade oral apresentam crescimento exofítico. Alguns casos possuem história prévia de radioterapia, motivo pelo qual admite-se a possibilidade da radiação como fator etiológico adicional da condição (Ellis & Corio, 1980; Leventon & Evans, 1981; Munakata *et al.*, 1998; Jordan & Regezi, 2003).

Existe uma ampla variedade de aspectos microscópicos neste tumor e, histopatologicamente, o CCF é caracterizado pela presença de focos de carcinoma de células escamosas e de células fusiformes pleomórficas arranjadas aleatoriamente, suportados por um estroma escasso que varia de fibrilar a densamente colagenizado. O primeiro componente pode ser muito escasso ou limitado a áreas não invasivas de displasia epitelial ou carcinoma *in situ* localizado na superfície do tumor, e sua identificação requer grandes amostras do tecido para o exame histológico. Muitas vezes o epitélio pode estar ulcerado e por causa

disto o componente escamoso pode não ser visto, trazendo dificuldades ao preciso diagnóstico microscópico da condição (Slootweg & Richardson, 2001; Cardesa & Zidar, 2005).

O componente de células fusiformes do CCF é composto por grupos de células alongadas bipolares, que estão alinhadas em paralelo, e formam fascículos que se entrecruzam. O núcleo celular é elíptico, vesicular e contém um ou mais nucléolos. Um número variável de células redondas com citoplasma abundante e núcleo vesicular redondo pode estar disperso por entre as células alongadas. O tumor pode apresentar áreas mais hipocelulares com a presença de espaços intercelulares proeminentes e células mais pleomórficas e estreladas quando comparadas às áreas mais celulares. Células gigantes multinucleadas bizarras são um achado comum dentro dos fascículos de células fusiformes, assim como células inflamatórias agudas e crônicas em densidade variável. O componente displásico de células fusiformes pode exibir formação de osteóide em casos localizados na gengiva e rebordo alveolar (Ellis & Corio, 1980; Handra-Luca *et al.*, 2001).

Muitas vezes o CCF exibe acantólise. Os espaços que se formam são revestidos por células pleomórficas, simulando o angiossarcoma e alguns autores indicam o termo carcinoma pseudoangiossarcomatoso quando esta histomorfologia se faz presente. Tem sido mencionado que o CEC convencional algumas vezes contém áreas mixóides com células estromais alongadas exibindo núcleo vesicular, muitas vezes mostrando mitoses. Entretanto, essas células são dispersas em um cenário não neoplásico e não estão arranjadas concêntrica ou fascicularmente como no CCF, o que as identifica como parte de uma reação estromal. Além disso, fibroblastos estromais bem como células endoteliais podem exibir alterações atípicas, o que pode ajudar a distinguir o CEC com características estromais atípicas do CCF (Slootweg & Richardson, 2001).

Admite-se, portanto, que o diagnóstico do CCF requer a presença de um componente epitelial inequívoco, preferencialmente com a transição gradual entre este último e o componente de células fusiformes. Assim, se o diagnóstico

for feito com base na microscopia óptica convencional, CEC ou carcinoma *in situ* reconhecíveis ou, pelo menos, um epitélio pavimentoso estratificado intensamente atípico, devem ser identificados. Na ausência de um componente de CEC convencional histologicamente reconhecível, o diagnóstico definitivo requer a evidência imunohistoquímica e/ou ultraestrutural de diferenciação epitelial das células fusiformes pleomórficas (Wenig & Pilch, 2000; Yanamoto *et al.*, 2007).

Quinze trabalhos na literatura relataram aproximadamente 70 casos de CCF através do uso de marcadores imunohistoquímicos em associação aos achados morfológicos. Entretanto, a descrição detalhada do perfil imunohistoquímico de cada caso específico é encontrada apenas na minoria dos trabalhos dificultando a evidência da média de expressão de cada marcador nas células tumorais do CCF. Face à presença do componente fusocelular nestas lesões, a imunohistoquímica é auxiliar importante no diagnóstico do CCF e na sua diferenciação com neoplasias mesenquimais malignas. As células tumorais podem expressar tanto marcadores epiteliais quanto mesenquimais e, de uma maneira geral, observa-se um padrão de positividade do componente fusocelular para AE1/AE3 (o que contribui para a confirmação da natureza epitelial do mesmo), vimentina, pan-actina (HHF35) focalmente, bem como a negatividade para actina de músculo liso (AML), desmina (DESM) e proteína S-100 (Tabela 1). O componente de células escamosas apresenta positividade para AE1/AE3 e negatividade para vimentina, HHF35, actina de músculo liso, desmina e proteína S-100. Além dos marcadores indispensáveis ao diagnóstico, o CCF possui a expressão imunohistoquímica do componente fusocelular também para α_1 -antitripsina e antígeno carcinoembrionário (CEA), bem como negatividade para CD68 (KP1), lisozima e miosina de músculo liso e esquelético. O componente de células escamosas apresenta positividade para α -catenina, β -catenina (marcação citoplasmática) e negatividade para CD68 (KP1), lisozima e α_1 -antitripsina (Takata *et al.*, 1991; Munakata *et al.*, 1998; Shibuya *et al.*, 2000; Rizzardi *et al.*, 2003).

Tabela 1*. Perfil imunohistoquímico dos casos de carcinomas de células fusiformes orais descritos na literatura.

Marcadores	Nº casos	+CC **	+CF **
Pan-citoqueratinas incluindo AE1/AE3	33	17 (100%)***	24 (73%)
Vimentina	16	2 (20%)****	15 (94%)
Desmina	5	0	0
Actina de músculo liso	4	0	0
Pan-actina	1	0	1 (100%)
Proteína S-100	18	0	0

*Baseado nos trabalhos de Ellis *et al.* (1987), Kessler & Bartley (1988), Takata *et al.* (1991), Munakata *et al.* (1998), Shibuya *et al.* (2000), Ansari-Lari *et al.* (2002), Choi *et al.* (2003), Rizzardi *et al.* (2003), Kudo *et al.* (2006) e Yanamoto *et al.* (2007).

** CC – componente carcinomatoso; CF – componente de células fusiformes.

*** Apenas 17 dos 33 casos relataram os resultados da marcação de AE1/AE3 no CC.

**** Apenas 10 casos relataram os resultados da marcação de vimentina no CC.

Assim como os CCFs podem exibir em seu componente fusocelular não somente a expressão de vimentina mas também de outras proteínas mesenquimais, especialmente os marcadores miogênicos, a positividade para estes marcadores não descarta o diagnóstico de carcinoma de células fusiformes. A ausência de positividade para citoqueratinas também não pode ser considerada evidência desfavorável ao diagnóstico de CCF, e esse fato pode acontecer através da perda da reatividade para algumas subunidades de citoqueratina devido à fixação ou alteração fenotípica das células tumorais. Tem sido observado que tumores puramente compostos por células fusiformes pleomórficas sem nenhuma expressão de citoqueratinas recidivam como CEC convencional, servindo para ilustrar a profunda divergência na diferenciação morfológica e imunohistoquímica encontrada nas células do CCF. Nestes casos, há a necessidade da aplicação de diferentes tipos de anticorpos (monoclonais e policlonais) anti-citoqueratinas no diagnóstico diferencial imunohistoquímico do CCF. Adicionalmente, a microscopia eletrônica pode ainda revelar características epiteliais como desmossomos e tonofilamentos nas células fusiformes e é por vezes importante insistir na

evidenciação de áreas de CEC convencional ou displasia intensa da mucosa, usualmente na margem de crescimento do tumor, antes da confirmação do diagnóstico de CCF (Takata *et al.*, 1991; Wenig & Pilch, 2000; Slootweg & Richardson, 2001; Cardesa & Zidar, 2005). Entretanto, tanto os estudos descritivos histopatológicos quanto imunohistoquímicos têm sido reportados com casos isolados ou pequenas séries, muitas vezes sem a inclusão de controles para comparação direta, dificultando a utilização dos resultados na rotina diagnóstica laboratorial.

Tumores de células fusiformes são relativamente incomuns na boca, mas um grande espectro de sarcomas de tecidos moles pode ocorrer neste sítio e o CCF deve ser considerado em seu diagnóstico diferencial, especialmente por ser a neoplasia de células fusiformes mais freqüente da região de cabeça e pescoço. Seu diagnóstico diferencial deve contemplar outros tumores de células fusiformes desta região tais como as proliferações de células fusiformes benignas ou reativas (como a fasciíte nodular e o tumor miofibroblástico inflamatório), sarcoma miofibroblástico de baixo-grau, histiocitoma fibroso maligno pleomorfo, leiomiossarcoma, fibrossarcoma, tumor maligno da bainha do nervo periférico, melanoma de células fusiformes, carcinossarcoma, carcinoma mioepitelial e, especialmente o sarcoma sinovial (Takata *et al.* 1991; Wenig & Pilch, 2000; Jordan & Regezi, 2003; Cardesa & Zidar, 2005).

A fasciíte nodular afeta mais comumente adultos jovens com predileção pelos membros superiores, especialmente o antebraço, sendo uma lesão bem circunscrita, porém não-encapsulada. Os casos clássicos consistem na proliferação de miofibroblastos em meio a um estroma colagenoso com graus variáveis de alterações microcísticas e mixóides. Os núcleos não são hipercromáticos ou pleomórficos, embora mitoses normais possam ser numerosas. Cerca de 10% dos casos contêm células gigantes multinucleadas do tipo osteoclasto. As células fusiformes mostram imunopositividade para vimentina, HHF-35 e AML, enquanto são usualmente negativas para desmina, citoqueratinas e proteína S-100 (Fletcher, 2000b; Dayan *et al.*, 2005).

O tumor miofibroblástico inflamatório ocorre principalmente em crianças e adolescentes e microscopicamente é caracterizado pela proliferação fibroblástica/miofibroblástica fascicular acompanhada por um infiltrado proeminente de células inflamatórias crônicas, particularmente plasmócitos. O componente fusocelular apresenta atipia nuclear e índice mitótico variável e, eventualmente, necrose ou calcificação. O perfil imunohistoquímico é caracterizado pela positividade para AML e HHF35, podendo também ser positivo para desmina e citoqueratina. Aberrações clonais resultantes do rearranjo do gene *ALK* (*anaplastic lymphoma kinase*) e a super-expressão da proteína ALK podem ser ferramentas úteis em seu diagnóstico (Fletcher, 2000b; Völker *et al.*, 2007).

O sarcoma miofibroblástico de baixo-grau é uma entidade recentemente reconhecida, com 2 a 25% dos casos com origem na região de cabeça e pescoço, especialmente na cavidade oral. Em geral, as células neoplásicas fusiformes organizam-se em fascículos em um padrão estoriforme, com um citoplasma pálido eosinofílico pouco definido. O núcleo pode ser fusiforme, alongado e ondulado, ou volumoso, arredondado, vesicular e edentado, apresentando nucléolos pequenos. Raramente são observados tumores hipocelulares com matriz colagenosa proeminente e hialinização focal. Atipia nuclear moderada e discreto aumento da atividade proliferativa podem ser encontrados. As células tumorais podem ser positivas para desmina, actina de músculo liso, fibronectina, CD34 e CD99, enquanto que a proteína S-100, marcadores epiteliais, laminina e h-caldesmon apresentam marcação negativa (Fletcher, 2000b; Mentzel & Fletcher, 2002; Fletcher, 2006; Takahama *et al.*, 2006; Jay *et al.*, 2007).

O histiocitoma fibroso maligno pleomorfo, recentemente classificado como sarcoma pleomorfo indiferenciado, representa essencialmente um diagnóstico de exclusão e ocorre preferencialmente nos membros inferiores de pacientes na sexta e sétima décadas de vida. Esta lesão apresenta pleomorfismo celular com presença de células gigantes bizarras, células fusiformes pleomórficas e quantidade variada de histiócitos espumosos. Mitoses atípicas são observadas assim como necrose superficial. Há forte positividade apenas para vimentina,

positividade focal para CD68 e negatividade para marcadores miogênicos, epiteliais, proteína S-100, HMB-45 e CD45 (Dei Tos, 2006; Alfredo *et al.*, 2008).

O leiomiossarcoma consiste em fascículos que se entrelaçam formados por células fusiformes com citoplasma eosinofílico, e núcleo oval a alongado, com indentações e formato de charuto. Os núcleos podem apresentar hipercromatismo, atipia e pleomorfismo. Nucléolos proeminentes e vacúolos paranucleares também estão presentes com frequência e o número de mitoses é variável. O estroma pode apresentar alterações mixóides e necrose e outras populações celulares podem coexistir com as células fusiformes como, por exemplo, as células gigantes multinucleadas, células epitelíoides e células semelhantes a histiócitos. As células tumorais são positivas para actina de músculo liso, actina músculo-específica e vimentina, e usualmente negativas para marcadores epiteliais e proteína S-100 (Dry *et al.*, 2000; Nikitakis *et al.*, 2002; Vilos *et al.*, 2005; Rodini *et al.*, 2007).

O fibrossarcoma é caracterizado pela presença de células fusiformes com citoplasma pálido mal delimitado e núcleo alongado, arranjas em um padrão fascicular semelhante a “espinha de peixe”. O índice mitótico é variável e o pleomorfismo celular é mínimo. Padrão vascular semelhante ao hemangiopericitoma está presente em cerca de 30% dos casos. Imunohistoquimicamente o fibrossarcoma é essencialmente um diagnóstico de exclusão e, por definição, tem marcação negativa para os anticorpos S-100, EMA, AE1/AE3 e desmina (Fletcher, 2000b; Pareira *et al.*, 2005; Soares *et al.*, 2006).

O tumor maligno da bainha do nervo periférico é microscopicamente composto por células fusiformes orientadas em fascículos que sugerem diferenciação neural, incluindo a transição abrupta entre áreas celulares e áreas mixóides e a concentração de células tumorais em torno dos vasos sanguíneos. As células apresentam citoplasma pálido e pobremente definido, e núcleo hipercromático, de contorno estreito e afilado, com nucléolo não evidente, muitas vezes pleomórfico e ondulado. Imunopositividade focal para proteína S-100 é vista em 50 a 90% dos casos. Além disso, Leu-7 (CD57) e proteína de mielina básica são encontradas em cerca de 50% e 40% dos casos, respectivamente. Sua

negatividade para citoqueratinas é útil para o diagnóstico diferencial com o sarcoma sinovial monofásico (Fletcher, 2000a; Weiss & Goldblum *et al.*, 2001a).

O melanoma de células fusiformes, também chamado melanoma desmoplásico, é uma variante não usual do melanoma que freqüentemente é amelanótico. As células neoplásicas são fusocelulares e estão em meio a uma matriz abundante de colágeno. Mitoses estão presentes e o padrão de crescimento do tumor pode ser fascicular ou ao acaso. A proteína S-100 é positiva em quase todas as lesões, mas HMB-45 é fraco ou negativo na maioria delas. Uma outra variante do melanoma chamada melanoma neurotrópico pode estar associada ao melanoma desmoplásico. Esta lesão apresenta-se especialmente na região de cabeça e pescoço e as células neoplásicas são arranjadas em padrão de crescimento fascicular lembrando o tumor da bainha do nervo periférico, infiltrando os feixes nervosos (Fletcher, 2000b; Hessel & Byers, 2002).

O carcinossarcoma (tumor misto verdadeiro) é um tumor maligno raro de glândulas salivares composto da mistura de elementos carcinomatosos e sarcomatosos, que acomete usualmente adultos com predileção pela parótida. Alguns pacientes podem apresentar história prévia de adenoma pleomorfo recorrente na região. Os elementos sarcomatosos mais comuns são condrossarcoma e osteossarcoma e os elementos carcinomatosos mais comuns são carcinoma ductal moderadamente ou pobremente diferenciado e carcinoma indiferenciado. Há positividade do componente epitelial para CK13, CK14, AE1/AE3 e grupos de células epiteliais positivas para CK19 e vimentina. O componente mesenquimal é positivo para vimentina e actina de músculo liso e negativo para citoqueratinas (Gnepp, 2005; Thomé Capuano *et al.*, 2007).

O carcinoma mioepitelial é uma neoplasia de glândulas salivares composta de células tumorais com diferenciação mioepitelial, acometendo indivíduos adultos, com 75% dos casos ocorrendo na parótida. As células tumorais podem ser fusiformes, estreladas, epitelióides, plasmocitóides ou vacuolizadas, com morfologia de “anel de sinete”. Alguns tumores tendem a ser mais celulares e compostos de células fusiformes, lembrando um sarcoma. As células tumorais

podem formar estruturas sólidas ou semelhantes a lençóis, padrões trabecular ou reticular, ou também estar dissociadas em meio a um estroma mixóide ou hialino. Podem ser observadas mitoses, marcado pleomorfismo celular, necrose e crescimento infiltrativo difuso. As células tumorais são positivas para citoqueratinas e ao menos para um dos marcadores mioepiteliais, incluindo actina de músculo liso, proteína fibrilar acídica glial, CD10, calponina e cadeia pesada da miosina de músculo liso (Skálová & Jäkel, 2005; Gleason & Fletcher, 2007).

O sarcoma sinovial é um tumor mesenquimal de células fusiformes com diferenciação epitelial variável (incluindo formação pseudo-glandular) e translocação cromossômica específica t(X; 18) (p11; q11) (Fisher *et al.*, 2002). O sarcoma sinovial é composto por dois tipos celulares morfologicamente distintos, mas histogeneticamente relacionados: células epiteliais que lembram células carcinomatosas e células fusiformes semelhantes às encontradas no fibrossarcoma. Dependendo do grau de diferenciação e da predominância no tumor, as duas populações celulares formam um espectro histopatológico contínuo que pode ser dividido em 4 tipos principais: bifásico, monofásico fibroso, monofásico epitelial e pobremente diferenciado (células redondas) (Weiss & Goldblum *et al.*, 2001b). Tumores monofásicos são constituídos por células epiteliais ou fusiformes e em lesões bifásicas o componente fusocelular tipicamente predomina em relação às áreas focais de células epiteliais. As células epiteliais são grandes, com formato redondo a oval, citoplasma abundante, núcleo vesicular e arranjo em ninhos, cordões e redemoinhos em torno de espaços pseudo-glandulares, que às vezes contém material amorfo eosinofílico. As células fusiformes contêm núcleo hiper cromático e citoplasma escasso. Características adicionais incluem espaços vasculares semelhantes aos do hemangiopericitoma, numerosos mastócitos, áreas de hialinização, microcalcificação e ossificação ocasional (Goebel *et al.*, 2004). Imunohistoquimicamente, ambos os componentes usualmente marcam com CKs, usualmente CK7 e CK19, e EMA com marcação mais pronunciada no componente de células epiteliais. Pode ser ainda observada positividade para proteína S-100, proteína bcl-2 e CD99. As células fusiformes

marcam com calretinina e vimentina (Weiss & Goldblum *et al.*, 2001b). Os achados imunohistoquímicos podem não ajudar na diferenciação entre sarcoma sinovial monofásico e carcinoma de células fusiformes. Assim, o arranjo celular em redemoinho com um padrão hemangiopericítico e características citológicas aparentemente brandas favorecem o diagnóstico morfológico de sarcoma sinovial, enquanto atipia celular evidente, pleomorfismo celular, atividade mitótica pronunciada e mitoses anormais têm sido vistas mais comumente em carcinoma de células fusiformes (Weiss & Goldblum *et al.*, 2001b; Meer *et al.*, 2003).

O prognóstico do CCF da cavidade oral é pobre e esta lesão deve ser considerada como tendo um comportamento agressivo. Em um trabalho relatando 59 casos de CCF na cavidade oral sem a utilização de técnica imunohistoquímica (Ellis & Corio, 1980), foram coletados dados prognósticos de 45 pacientes e destes, 25 pacientes (55%) morreram da doença em menos de 2 anos e a sobrevida por 5 anos foi um indicativo de cura para 14 pacientes (31%). Dezesesseis pacientes (36%) evoluíram para metástases e recorrência da lesão foi encontrada em 12 pacientes (27%), sendo que destes, respectivamente, 13 (81%) e 7 (58%) morreram. O prognóstico não teve relação com os aspectos microscópicos, tais como o padrão histopatológico dominante, o grau de pleomorfismo celular, o número de figuras mitóticas, o número de células gigantes multinucleadas, a quantidade de infiltrado inflamatório, a presença de hemorragia ou necrose e a extensão da invasão aos tecidos subjacentes, embora a localização em lábio inferior tenha demonstrado melhor índice de sobrevida nos pacientes acometidos com o CCF. Outro estudo, envolvendo 18 casos de CCF na cavidade oral, demonstrou que o tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos, estágio clínico da lesão, presença de metástases, invasão vascular e recorrência distante são fatores que influenciam na sobrevida global, que apresentou-se menor que a do CEC convencional (Su *et al.*, 2006). Este mesmo estudo demonstrou média de sobrevida de 3 anos de 27,5% em casos de CCF orais, variando de 100% em casos em estágios precoces (I e II), a 9% em 1 ano e 0% em 3 anos para estágios tardios (III e IV). Estes autores encontraram altas taxas de recorrência bem como

de metástases, também considerando o CCF oral como uma lesão de comportamento mais agressivo. Embora o prognóstico do CCF oral seja considerado reservado, a intervenção cirúrgica com ou sem esvaziamento cervical resulta em melhor taxa de sobrevivência aos pacientes do que a terapia exclusiva com radioterapia ou associação entre esta e a cirurgia (Ellis & Corio, 1980). O controle rigoroso do paciente é necessário devido à freqüente possibilidade de recorrência local e a distância (Ellis & Corio, 1980; Su *et al.*, 2006).

2.3 Marcadores imunohistoquímicos

2.3.1 Citoqueratinas

O citoesqueleto intra-citoplasmático é formado por três grandes famílias de proteínas: microfilamentos contendo actina, microtúbulos contendo tubulina e filamentos intermediários. As citoqueratinas (CKs) são proteínas do tipo filamentos intermediários, que medem entre 7 e 22 nm de diâmetro, tamanho intermediário entre os diâmetros dos polímeros de tubulina (22-25 nm de diâmetro) e os microfilamentos de actina (5-7 nm de diâmetro). Existem cinco tipos de filamentos intermediários: As CKs ácidas (CK9 - CK20) formam o tipo I e as CKs básicas (CK1 - CK8) formam o tipo II; os filamentos intermediários do tipo III são representados pela vimentina, desmina, periferina, proteína fibrilar acídica glial e sincoilina, encontradas respectivamente em células mesenquimais, todos os tipos de músculo, nos neurônios periféricos, astrócitos e principalmente nos músculos cardíaco e esquelético. O tipo IV consiste em neurofilamentos L, M & H e alfa-internexina (identificados nos neurônios), nestina (identificada em células neuroepiteliais) e sinemina (identificada em todos os tipos de músculo); as lamininas nucleares A, B1, B2 & C constituem o tipo V (Heatley, 1996; DePianto & Coulombe, 2004; Omary *et al.*, 2006; Pallari & Eriksson, 2006).

Existe um total de 20 diferentes subunidades de CKs (com peso molecular variando entre 40 e 70 kDa) e estas são classificadas quanto ao peso molecular (baixo e alto) e quanto ao valor do pH isoelétrico (formas básica e ácida). Em geral, a maioria das CKs de baixo peso molecular parecia com CKs de alto peso molecular específicas, bem como a maioria das CKs ácidas parecia com CKs básicas. Os pares são assim organizados: CKs 1/10, Cks 3/12, CKs 4/13, CKs 5/14, CKs 6/16 ou 6/17, CKs7/19 e CKs 8/18. Ao menos, um par de cada subfamília é co-expresso em um determinado tecido epitelial (Moll *et al.*, 1982; Chu & Weiss, 2002).

As CKs constituem o grupo de filamentos intermediários de maior diversidade e mais expressos nas células epiteliais e uma única célula epitelial é capaz de sintetizar uma grande variedade de CKs que podem copolimerizar a fim de formar um único sistema de filamentos (Moll *et al.*, 1982; Coulombe & Omary, 2002; Kirfel *et al.*, 2003; Alberts *et al.*, 2004).

A expressão de CKs varia entre os epitélios em seus diferentes estágios de desenvolvimento e durante o seu curso terminal de diferenciação e, eventualmente, pode ser característica para diferentes tecidos epiteliais, podendo funcionar como forma de classificação epitelial. As CKs 7, 8, 18, 19 são encontradas no epitélio simples enquanto que as CKs 5 e 14 são mais expressas nas células basais do epitélio estratificado (Moll *et al.*, 1982; Sawaf *et al.*, 1991; Pelissier *et al.*, 1992, Berkovitz & Barret, 1998; Chu & Weiss, 2002; Silveira *et al.*, 2002).

Os epitélios (simples ou complexos) podem ser classificados de acordo com seu padrão de expressão de CKs e, mesmo quando um epitélio sofre transformação maligna, seu perfil de CKs usualmente é mantido e a maioria das diferenças encontradas pode ser explicada pela composição celular mais complexa da lesão maligna (Moll *et al.*, 1982; Chu & Weiss, 2002). Assim, a marcação dos filamentos intermediários de CK é um importante instrumento no diagnóstico diferencial entre neoplasias epiteliais e mesenquimais, na distinção entre diferentes tipos celulares dentro do mesmo tecido, no reconhecimento de

tumores metastáticos, em estudos histogenéticos, bem como na classificação de neoplasias malignas pobremente diferenciadas (Silveira *et al.*, 2002; Pires *et al.*, 2004).

Com relação aos tecidos orais, o epitélio pavimentoso estratificado da cavidade oral pode ser dividido em: mucosa superficial ou de revestimento não-queratinizada (tipo I); mucosa mastigatória queratinizada do palato duro e gengiva (tipo II); e mucosa especializada da superfície dorsal da língua em seus 2/3 anteriores (tipo III). A mucosa estratificada não-queratinizada expressa as CKs 4 e 13, respeitando a expressão encontrada em outros epitélios semelhantes. As áreas de epitélio queratinizado adicionam a expressão das CKs 1, 10 e 11. A camada basal de todos os queratinócitos expressa as CKs 5 e 14, e em menor proporção a CK19. As CKs de epitélio simples, 7, 8, 18 e 19, usualmente não são expressas neste epitélio, sendo características dos epitélios glandulares (Sawaf *et al.*, 1991; Berkovitz & Barret, 1998; Chu & Weiss, 2002; Silveira *et al.*, 2002). O resumo do padrão de expressão de CKs no epitélio da cavidade oral, assim como a sua distribuição, encontra-se descrito na Tabela 2.

Tabela 2*. Expressão de citoqueratinas (CKs) no epitélio oral por subtipo.

CKs	Tipo de epitélio	Localização
CK1	Epitélio estratificado queratinizado	Palato duro e gengiva
CK2	Epitélio estratificado queratinizado	Palato duro e gengiva
CK3	Epitélio estratificado queratinizado (camada córnea)	Ausente na cavidade oral
CK4	Epitélio estratificado não-queratinizado (queratinócitos suprabasais)	Epitélio sulcular e mucosa jugal
CK5	Epitélio estratificado queratinizado e não-queratinizado	Camada basal de todos os queratinócitos
CK6	Epitélio estratificado não-queratinizado (alta renovação)	Papilas filiformes, mucosa oral e glândulas salivares
CK7	Epitélio simples	Células de Merkel, botões gustatórios e glândulas salivares
CK8	Epitélio simples	Palato mole, células de Merkel, botões gustatórios e glândulas salivares
CK9	Epitélio estratificado queratinizado	Ausente na cavidade oral
CK10	Epitélio estratificado queratinizado	Palato duro e gengiva
CK11	Epitélio estratificado queratinizado	Palato duro e gengiva
CK12	Epitélio estratificado queratinizado (camada córnea)	Ausente na cavidade oral
CK13	Epitélio estratificado não-queratinizado (queratinócitos suprabasais)	Epitélio sulcular, mucosa jugal e glândulas salivares
CK14	Epitélio estratificado queratinizado e não-queratinizado	Camada basal de todos os queratinócitos e glândulas salivares
CK15	Epitélio escamoso estratificado	Inconstante na cavidade oral
CK16	Epitélio estratificado não-queratinizado (alta renovação)	Glândulas salivares
CK17	Epitélio estratificado não-queratinizado (alta renovação)	Glândulas salivares
CK18	Epitélio simples	Palato mole, células de Merkel e glândulas salivares
CK19	Epitélio simples (principalmente) e camada basal de epitélio estratificado não-queratinizado	Palato mole, células de Merkel, botões gustatórios e glândulas salivares
CK20	Epitélio simples	Células de Merkel e botões gustatórios

* Fontes: Moll *et al.*, 1982; Sawaf *et al.*, 1991; Berkovitz & Barret, 1998; Chu & Weiss, 2002; Coulombe & Omary 2002; Silveira *et al.*, 2002.

2.3.2 Proteína p53

TP53 é o nome do gene supressor de tumor localizado no braço curto do cromossomo 17, cujo produto de transcrição é a proteína p53, que tem função regulatória do ciclo celular e quando ativada pode induzir a parada do ciclo assim como a morte celular por apoptose. Esta proteína apresenta meia-vida muito curta sendo difícil sua detecção em tecidos normais, entretanto p53 pode permanecer por mais tempo no tecido em algumas situações, como mutações, defeitos na via de degradação ou ligação a outras proteínas. A presença de mutação no gene *TP53* é a alteração genética mais comumente encontrada em tumores humanos, sendo encontrada em 40 a 50% dos CECs de cabeça e pescoço (Nylander *et al.*, 2000).

2.3.3 Antígeno Ki-67

O antígeno Ki-67 é uma proteína humana localizada no núcleo, que está estritamente associada a células em proliferação, com expressão ausente em células quiescentes (Gerdes *et al.*, 1984). O fato de que esta proteína está presente durante todas as fases do ciclo celular, tendo expressão máxima nas fases G2 e M (Sittel *et al.*, 1999), a faz um excelente marcador para determinar a fração de crescimento de uma determinada população celular (Kill, 1996; Sittel *et al.*, 1999; Scholzen & Gerdes, 2000). A maior frequência e intensidade de expressão de Ki-67 têm sido associadas ao aumento do risco de transformação maligna e do grau de malignidade em CECO (Kurokawa *et al.*, 2005).

2.3.4. Antígeno epitelial de membrana (EMA)

O antígeno epitelial de membrana (EMA) também chamado mucina epitelial (MUC1), pertence a um grupo heterogêneo de proteínas altamente glicosiladas que é expresso na membrana luminal apical de uma variedade de células epiteliais glandulares exócrinas. Embora a utilização de anticorpos contra EMA para definir a origem epitelial de tumores tenha diminuído nos últimos anos com a introdução de anticorpos contra citoqueratinas específicas, o seu uso ainda se faz presente no diagnóstico de neoplasias epiteliais, não sendo restrito a estes tipos celulares (Sloane & Ormerod, 1981; Leong *et al.*, 2003).

EMA está expresso na maioria dos tecidos de origem epitelial, tanto malignos quanto benignos. Em epitélios glandulares a marcação ocorre apenas junto às superfícies luminais enquanto um padrão citoplasmático é observado nas células escamosas. Ocasionalmente, plasmócitos são marcados por EMA e mais recentemente, o clone E29 tem sido associado também à marcação de macrófagos, monócitos e células perineurais (Fernandez *et al.*, 1987; Leong *et al.*, 2003).

2.4 Expressão imunohistoquímica de citoqueratinas, p53, ki-67 e EMA no CECO e no CCF

2.4.1 Citoqueratinas

Em geral, carcinomas com origem em epitélio do tipo simples são positivos para os anticorpos anti-CKs 7 e/ou 20 e negativos para anti-CKs 14 e 5/6, enquanto que carcinomas que se originam de epitélio estratificado são positivos para anticorpos anti-CKs 14 e 5/6 e negativos para anti-CKs 7 e/ou 20. Assim, a expressão de CKs 7 e 20 é extremamente incomum em CECs de cabeça e pescoço, e a grande maioria dos casos de CEC é positiva para CKs 14, 5/6 e

negativa para CKs 8/18. Carcinomas que se originam da mucosa revestida por epitélio escamoso não-queratinizado compreendem a maioria dos tumores de cabeça e pescoço, sendo geralmente CEC pobremente diferenciado da laringe, faringe, e cavidades oral e nasal. Estes tumores geralmente expressam citoqueratinas 5/6, 10, 13, 14, 17 e 19 (Chu & Weiss, 2002). O par CK 8/18 é normalmente expresso em epitélio simples e a expressão de CK8 em CECs derivados de epitélio estratificado sugere que haja uma alteração fenotípica das características das células do epitélio estratificado (Raul *et al.*, 2004). A expressão da CK19 está presente na camada basal do epitélio da mucosa normal, nas camadas supra-basal e basal do epitélio da mucosa hiperplásica atípica e em toda a extensão do epitélio de CEC invasivo de cabeça e pescoço (Zhong *et al.*, 2006).

Nos CECs pobremente diferenciados as CKs 5 e 17 são mais expressas do que em CECs bem diferenciados (Chu & Weiss, 2002). Em contraste, as CKs 7, 18 e 19 não são detectadas em quantidade significativa nestes tumores e a CK8 pode ser expressa em pequenas quantidades em algumas células basais (Moll *et al.*, 1982). O CECO bem diferenciado expressa CK1 e não possui expressão de CK5, enquanto que o CECO pobremente diferenciado é particularmente rico em CKs de epitélio simples (CKs 7, 8, 18 e 19) (Sawaf *et al.*, 1991). A taxa de expressão de CK19 em CECs é variável e o aumento da mesma tem sido relacionado a tumores pouco diferenciados, aumento da taxa de recorrência, bem como uma menor taxa de sobrevida para o paciente (Zhong *et al.*, 2006). A expressão aumentada de CK8/18 em CECOs indica prognóstico pobre e este tem sido considerado um marcador predictivo independente (Ogden *et al.*, 1993; Fillies *et al.*, 2006).

Tem sido demonstrado que as células fusiformes do CCF podem exibir positividade para citoqueratinas em proporções que variam de 40% a 78% dos casos relatados, quando são empregados anticorpos anti-citoqueratinas de amplo espectro (Slootweg & Richardson, 2001). Usando-se diferentes anticorpos contra vários subtipos de citoqueratinas em peso variando de 44 a 60 kDa, demonstrou-se positividade em 6 de 7 casos (85.7%) (Takata *et al.*, 1991). A positividade para

citoqueratinas é maior no CECO convencional do que nos componentes de células fusiformes e de células escamosas do CCF. Em comparação ao componente de células fusiformes, as áreas de células escamosas do CCF apresentam maior positividade para citoqueratinas, principalmente CKs 1 e 18 (Thompson *et al.*, 2002). Possíveis explicações para resultados negativos para citoqueratinas no componente de células fusiformes do CCF incluem: (a) os níveis de citoqueratina presentes podem ser menores do que o limiar de detecção; (b) apenas um pequeno número de células tumorais produzem citoqueratina e resultados negativos refletem erros de amostragem; (c) imunoreatividade para citoqueratina não é preservada quando as condições de fixação são inadequadas; e (d) nem todas as proliferações de células fusiformes são de origem epitelial. A última possibilidade fez com que, durante anos, alguns autores acreditassem que a proliferação sarcomatosa pudesse ser uma proliferação estromal atípica ao carcinoma subjacente (Ellis *et al.*, 1987; Cardesa & Zidar, 2005; Gupta *et al.*, 2007). O CCF acometendo o pênis apresentou imunopositividade para AE1/AE3 e CK8 em 60% dos casos (Lont *et al.*, 2004) enquanto que 66% dos casos de CCF em pulmão apresentaram positividade para AE1/AE3 no componente fusocelular (Ro *et al.*, 1992). O CCF em vesícula biliar apresentou imunopositividade para CKs nas células tumorais em 90% dos casos, sem especificação do componente celular (Nishihara & Tsuneyo, 1993). Em um estudo, o CCF de trato aéreo-digestivo superior apresentou imunopositividade nas células fusiformes para CK18, AE1/AE3 e CK 8/18 respectivamente em 60%, 30% e 30% dos casos (Altrabulsi *et al.*, 2006) e em outro estudo na mesma localização, 82% dos casos foram positivos para AE1/AE3 nas células fusiformes (Ansari-Lari *et al.*, 2002). AE1/AE3 foi positivo em 20% dos casos de CCFs de laringe (Lewis *et al.*, 1997) e de 65 a 95% dos casos de CCFs de esôfago (Lauwers *et al.*, 1998; Handra-Luca *et al.*, 2001). Os CCFs de pele apresentam imunopositividade quase que exclusivamente para citoqueratinas de alto peso molecular como CKs 5 e 14 (Folpe & Cooper, 2007).

2.4.2 Proteína p53, antígeno Ki-67 e EMA

A imunopositividade para a proteína p53 é bastante variável, obedecendo um padrão nuclear nas células de CECOs e células basais do epitélio escamoso oral normal. Em geral, os CECOS apresentam um índice de imunopositividade para p53 de aproximadamente 50% (Tanaka *et al.*, 2002; Kurokawa *et al.*, 2005; Abbas *et al.*, 2007). Não há um consenso na literatura com relação ao valor prognóstico da expressão da proteína p53 em CECO, em virtude das dificuldades na interpretação de seus achados por diferenças amostrais e técnicas. Embora a super-expressão deste marcador no *front* invasivo profundo de CECOs já tenha sido relacionada com o grau histológico de malignidade do tumor, considera-se que a expressão imunohistoquímica de p53 não tenha correlação com parâmetros clinicopatológicos de CECOs (Vora *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2004; Kurokawa *et al.*, 2005).

A proliferação celular mensurada pela positividade imunohistoquímica para o antígeno Ki-67 tem forte correlação com a gradação histológica em CECOs (Tumuluri *et al.*, 2002; Kurokawa *et al.*, 2005). O índice de marcação em CECOs varia de 14% a 86% (Sittel *et al.*, 1999) e valores de Ki-67 para CECOs bem e pouco diferenciados, respectivamente são de 18% e 24% (Piattelli *et al.*, 2002). A super-expressão de Ki-67 no *front* invasivo profundo destes tumores está relacionada com o grau histológico de malignidade do tumor (Sittel *et al.*, 1999; Kurokawa *et al.*, 2005). Baixos índices de proliferação foram encontrados em CECOs bem diferenciados (de Aguiar *et al.*, 2007) e índice de positividade significativamente maior para Ki-67 foi encontrado em CECOs pouco diferenciados (Carlos De Vicente *et al.*, 2002). A utilização do Ki-67 para o estabelecimento do prognóstico do CECO é ainda controversa. Enquanto muitos estudos têm mostrado que tumores com altas taxas de proliferação estão associados com sobrevida menos favorável, outros estudos sugerem o oposto (de Aguiar *et al.*, 2007).

O CECO expressa EMA assim como o epitélio escamoso normal e a expressão absoluta de EMA não distingue epitélio normal de carcinoma. Em CECOs, o número de células que expressam EMA é maior em tumores bem diferenciados do que em tumores pobremente diferenciados (Fernandez *et al.*, 1987). A marcação de EMA no CECO é variável, porém é descrita em cerca de 86% das células tumorais (Tatemoto *et al.*, 1987).

A marcação imunopositiva para p53 é encontrada em cerca de 78% dos casos de CCF e é similar entre os dois componentes morfológicos. Alguns casos apresentam discrepância de marcação positiva de p53 entre os componentes com valores de 11.5% para o componente fusocelular e 75.5% para o componente carcinomatoso (Ansari-Lari *et al.*, 2002; Yanamoto *et al.*, 2007). Poucos trabalhos têm investigado a atividade proliferativa no CCF oral e Ki-67 apresenta marcação nuclear positiva difusa em 10 a 20% das células do componente fusocelular e marcação heterogênea no componente de células escamosas variando de 0% a 90% (Rizzardi *et al.*, 2003; Yanamoto *et al.*, 2007). O antígeno epitelial de membrana (EMA) mostra uma marcação heterogênea nos dois componentes celulares do CCF e em geral a marcação positiva é maior no componente carcinomatoso, ocorrendo em quase 100% dos casos. Cerca de 50% dos casos apresentam imunopositividade para EMA no componente fusocelular, podendo ser uma boa opção para demonstração da origem epitelial do componente fusocelular (Slootweg & Richardson, 2001; Takata *et al.*, 1991; Munakata *et al.*, 1998; Shibuya *et al.*, 2000).

Como demonstrado através da revisão da literatura realizada, há necessidade de estudos focando os achados microscópicos e o perfil imunohistoquímico dos CCFs da cavidade oral, visando estabelecer de forma mais clara seus critérios diagnósticos e seu perfil fenotípico.

3. PROPOSIÇÃO

Este estudo teve como objetivos analisar a expressão imunohistoquímica de marcadores epiteliais no CCF de cabeça e pescoço, avaliando sua importância no diagnóstico deste tumor, comparar através dos achados histopatológicos e imunohistoquímicos o CCF de cabeça e pescoço com os carcinomas espinocelulares convencionais da cavidade oral e definir um perfil sócio-demográfico e clínico-patológico do CCF oral.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da amostra

Foram selecionados dez casos previamente diagnosticados como carcinoma de células fusiformes (CCF) oriundos em conjunto dos seguintes serviços: Laboratório de Histopatologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e Laboratório de Histopatologia Bucal da Universidade Estácio de Sá (Rio de Janeiro/RJ, Brasil); Serviço de Estomatologia e Patologia Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (Piracicaba/SP, Brasil) e do Serviço de Medicina Bucal (Cidade da Guatemala, Guatemala), obtidos após revisão dos arquivos das instituições do ano de 2001 até 2006.

O critério de inclusão estabelecido foi a disponibilidade dos blocos de parafina que permitissem 2 cortes de 5 μm de espessura e 15 cortes de 3 μm de espessura para cada caso, evidenciando amostra tumoral representativa em todos. Gênero ou outros fatores sócio-demográficos não foram fatores de inclusão ou exclusão. Os dados sócio-demográficos e clínicos foram obtidos a partir dos registros laboratoriais de todos os casos em cada laboratório específico.

4.2 Análise histopatológica

Os blocos de parafina de cada caso foram submetidos a 2 cortes de 5 μm de espessura para análise histopatológica, sendo ambas as lâminas coradas rotineiramente com hematoxilina e eosina (HE). A descrição dos aspectos histopatológicos, assim como a gradação histológica dos tumores, foi realizada isoladamente pelos participantes do estudo (MJR e FRP), através da visualização direta por meio de microscópio óptico de duas oculares, obedecendo aos critérios sugeridos pela Organização Mundial de Saúde (Cardeza & Zidar, 2005; Johnson

et al., 2005). Quando não houve concordância entre os dois avaliadores, os casos foram submetidos à apreciação por um terceiro avaliador até que se obtivesse um consenso entre os avaliadores. Os critérios histopatológicos para o diagnóstico do carcinoma de células fusiformes incluíram, em ordem de importância: (1) presença de focos de CEC ou displasia epitelial, (2) presença de células fusiformes displásicas, (3) a transição franca entre estes dois componentes celulares, (4) presença de células alongadas bipolares alinhadas em paralelo; (5) presença de células com núcleo celular elíptico, vesicular, contendo um ou mais nucléolos; (6) espaços intercelulares proeminentes; (7) presença eventual de células gigantes multinucleadas bizarras e (8) formação de osteóide.

Como comparação, foram incluídos 10 casos de CECO, sendo 5 casos bem diferenciados e 5 casos pouco diferenciados, oriundos dos registros do Serviço de Estomatologia e Patologia Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (Piracicaba/SP, Brasil), entre os anos de 2001 a 2006, utilizados como controles. Os CECOs sem queratinização (até 5% das células), com intenso pleomorfismo e com padrão de invasão em pequenos ninhos ou cordões de células epiteliais infiltrantes foram classificados como pouco diferenciados e os CECOs altamente queratinizados (mais de 50% das células), com pleomorfismo discreto e com padrão de invasão epitelial em bordas infiltrantes bem-definidas que empurram o tecido conjuntivo, foram classificados como bem diferenciados. Além do grau de queratinização, do pleomorfismo e do padrão de invasão (em ninhos ou infiltrativo/difuso), outros dois critérios foram incluídos na análise histopatológica dos casos controle: o número de mitoses por 10 campos de grande aumento em cada caso e a presença de necrose, excetuando àquela presente em áreas ulceradas (Anneroth *et al.*, 1987; Cardesa *et al.*, 2005). Todos os critérios visaram à separação dos tumores usados como controles em exemplos típicos extremos de CECOs bem diferenciados e pouco diferenciados, buscando evitar incluir tumores moderadamente diferenciados.

4.3 Análise imunohistoquímica

Para a realização das reações imunohistoquímicas, os blocos de parafina de cada tumor foram cortados na espessura de 3 μm e os cortes colocados sobre lâminas previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma, EUA). Os cortes foram desparafinizados através de duas trocas de xilol por 10 minutos cada em temperatura ambiente, seguidas de hidratação em soluções com concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 70% e 50%), e posterior lavagem em água corrente. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com H_2O_2 (10 volumes) a 3% por 25 minutos através de cinco incubações de cinco minutos cada, após as quais os cortes foram lavados em água corrente e água destilada. A recuperação antigênica foi feita através da imersão das lâminas em um recipiente contendo uma solução de tampão citrato a 10 mM (pH 6,0) em forno de microondas (Panasonic modelo NN7809BH, 750W) em potência máxima, durante um ciclo de 24 minutos.

Após o resfriamento do líquido, em torno de 20 minutos em temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas em água corrente e colocadas em solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS: *phosphate-buffered saline*). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS contendo 1% de albumina sérica bovina (BSA, Sigma, EUA) e os cortes foram incubados com os anticorpos primários em câmara úmida, por um período de 16 horas a 4°C. A análise imunohistoquímica de todos os casos incluiu os anticorpos primários anti-AE1/AE3, vimentina, desmina, actina de músculo liso, pan-actina, S-100, citoqueratinas 1, 6, 7, 8, 13, 14, 18, 19, EMA, Ki-67 e p53 (Tabela 3). A seguir, os cortes foram lavados com três trocas de PBS e o anticorpo secundário conjugado a peroxidase foi então adicionado (LSAB, Dako, EUA), durante trinta minutos a 37°C. Posteriormente os cortes foram novamente lavados em PBS (3 trocas) e expostos ao sistema estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako, EUA) por mais 30 minutos. Em seguida, após três lavagens com PBS, as reações foram evidenciadas com solução de tetracloreto de 3,3' diaminobenzidina (DAB) a 0,06%

(Sigma, EUA) em PBS contendo H₂O₂ e dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma, EUA) por cinco minutos a 37°C. Os cortes foram lavados em água corrente e contra-corados com hematoxilina de Carazzi por 3 minutos. Seguindo-se nova lavagem com água corrente para eliminar os excessos do corante, os cortes foram desidratados em três trocas de álcool absoluto, diafanizados em xilol e finalmente montados com Bálsamo do Canadá. Todas as reações foram acompanhadas de controle positivo, em tecidos sabidamente positivos para o anticorpo testado, conforme o fabricante, e de controles negativos pela omissão do anticorpo primário.

Tabela 3. Anticorpos primários e respectivos clones, fabricantes e diluições, que foram utilizados na avaliação dos carcinomas de células fusiformes e controles.

Anticorpos primários	Clone	Fabricante	Diluição
AE1/AE3	AE1/AE3	DAKO	1:500
CK1	34βB4	NOVOCASTRA	1:200
CK6	LHK 6 B	NOVOCASTRA	1:200
CK7	OV-TL 12/30	DAKO	1:300
CK8	35βH11	DAKO	1:200
CK13	KS- 1 A 3	NOVOCASTRA	1:400
CK14	LL 002	NOVOCASTRA	1:200
CK18	DC 10	DAKO	1:200
CK19	RCK 108D	DAKO	1:400
Vimentina	Vim 3B4	DAKO	1:400
Desmina	D33	DAKO	1:1000
Actina de músculo liso	1 A 4	DAKO	1:400
Pan-actina	HHF-35	DAKO	1:800
S-100	Policlonal	DAKO	1:10.000
EMA	E 29	DAKO	1:400
Ki-67	MIB-1	DAKO	1:100
P53	DO-7	DAKO	1:200

Os anticorpos primários que foram utilizados como auxílio à revisão dos critérios histopatológicos de diagnóstico do CCF foram anti AE1/AE3, vimentina, desmina, actina de músculo liso, pan-actina e S-100. O diagnóstico de CCF foi confirmado imunohistoquimicamente através do critério da marcação positiva de ambos componentes - células escamosas e fusiformes - para AE1/AE3. Também foi avaliada a marcação positiva do componente de células fusiformes para os demais marcadores, incluindo vimentina, desmina, actina de músculo liso, pan-actina e S-100. A marcação negativa do componente de células fusiformes para AE1/AE3 não descartou o diagnóstico de CCF, e esta informação frente aos achados histopatológicos foi considerada indicativa para a realização de outros marcadores epiteliais, os quais fizeram parte da análise imunohistoquímica dos casos, na busca pela confirmação do diagnóstico de CCF dos mesmos.

A expressão das CKs, e de vimentina, desmina, pan-actina, actina de músculo liso, proteína S-100 e EMA foi classificada baseada na média de células coradas em 10 campos de grande aumento (400x) de cada espécime sob microscópio óptico, não levando em consideração a intensidade. Os critérios de classificação estabelecidos para a expressão imunohistoquímica foram: negativo (incluindo até 10% de positividade das células neoplásicas), e positivo para acima de 10% de positividade das células neoplásicas.

A quantificação das células com positividade nuclear para Ki-67 e p53 foi feita utilizando-se o sistema de análise computadorizada de imagens KS 400 (Karl Zeiss, KONTRON-Eletronik 2.00, Alemanha). O índice de positividade foi obtido através da leitura de 10 campos de grande aumento em cada lâmina, sendo que a escolha da região foi determinada pela integridade estrutural do tecido e positividade mais evidente (quando houve). As células positivas e negativas foram contadas e os resultados expressos em porcentagem de células positivas por campo.

Para todos os marcadores imunohistoquímicos, a positividade foi avaliada independentemente em cada um dos padrões de organização neoplásica

– carcinomatoso e fusocelular - a fim de se obter um imunofenótipo nestas diferentes formas de arquitetura presentes nos CCF.

Os resultados do perfil sócio-demográfico e clínico, dos achados histopatológicos, assim como do perfil imunohistoquímico do CCF foram apresentados de forma descritiva e comparados ao padrão dos CECOs bem diferenciados e pouco diferenciados selecionados como controles.

Essa análise foi realizada por 2 profissionais independentemente (MJR e FRP), e os casos nos quais não houve concordância, foram re-analisados por um terceiro profissional, até que se obtivesse um consenso entre os avaliadores.

A presente pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP e aprovada. O certificado da resolução está anexado ao final desta dissertação.

5. RESULTADOS

5.1 Características sócio-demográficas e clínicas

A Tabela 4 mostra os dados sócio-demográficos dos dez casos com diagnóstico de carcinoma de células fusiformes. Sete casos (70%) estavam localizados na cavidade oral, especialmente em rebordo alveolar/gengiva (3 casos – 30%) e lábio (2 casos - 20%) (Figuras 1 e 2). A idade dos pacientes acometidos pelo CCF variou de 24 a 92 anos (média de 57 anos) e seis casos (60%) acometeram pacientes do sexo masculino. O aspecto clínico de úlcera foi encontrado em 2 casos (20%), nódulo pediculado foi evidente em outros 2 casos (20%) e a associação entre essas duas características clínicas foi vista em 2 casos (20%) (Figuras 1 e 2). Quatro casos (40%) não possuíam informações acerca dos aspectos clínicos. O tempo de evolução da doença era conhecido em 5 casos e variou de 3 a 12 meses com uma média de 6 meses de evolução. Dor estava presente em 3 dos 4 casos (75%) nos quais esta informação estava disponível.

Nos controles, os casos de CECO bem diferenciados foram diagnosticados em pacientes com idade variando de 33 a 78 anos (média de 53 anos) e quatro casos (80%) acometeram pacientes do sexo masculino. A localização preferencial das lesões foi a borda lateral da língua (40% dos casos) e todos os casos apresentaram-se clinicamente como lesões nodulares. O tempo de evolução da doença foi desconhecido em 2 casos e variou de 2 a 5 meses com uma média de 3 meses de evolução nos outros 3 casos. Dor estava presente em 4 casos (80%). Dentre os CECOs pouco diferenciados, a idade dos pacientes variou de 35 a 78 anos, com média de 57 anos. Quatro casos (80%) acometeram homens e dois casos (40%) estavam localizados no assoalho oral. O aspecto clínico de úlcera estava presente em 4 casos (80%) e o tempo de evolução das lesões variou de 1 a 7 meses (média de 3,5 meses) nos 4 casos onde esta informação estava disponível. Dor foi reportada em três casos (60%) (Tabela 5).

Tabela 4. Dados sócio-demográficos e clínicos de 10 casos com diagnóstico prévio de carcinoma de células fusiformes de cabeça e pescoço.

Caso	Idade	Gênero	Local	Aspecto clínico	Evolução	Dor
1	50	M	Rebordo – área retromolar	Lesão hiperplásica, esbranquiçada e ulcerada em forma de folha, com 3,0 cm, pediculada	ND	ND
2	75	F	Rebordo alveolar superior esquerdo	Massa exofítica vegetante ulcerada com cerca de 6,0 cm	3 meses	Sim
3	49	M	Borda anterior da língua	Úlcera com bordas elevadas e centro necrótico com cerca de 3,0 cm	1 ano	Não
4	54	M	Palato e orofaringe	Lesão ulcerada difusa com massas polipóides associadas	3 meses	Sim
5	39	F	Gengiva inferior posterior	Nódulo de aspecto polipóide com 2,5 cm	11 meses	Sim
6	50	M	Lábio superior	ND	ND	ND
7	24	F	Cordas vocais	ND	ND	ND
8	76	M	Subglote	ND	ND	ND
9	92	F	Pele da pálpebra	ND	ND	ND
10	61	M	Lábio inferior	Lesão ulcerada	3 meses	ND

ND – Não disponível



1



2

Figuras 1 e 2. Características clínicas do carcinoma de células fusiformes oral, mostrando massa vegetante ulcerada em rebordo alveolar superior (Figura 1 – caso 2) e úlcera difusa associada a crescimentos polipóides em palato (Figura 2 – caso 4).

Tabela 5. Dados sócio-demográficos e clínicos dos 10 casos de carcinomas espinocelulares orais utilizados como controles.

Caso	Idade	Gênero	Local	Aspecto clínico	Evolução	Dor
Carcinomas espinocelulares bem diferenciados						
1	33	M	Assoalho oral	Nódulo de 2,0 cm	5 meses	Sim
2	52	M	Borda lateral da língua	Nódulo de 2,0 cm	2 meses	Sim
3	78	F	Lábio inferior	Nódulo de 1,0 cm	2 meses	Não
4	54	M	Borda lateral da língua	Nódulo ulcerado de 6,0 cm	ND	Sim
5	48	M	Rebordo alveolar inferior anterior	Nódulo de 5,0 cm	ND	Sim
Carcinomas espinocelulares pouco diferenciados						
1	59	F	Assoalho oral	Úlcera de 1,0 cm	1 mês	Sim
2	54	M	Palato mole	Úlcera de 4,0 cm com bordas elevadas	ND	Não
3	58	M	Assoalho oral	Nódulo com 2,0 cm	2 meses	Não
4	35	M	Rebordo alveolar inferior posterior	Nódulo ulcerado	7 meses	Sim
5	78	M	Borda lateral da língua	Úlcera com bordas elevadas	4 meses	Sim

ND – Não disponível

5.2 Características histopatológicas

A avaliação microscópica dos cortes de CCF corados em HE mostrou a presença de células fusiformes displásicas nos 10 casos (100%), focos de CEC ou displasia epitelial em 9 casos (90%) e a transição franca entre estes dois componentes em 6 casos (60%) (Figuras 3 e 4). Em relação aos critérios

histopatológicos acessórios, as células alongadas bipolares alinhadas em paralelo e as células com núcleo elíptico, vesicular, contendo um ou mais nucléolos foram encontradas em 9 casos (90%) e células gigantes multinucleadas bizarras estavam presentes em 8 casos (80%) (Figuras 5 e 6). Espaços intercelulares proeminentes (Figura 7) também estavam presentes em 8 casos (80%). A formação de osteóide não foi evidenciada em nenhum dos casos e presença de queratina intra-lesional foi encontrada em 1 caso (10%). Dois casos (20%) apresentaram mais que 5 mitoses em média por campo de grande aumento (Figura 8). Necrose foi encontrada em 6 casos (60%) e padrão de crescimento difuso estava presente em todos os casos.

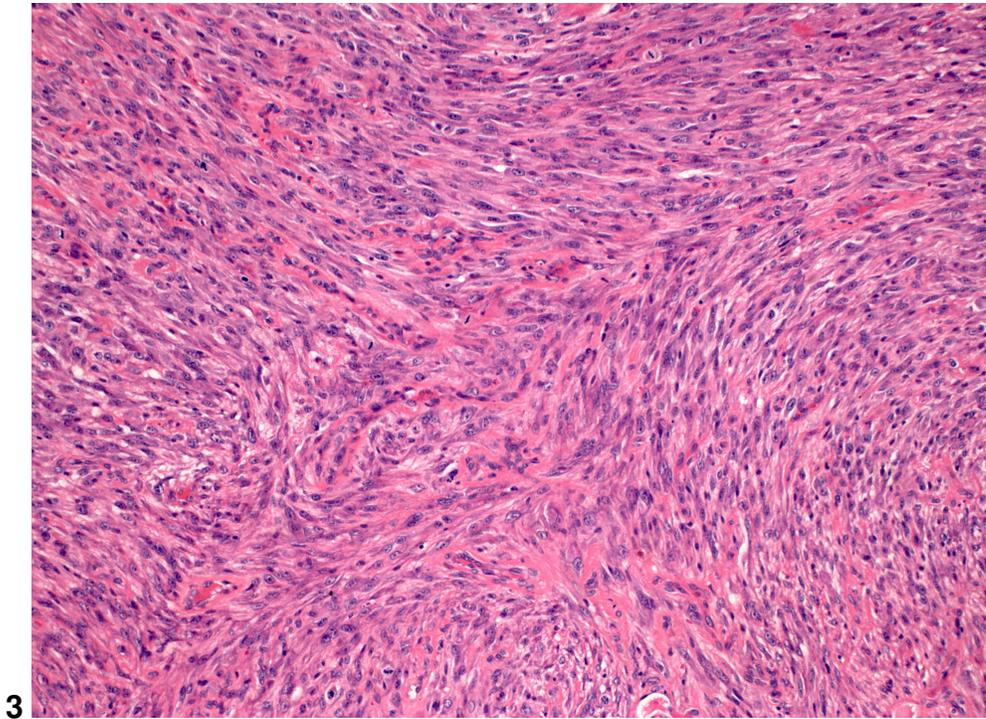
Todos os CECOs bem diferenciados apresentaram formação de pérolas de queratina e nenhum dos casos mostrou áreas de necrose. Apenas 1 caso (20%) mostrou média maior que 5 mitoses por campo de grande aumento e 3 casos (60%) apresentaram padrão de crescimento difuso. Dentre os CECOs pouco diferenciados, nenhum apresentou pérolas de queratina, 2 casos (40%) apresentaram mais que 5 mitoses por campo de grande aumento, 4 casos (80%) apresentaram necrose e 3 casos (60%) apresentaram padrão de crescimento difuso. Todos os casos de CECOs bem e pouco diferenciados apresentavam componente carcinomatoso, mas uma discreta área fusocelular foi vista em um caso de CECO pouco diferenciado, sem entretanto mostrar a presença de transição entre os componentes. Um caso de CECO bem diferenciado e outro de CECO pouco diferenciado apresentaram células alongadas bipolares alinhadas em paralelo, e apenas um caso pouco diferenciado apresentou células com núcleo celular elíptico, vesicular, contendo um ou mais nucléolos. Em dois casos de CECO bem diferenciado havia a presença de espaços intercelulares proeminentes, ao passo que esta característica não foi evidente entre os CECOs pouco diferenciados. Células gigantes bizarras foram vistas em um caso de cada subgrupo de CECO e, assim como nos CCFs, formação de osteóide não estava presente em nenhum caso controle. A média do número de mitoses por campo de

grande aumento foi de 1.94, 1.05 e 2.04 para CCF, CECO bem diferenciado e CECO pouco diferenciado, respectivamente.

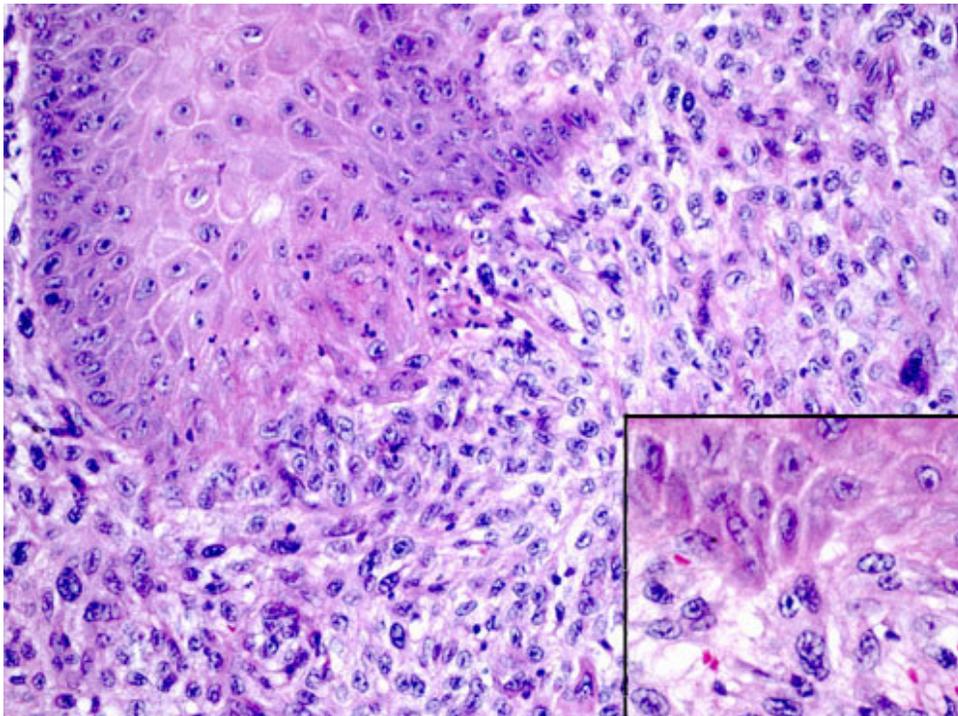
A Tabela 6 mostra a distribuição do percentual de casos apresentando os critérios histopatológicos avaliados nos 3 grupos estudados.

Tabela 6. Frequência percentual dos critérios histopatológicos analisados em carcinomas de células fusiformes (CCF) e carcinomas espinocelulares (CEC) bem diferenciados (bd) e pouco diferenciados (pd).

Crítérios Histopatológicos	CCF (n = 10)	CECB bd (n = 5)	CEC pd (n = 5)
Focos de CEC ou displasia epitelial	90%	100%	100%
Células fusiformes displásicas	100%	0	20%
Transição franca entre os componentes	60%	0	0
Células alongadas bipolares em paralelo	90%	20%	20%
Células com núcleo elíptico, vesicular, contendo um ou mais nucléolos	90%	0	20%
Espaços intercelulares proeminentes	80%	40%	0
Células gigantes bizarras	80%	20%	20%
Formação de osteóide	0	0	0
Pérolas de queratina	10%	100%	0
Média de mitoses por 10 cga (campos de grande aumento)	1,94	1,05	2,04
Necrose	60%	0	80%
Padrão de crescimento difuso	100%	60%	60%

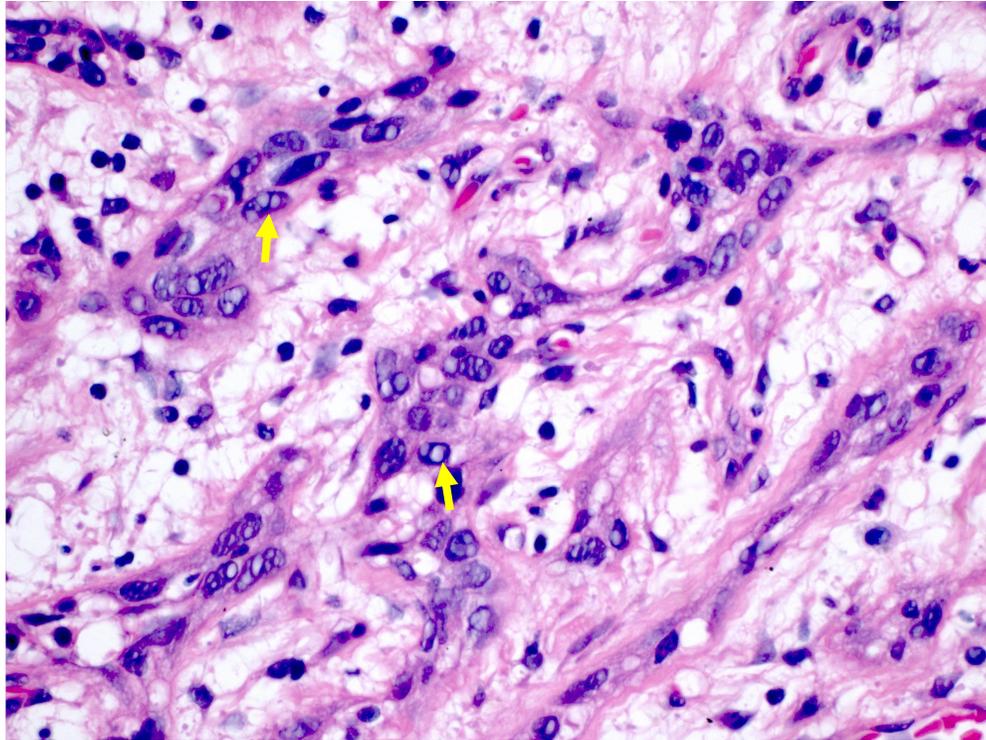


3

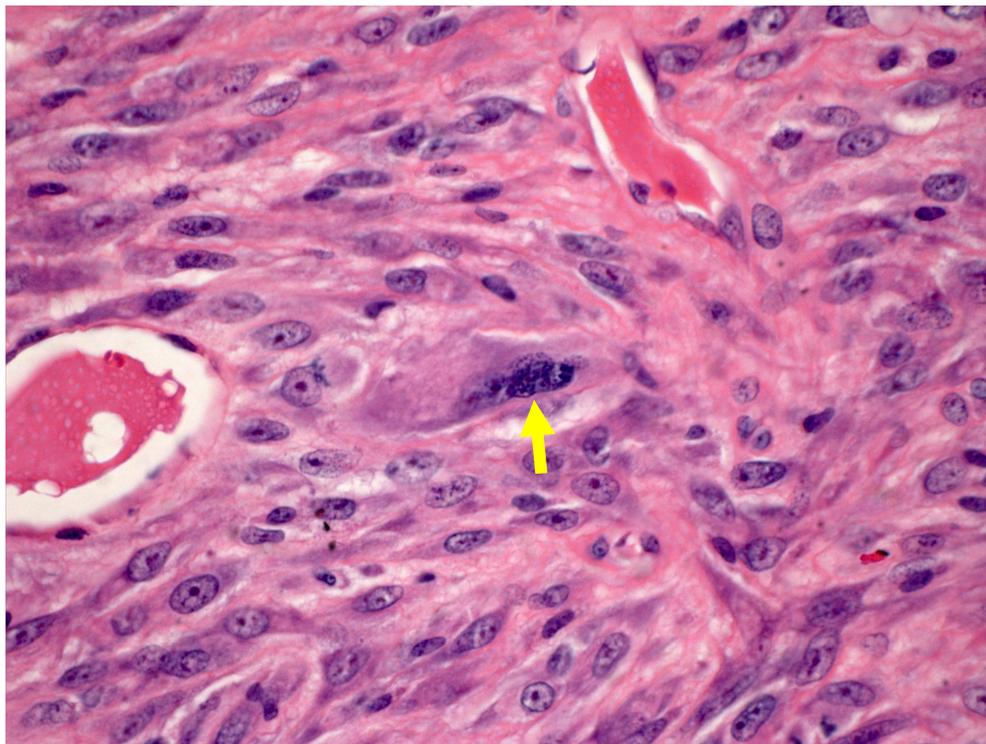


4

Figura 3. Proliferação de células fusiformes displásicas em feixes (Caso 4) (HE, aumento original 100x). **Figura 4.** Área de transição entre os componentes tumorais epiteliais displásicos e de células fusiformes (Caso 10) (Observar detalhe da camada de células basais) (HE, aumento original 200x).

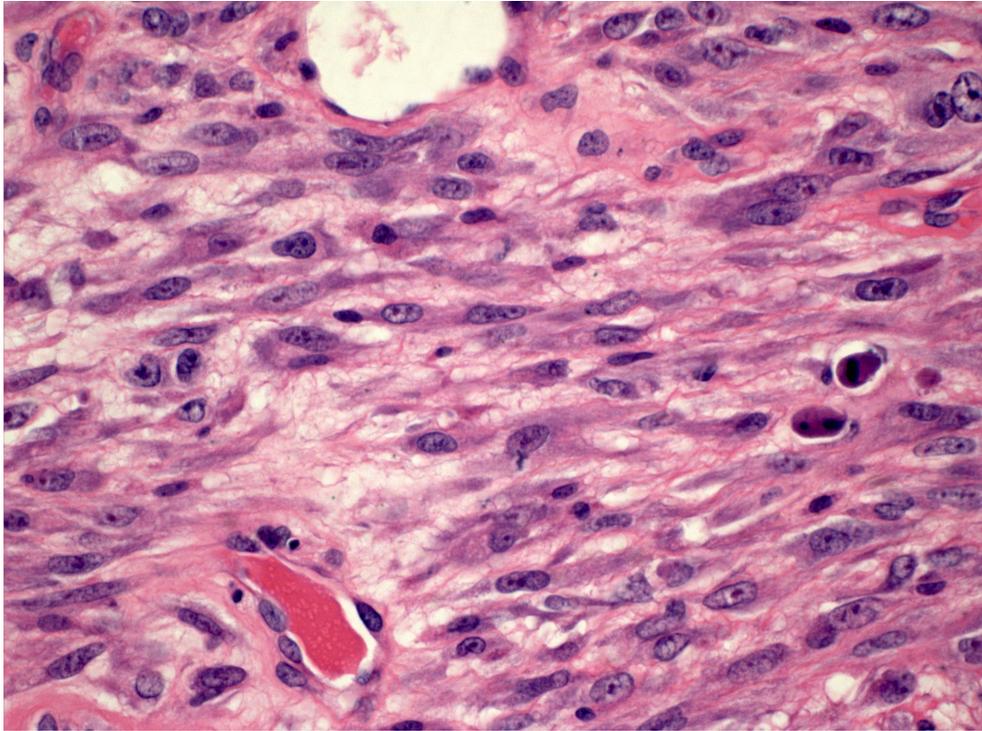


5

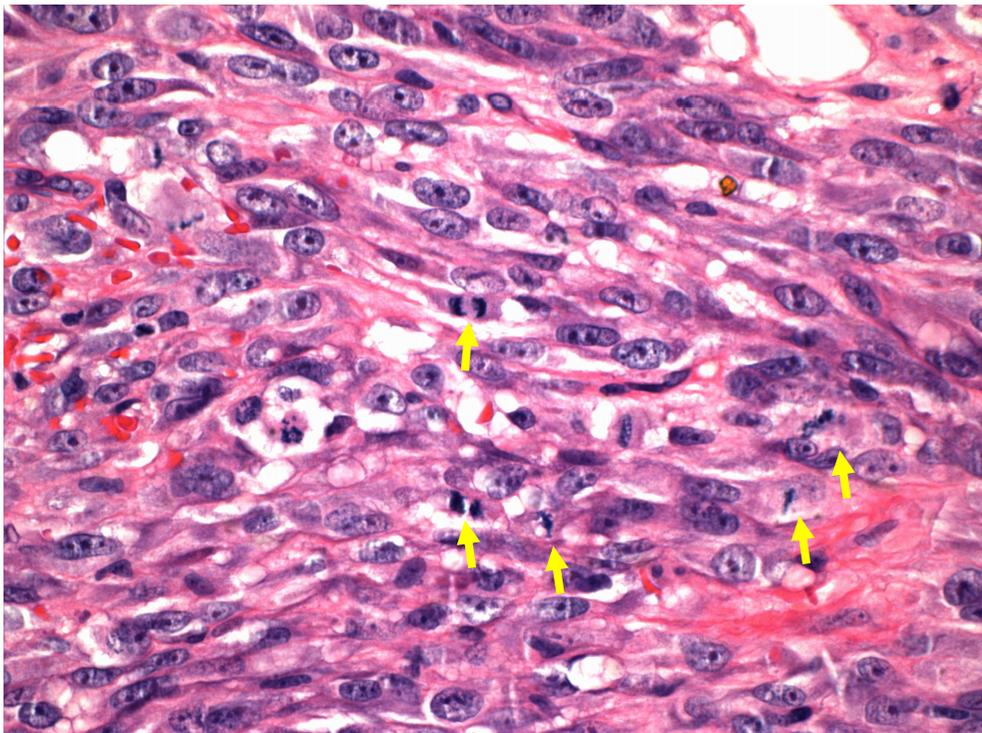


6

Figura 5. Células com núcleo elíptico, alongado e vesicular (setas) (Caso 3) (HE, aumento original 400x). **Figura 6.** Célula gigante multinucleada bizarra (seta) e presença de nucléolos evidentes (Caso 4) (HE, aumento original 400x).



7



8

Figura 7. Espaços intercelulares proeminentes (Caso 4) (HE, aumento original 400x). **Figura 8.** Numerosas células em mitose (setas) (Caso 4) (HE, aumento original 400x).

5.3 Características imunohistoquímicas

A avaliação imunohistoquímica dos CCF foi realizada de forma independente nos dois componentes tumorais – carcinomatoso e fusocelular - e apenas um dos casos (caso 4) não apresentava o componente carcinomatoso superficial disponível para avaliação, visto que a lesão era completamente ulcerada. A expressão de AE1/AE3 foi encontrada no componente carcinomatoso de todos os outros casos e nas áreas fusiformes de 6 casos (60%), sugerindo fortemente o diagnóstico de CCF (Figuras 9 A e B). Nenhum outro marcador deste primeiro grupo (vimentina, pan-actina, actina de músculo liso, desmina e proteína S-100) apresentou positividade no componente carcinomatoso. O componente de células fusiformes apresentou positividade para pelo menos um dos marcadores mesenquimais em todos os casos. Dentre estes, a vimentina foi positiva no componente fusiforme de todos os casos (Figuras 9 C e D) e desmina e proteína S-100 apresentaram as menores freqüências de expressão. Actina de músculo liso e actina músculo-específica mostraram-se expressas no componente fusocelular de 70% e 50% dos casos, respectivamente (Figuras 9 E e F).

Todos os CECOs utilizados como controles apresentaram imunoexpressão de AE1/AE3 e nenhum dos controles apresentou positividade tumoral para os marcadores mesenquimais estudados.

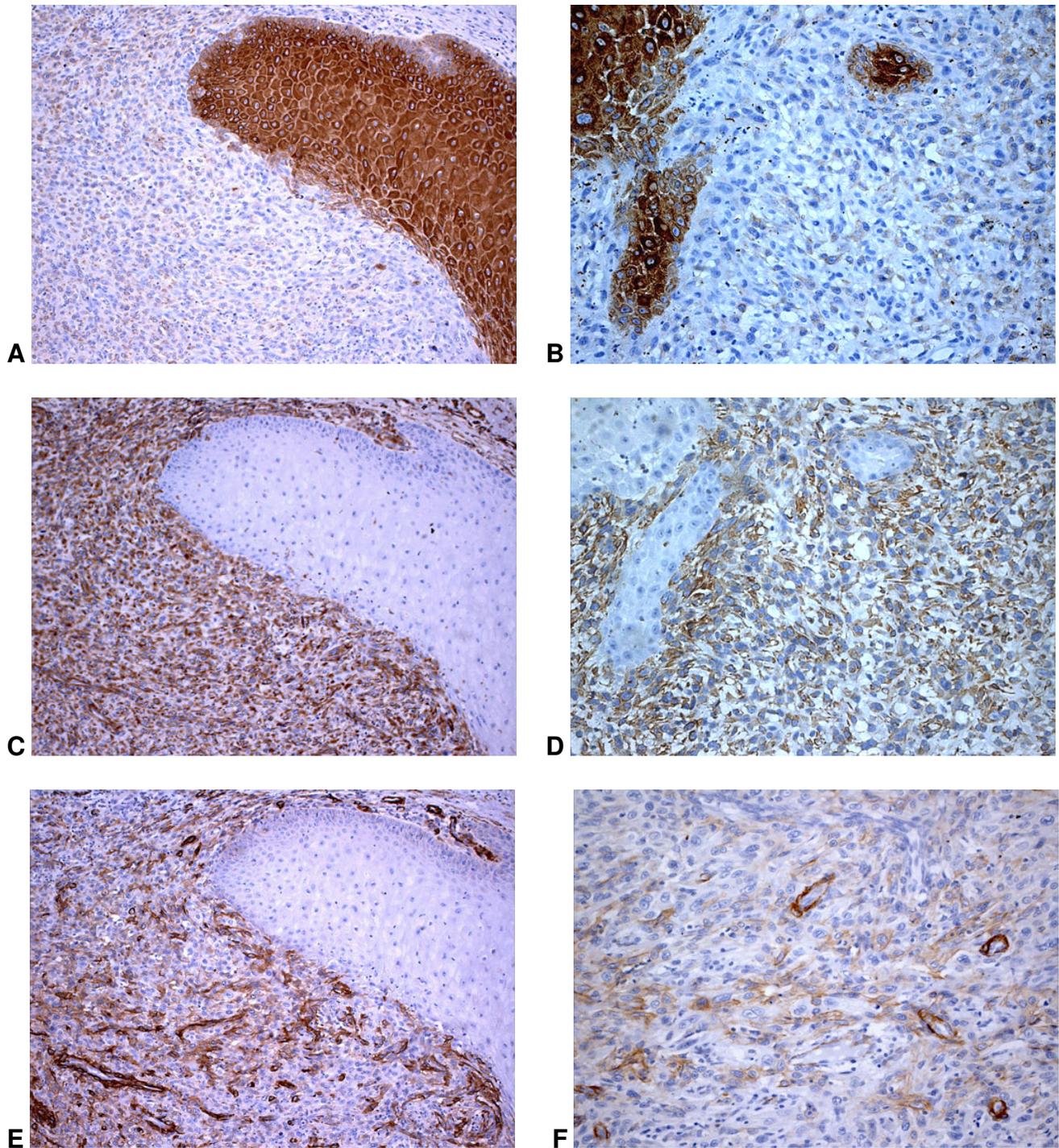


Figura 9. **A e B** – Imunopositividade de AE1/AE3 em ambos os componentes tumorais (Caso 10) (Imunohistoquímica, aumento original 100x e 200x, respectivamente). **C e D** – Imunopositividade de vimentina no componente de células fusiformes (Caso 10) (Imunohistoquímica, aumento original 100x e 200x, respectivamente). **E** – Imunopositividade de actina de músculo liso no componente de células fusiformes (Caso 10) (Imunohistoquímica, aumento original 100x). **F** – Imunopositividade de HHF-35 no componente de células fusiformes (Caso 10) (Imunohistoquímica, aumento original 200x).

A Tabela 7 mostra a expressão de AE1/AE3 e dos marcadores mesenquimais em ambos os componentes dos 10 casos de CCF estudados.

Tabela 7. Perfil imunohistoquímico para AE1/AE3 e para os marcadores mesenquimais dos 10 casos com diagnóstico de carcinoma de células fusiformes.

Caso	AE1/AE3		VIM		DESM		AML		HHF-35		S-100	
	CC	CF	CC	CF	CC	CF	CC	CF	CC	CF	CC	CF
1	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
2	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
3	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+
4	Aus	-	Aus	+	Aus	-	Aus	+	Aus	+	Aus	-
5	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
6	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
7	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
8	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
9	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
10	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-
% total	100*	60	0	100	0	10	0	70	0	50	0	20

AE1/AE3 – Pan-citoqueratinas; VIM – Vimentina; DESM – Desmina; AML – Actina de músculo liso; HHF-35 - Actina músculo específica; S-100 – proteína S-100; CC – componente carcinomatoso; CF – componente de células fusiformes; Aus – Ausente.

*O componente carcinomatoso estava ausente em um caso.

A expressão imunohistoquímica dos demais marcadores epiteliais mostrou imunopositividade importante para a CK6, CK8, CK14 e para EMA em ambos os componentes dos CCFs (Figuras 10 A, B, C e D). Outras CKs, incluindo CK1, CK7, CK18 e CK19 mostraram positividade bastante discreta nestes tumores. À semelhança dos achados nos CCFs, CK6, CK14 e EMA mostraram grande freqüência de positividade nos CECOs bem diferenciados e pouco

diferenciados. Em contraste, CK1, CK13 e CK19 mostraram grande frequência de imunexpressão nos controles, mas não nos CCFs (Tabelas 8 e 9).

Os casos de CCF 2, 3, 5, 7, 9 e 10 apresentaram marcação positiva em ambos os componentes – carcinomatoso e de células fusiformes – para o marcador epitelial AE1/AE3, confirmando o diagnóstico de carcinoma de células fusiformes. A análise imunohistoquímica dos marcadores epiteliais adicionais confirmou o diagnóstico de CCF no caso número 1, em virtude da positividade de ambos os componentes celulares para CK6 e CK14, e do caso 8, com positividade de ambos os componentes para CK6 e CK8. O caso 6 apresentou imunomarcção de AE1/AE3 no componente carcinomatoso, sendo considerado carcinoma de células fusiformes, a despeito da ausência de imunomarcção epitelial no componente fusocelular. O caso 4 nos trouxe dúvidas quanto ao diagnóstico, especialmente em virtude da ausência do componente epitelial. Mesmo com a ausência de imunomarcção do componente fusocelular com os marcadores epiteliais, a avaliação dos demais marcadores imunohistoquímicos, em adição ao padrão epitelíóide das células tumorais, conferiu o diagnóstico de CCF para este caso (Tabela 9).

Tabela 8. Frequência da imunexpressão de citoqueratinas (CKs) e do antígeno epitelial de membrana (EMA) em carcinomas de células fusiformes (CCF) e carcinomas espinocelulares orais (CECO) bem diferenciados (bd) e pouco diferenciados (pd).

Marcador	CCFs (n = 10)		CECOs bd (n = 5)	CECOs pd (n = 5)
	CC (n = 9)*	CF (n = 10)*		
CK1	11%	0	100%	20%
CK6	88%	60%	100%	100%
CK7	0	10%	20%	40%
CK8	66%	60%	80%	60%
CK13	44%	10%	100%	60%
CK14	88%	50%	100%	100%
CK18	0	20%	0	20%
CK19	22%	10%	40%	80%
EMA	88%	50%	100%	100%

* CC – componente carcinomatoso; CF – componente de células fusiformes; Um caso de CCF não apresentava o componente carcinomatoso.

Tabela 9. Perfil imunohistoquímico para os marcadores epiteliais dos 10 casos com diagnóstico de carcinoma de células fusiformes.

Caso	AE1/AE3		CK1		CK6		CK7		CK8		CK13		CK14		CK18		CK19		EMA	
	CC	CF	CC	CF	CC	CF	CC	CF	CC	CF	CC	CF	CC	CF	CC	CF	CC	CF	CC	CF
1	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
2	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
3	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
4	Aus	-	Aus	-	Aus	-	Aus	-	Aus	-	Aus	-	Aus	-	Aus	-	Aus	-	Aus	-
5	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-
6	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
7	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+
8	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+
9	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+
10	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
% total	100*	60	11	0	88	60	0	10	66	60	44	10	88	50	0	20	22	10	88	50

AE1/AE3 – Pan-citoqueratinas; CK – Citoqueratina; CC – Componente carcinomatoso; CF – Componente de células fusiformes; Aus – Ausente.

* O componente carcinomatoso estava ausente em 1 caso.

Os CCFs apresentaram índices de expressão de p53 e de Ki-67 intermediários em relação àqueles encontrados nos CECOs, em ambos os componentes (Tabela 10) (Figuras 10 E e F).

Tabela 10. Índice de marcação de p53 e Ki-67 nos componentes carcinomatoso (CC) e de células fusiformes (CF) dos carcinomas de células fusiformes (CCF) e nos carcinomas espinocelulares orais (CECO) bem diferenciados (bd) e pouco diferenciados (pd).

Marcadores	CCFs (n = 10)		CECOs (n = 10)	
	CC (n = 9)	CF (n = 10)	CECOs bd (n = 5)	CECOs pd (n = 5)
p53	36,8%	32,8%	24%	63%
Ki-67	29%	34,4%	24%	53%

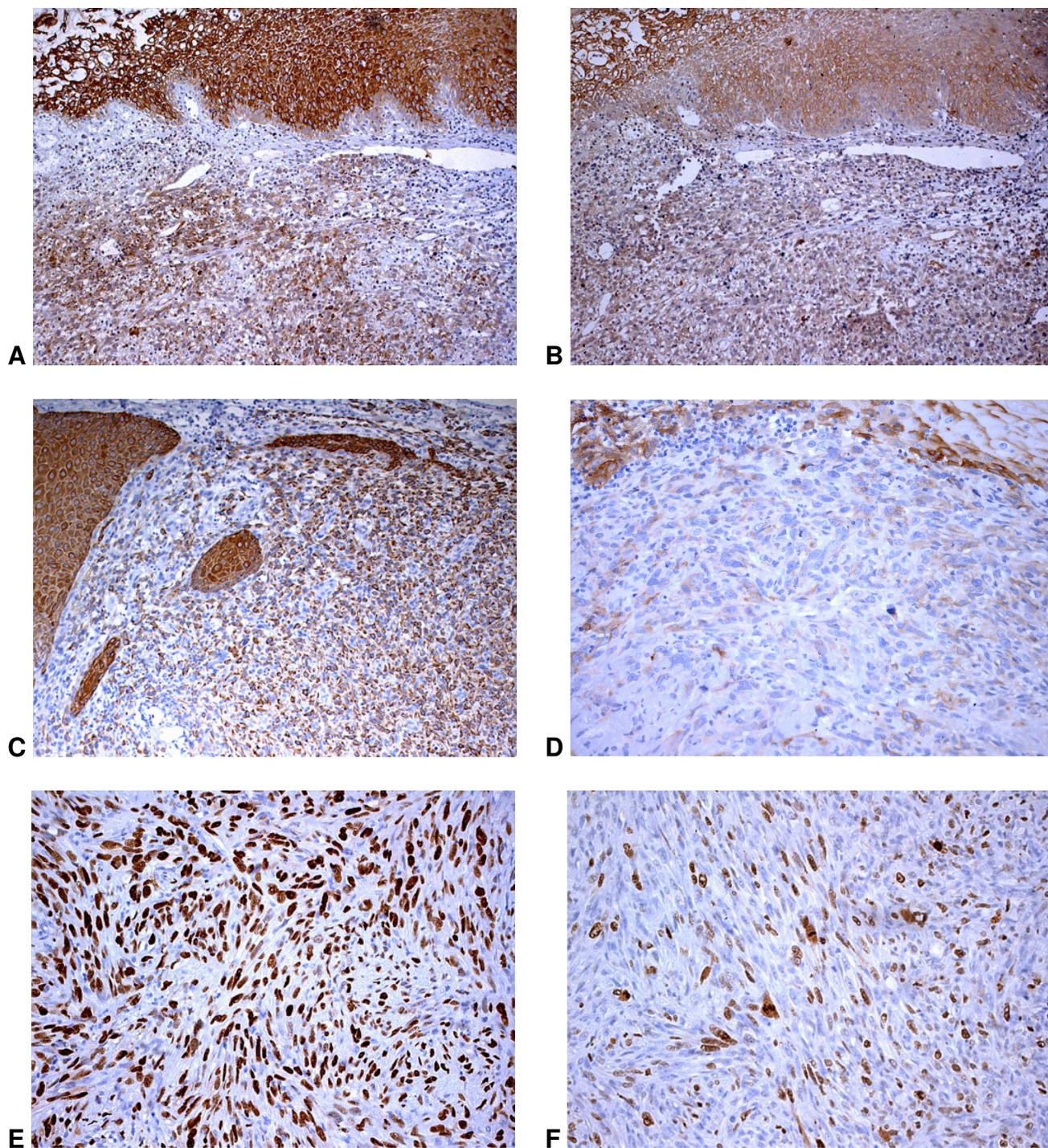


Figura 10. **A** – Imunopositividade para CK6 em ambos os componentes (Caso 2) (Imunohistoquímica, aumento original, 100x). **B** – Imunopositividade para CK8 em ambos os componentes (Caso 2) (Imunohistoquímica, aumento original, 100x). **C** – Imunopositividade para CK14 em ambos os componentes (Caso 10) (Imunohistoquímica, aumento original, 100x). **D** – Imunopositividade para EMA em ambos os componentes e presença de epitélio displásico no canto superior esquerdo (Caso 9) (Imunohistoquímica, aumento original, 200x). **E e F** – Marcação positiva no componente fusocelular para p53 e Ki-67, respectivamente (Caso 9) (Imunohistoquímica, aumento original, 200x).

6. DISCUSSÃO

O CCF é uma variante rara do CEC, caracterizado pela presença de dois componentes morfológicos distintos – carcinomatoso e fusocelular –, e acredita-se que ambos compartilhem a mesma origem epitelial (Cardesa & Zidar, 2005). A maioria dos trabalhos relata ocorrência mais comum na laringe, seguida da cavidade oral, esôfago e pulmão (Lane, 1957; Lichtiger *et al.*, 1970; Leifer *et al.*, 1974; Leventon & Evans, 1981; Ellis *et al.*, 1987; Wenig & Pilch, 2000; Slootweg & Richardson, 2001; Choi *et al.*, 2003; Yanamoto *et al.*, 2007). O CCF oral está predominantemente relatado no lábio inferior, na língua e no rebordo alveolar (Takata *et al.*, 1991; Ellis & Corio *et al.*, 1980; Rosai, 2004; Su *et al.*, 2006), em concordância com nossos achados que mostraram predileção pelo rebordo alveolar/gengiva e pelos lábios, mostrando perfil discretamente diferente do CECOs convencionais, que localizam-se preferencialmente na borda lateral de língua e no assoalho oral (Johnson *et al.*, 2005).

O CCF ocorre mais comumente em homens (Wenig & Pilch, 2000; Cardesa & Zidar, 2005), também à semelhança dos nossos achados. Apresenta uma distribuição uniforme de acometimento entre a quinta e nona décadas de vida, com média em torno dos 65 anos (Leventon & Evans, 1981; Ellis *et al.*, 1987; Choi *et al.*, 2003), e na cavidade oral afeta pacientes entre a quarta e oitava décadas, com média de idade em torno dos 56 anos (Ellis & Corio, 1980; Su *et al.*, 2006), valor muito próximo àquele encontrado em nossos resultados. Nossos controles, assim como a literatura, mostram médias etárias bastante semelhantes àquelas encontradas nos CCF orais (Ellis & Corio, 1980; Su *et al.*, 2006).

O aspecto clínico mais característico do CCF é uma massa exofítica polipóide com a superfície freqüentemente ulcerada (Cardesa & Zidar, 2005), entretanto os CCFs orais podem apresentar aspecto mais heterogêneo, variando de lesões exofíticas polipóides a úlceras infiltrativas (Ellis & Corio, 1980; Takata *et al.*, 1991), achado também evidenciado em nossos casos. A média do tempo de evolução do CCF oral encontra-se em torno de 9 meses e a dor está presente em

cerca de 30% dos pacientes (Ellis & Corio, 1980; Choi *et al.*, 2003). Nossos resultados mostraram tempo de evolução ligeiramente menor e a presença mais marcante de dor, entretanto este parâmetro só estava disponível em 4 dos 10 casos estudados.

Em relação às características clínicas e sócio-demográficos, nosso estudo apresentou resultados referentes à idade, tempo de evolução e presença de dor que aproximam os CCFs dos CECOs pouco diferenciados, ao passo que apenas a localização anatômica das lesões foi similar entre os CCFs e os CECOs bem diferenciados. Os três grupos estudados apresentaram dados similares em relação ao gênero e perfil relativamente heterogêneo em relação ao aspecto clínico das lesões.

O termo carcinoma de células fusiformes enfatiza a presença de células fusocelulares em associação a um CEC. Histologicamente, algumas vezes o componente carcinomatoso do CCF não está presente na amostra conferindo graus variáveis de dificuldade diagnóstica (Slootweg & Richardson, 2004). A grande maioria dos casos (84-100%) de CCF relatados apresenta ambos os componentes na amostra e a transição franca entre eles é mencionada em poucos casos (Ellis & Corio, 1980; Leventon & Evans, 1981; Ellis *et al.*, 1987; Takata *et al.*, 1991; Choi *et al.*, 2003; Yanamoto *et al.*, 2007). Nosso estudo demonstrou resultado similar com a presença de ambos os componentes em 90% dos casos, mas a transição franca entre os mesmos esteve presente em 60% do casos, tendo sido considerada um importante critério diagnóstico.

Em relação aos critérios histopatológicos, nosso trabalho demonstrou que os CCFs apresentaram diversas características microscópicas úteis em sua diferenciação dos CECO convencionais bem diferenciados e pouco diferenciados, especialmente a transição entre os componentes neoplásicos carcinomatoso e fusiforme e a presença das células fusiformes displásicas. Ainda, os CCFs apresentaram três critérios similares aos dos CECOs pouco diferenciados: presença de necrose, ausência de pérolas de queratina e média do número de mitoses por 10 campos de grande aumento. Nossos achados permitem sugerir

que os critérios histopatológicos investigados, quando analisados em conjunto, permitem suspeitar da possibilidade microscópica de CCF, especialmente quando observamos dois componentes (carcinomatoso e fusiforme) displásicos e presença de transição entre eles. Ainda, as áreas de necrose, a discreta presença de pérolas de queratina e o número de mitoses, aproxima os CCFs dos CECOs pobremente diferenciados.

A imunohistoquímica auxilia o diagnóstico do CCF, especialmente nos casos onde o componente carcinomatoso está ausente (Wenig & Pilch, 2000). O componente carcinomatoso é positivo para AE1/AE3 em virtualmente 100% dos casos, enquanto que o componente fusocelular demonstra imunomarcação em cerca de 40 a 85% dos casos (Cardesa & Zidar, 2005), dados confirmados por nossos resultados. Em relação aos marcadores mesenquimais, a marcação imunohistoquímica nos componentes do CCF é bastante variável. Em geral se observa um padrão de positividade do componente fusocelular para vimentina, pan-actina (HHF-35) focalmente, bem como a negatividade para actina de músculo liso, desmina e proteína S-100, enquanto o componente de células escamosas apresenta negatividade para estes marcadores (Takata *et al.*, 1991; Munakata *et al.*, 1998; Shibuya *et al.*, 2000; Rizzardi *et al.*, 2003). Em nosso trabalho, o componente carcinomatoso foi negativo para todos os marcadores mesenquimais e o componente fusocelular foi positivo para vimentina em todos os casos, o que foi compatível com os achados da literatura. Da mesma forma, um caso (10%) em nossa amostra demonstrou positividade para desmina e 50% dos casos apresentaram positividade para HHF-35, resultados também considerados similares aos dados da literatura. Entretanto, o anticorpo AML apresentou marcação distinta, com positividade em 70% dos casos. Este resultado foi considerado compatível com o diagnóstico de CCF, tendo em vista a esperada positividade para marcadores miogênicos (Slootweg & Richardson, 2001) e alguns resultados imunohistoquímicos e ultra-estruturais em CCFs extra-orais que encontraram resultados similares, inclusive sugerindo um processo de diferenciação miofibroblástica nas células fusiformes tumorais (Handra-Luca *et al.*,

2001; Eyden & Banerjee, 2002; Altrabulsi *et al.*, 2006). A marcação positiva para S-100 em 20% dos casos foi considerada relativamente alta, mas compatível com a literatura, já que embora os resultados imunohistoquímicos em CCFs intra-orais relatem de maneira geral negatividade para S-100, alguns estudos incluindo CCFs extra-orais apresentam positividade nas células fusocelulares em cerca de 5% dos casos para este marcador (Maeda *et al.*, 1996; Thompson *et al.*, 2002; Folpe & Cooper, 2007).

A expressão de diferentes tipos de marcadores epiteliais em ambos os componentes celulares é uma ferramenta utilizada para o diagnóstico de CCF e demonstra positividade em 86% dos casos (Takata *et al.*, 1991) e ênfase especial é dada aos anticorpos anti-EMA e CKs 1 e 18 (Thompson *et al.*, 2002; Cardesa & Zidar, 2005; Lewis Jr *et al.*, 2005). Nosso trabalho demonstrou imunopositividade importante para EMA, resultado similar ao da literatura, entretanto a marcação para CKs 1 e 18 se mostrou bastante discreta. Além do anticorpo anti-EMA, as CKs que apresentaram importante imunopositividade foram CKs 6, 8 e 14, contrariamente à marcação para CK8 reportada na literatura (Altrabulsi *et al.*, 2006) e compatível com os achados para CKs 6 e 14 em CCFs extra-orais em outras referências (Sigel *et al.*, 2001; Lin *et al.*, 2003; Folpe & Cooper, 2007). Em relação aos achados imunohistoquímicos para diferentes marcadores epiteliais, a maioria dos resultados dos CCFs se mostrou similar aos dos CECOs pouco diferenciados devido à maior porcentagem de marcação positiva em ambos para os marcadores CK1, CK8, CK13 e CK18. Apenas as marcações para CK7 e CK19 apresentaram valores próximos entre os CCFs e os CECOs bem diferenciados e os resultados imunohistoquímicos para CK6, CK14 e EMA não apresentaram diferenças que permitissem a comparação entre os grupos estudados. Esses resultados permitem concluir que com o uso de diferentes tipos de marcadores monoclonais epiteliais, o perfil imunohistoquímico de CCFs assemelha-se ao dos CECOs pouco diferenciados.

O diagnóstico de CCF é baseado nas características histopatológicas e, especialmente onde há ausência do componente carcinomatoso, a evidência

imunohistoquímica é necessária para o diagnóstico definitivo (Wenig & Pilch, 2000). Em nosso estudo, 60% dos casos sugeriram fortemente o diagnóstico de CCF nos achados histopatológicos com a demonstração de ambos os componentes e a transição franca entre eles (casos 1, 3, 5, 7, 9 e 10) e os achados imunohistoquímicos foram essenciais em 40% dos casos (2, 4, 6 e 8), nos quais esta distinção não se fazia tão clara. Destes 4 últimos casos, apenas o caso 2 demonstrou imunopositividade para AE1/AE3 nos dois componentes, comprovando a natureza epitelial de ambos e confirmando o diagnóstico de CCF. A partir deste ponto, o estudo imunohistoquímico de diferentes marcadores epeliais foi necessário para o auxílio no diagnóstico dos três casos restantes (4, 6 e 8), e este achado foi similar ao encontrado por Ansari-Lari *et al.* (2002) que em sua amostra encontraram 17% dos casos que não obtiveram imunopositividade para AE1/AE3 para ambos os componentes de CCFs extra-orais. Desta forma, o caso 8 apresentou o diagnóstico concluído de CCF devido à marcação positiva de ambos os componentes para CKs 6 e 8. Os casos 4 e 6 não apresentaram marcação no componente fusocelular para os marcadores epeliais, e houve marcação importante neste componente para AML e S100, respectivamente nos casos 4 e 6. O principal diagnóstico diferencial no caso 4 consistiu em um leiomiossarcoma, sendo este diagnóstico excluído pela ausência da morfologia nuclear “em forma de charuto” e de uma camada fibrosa interposta entre a lesão e o tecido epitelial de revestimento (Fletcher, 2000; Slootweg & Richardson, 2001). O caso 6 apresentou dois principais diagnósticos diferenciais: tumor maligno da bainha do nervo periférico variante epitelióide e melanoma de células fusiformes, e embora os resultados imunohistoquímicos não tenham sido elucidativos, o aspecto morfológico marcadamente epitelióide das células fusiformes conferiu o diagnóstico final de CCF. Nosso estudo reforça a necessidade da extensa revisão dos critérios histopatológicos morfológicos em adição a utilização de marcadores imunohistoquímicos no diagnóstico do CCF. Ainda, sugere que a utilização de marcadores epeliais específicos, incluindo anticorpos monoclonais para

citoqueratinas 6, 8, 14 e EMA pode ser útil como ferramenta adicional aos achados da pan-citoqueratina AE1/AE3 no diagnóstico destes tumores.

A marcação imunopositiva para p53 é encontrada em cerca de 78% dos casos de CCF, sendo similar nos dois componentes morfológicos, embora alguns casos possam apresentar discrepância de marcação positiva de p53 entre os componentes, com valores de 12% para o componente fusocelular e 76% para o componente carcinomatoso (Ansari-Lari *et al.*, 2002; Rizzardi *et al.*, 2003; Yanamoto *et al.*, 2007). Nosso estudo apresentou índice de marcação de 36,8% em ambos os componentes dos CCFs, valor considerado compatível com os dados da literatura, incluindo a concordância entre os índices dos componentes morfológicos. A marcação imunopositiva para Ki-67 é encontrada em padrão heterogêneo similar à marcação de p53 com variação entre os componentes morfológicos tumorais e índice com média que varia 10-20% no componente fusocelular e 0-90% no componente carcinomatoso, a despeito da escassez de trabalhos que tenham avaliado os índices de proliferação celular nos CCFs orais (Rizzardi *et al.*, 2003; Yanamoto *et al.*, 2007). Nosso trabalho mostrou índices de expressão imunohistoquímica de Ki-67 concordantes com a literatura, sendo semelhantes no componente fusocelular em relação ao componente carcinomatoso. Os valores de marcação de p53 e Ki-67 para ambos os componentes dos CCFs em nosso estudo foram maiores que àqueles encontrados nos CECOs bem diferenciados e menores que os valores encontrados nos CECOs pouco diferenciados. Esse achado, associado a maior similaridade entre os padrões morfológicos e no perfil de expressão de CKs, parece aproximar o CCF dos CECOs pouco diferenciados, confirmando-o como uma neoplasia agressiva de alto grau de malignidade, à semelhança do comportamento descrito na literatura.

O CCF consiste em uma variante rara do CEC, especialmente na cavidade oral, e o número limitado de séries de casos que apresentam detalhada descrição morfológica e imunohistoquímica representa um obstáculo à

compreensão de seus critérios diagnósticos, reforçando a necessidade de um número maior de estudos para o melhor entendimento desta entidade.

7. CONCLUSÕES

1. A expressão imunohistoquímica dos marcadores epiteliais AE1/AE3, CK6, CK8, CK14 e EMA mostrou imunopositividade importante em ambos os componentes dos CCFs apresentando-se como uma opção importante no auxílio ao diagnóstico deste tumor.

2. Os achados morfológicos e imunohistoquímicos, incluindo a expressão de p53 e Ki-67, dos CCFs estudados mostraram maior proximidade entre estes tumores e os CECOs pouco diferenciados.

3. O CCF oral apresentou predileção por homens adultos na 6ª década de vida, podendo manifestar-se através de úlceras infiltrativas ou lesões polipóides ulceradas, usualmente dolorosas, localizadas preferencialmente no rebordo alveolar e lábios.

REFERÊNCIAS *

Abbas NF, Labib El-Sharkawy S, Abbas EA, Abdel Monem El-Shaer M. Immunohistochemical study of p53 and angiogenesis in benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103(3): 385-90.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Citoesqueleto. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, editores. *Biologia Molecular da Célula.* 4ª ed. New York: Garland Publishing; 2004. p.907-82.

Alfredo E, de Pádua JM, Vicentini EL, Marchesan MA, Comelli Lia RC, da Cruz Perez DE *et al.* Oral undifferentiated high-grade pleomorphic sarcoma: report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(1): e37-40.

Altrabulsi B, Carrizo F, Luna MA. Spindle basaloid squamous carcinoma of the upper aerodigestive tract: immunohistochemical and clinicopathological study of three cases. *Ann Diagn Pathol.* 2006; 10(3): 149-53

Alves FA, Yorioka CW, Graner E, Vargas PA, Lopes MA, Nishimoto IN, Kowalski LP, Coletta RD. Valor prognóstico de p53 e PCNA em carcinomas espinocelulares da cavidade oral. *J Bras Clin Odontol Int* 2004; 8(47): 397-403.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res.* 1987; 95(3): 229-49.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas nas normas do Internacional Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

Ansari-Lari MA, Hoque MO, Califano J, Westra WH. Immunohistochemical p53 expression patterns in sarcomatoid carcinomas of the upper respiratory tract. *Am J Surg Pathol.* 2002; 26(8): 1024-31.

Battifora H. Spindle cell carcinoma: ultrastructural evidence of squamous origin and collagen production by the tumor cells. *Cancer.* 1976; 37(5): 2275-82.

Berkovitz BK, Barret AW. Cytokeratin intermediate filaments in oral and odontogenic epithelia. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol.* 1998; 40(1): 4-23.

Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Diseases.* 1998; 4(2): 70-77.

Cardesa A, Gale N, Nadal A, Zidar N. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics – Head and Neck Tumors.* IARC Press: Lyon; 2005. p. 118-121.

Cardesa A, Zidar N. Spindle cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editores. *World health organization classification of tumours. Pathology & genetics – head and neck tumors.* IARC Press: Lyon; 2005. p. 127-8.

Carlos De Vicente J, Herrero-Zapatero A, Fresno MF, López-Arranz JS. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. 2002; 38(3): 301-8.

Coulombe PA, Omary MB. “Hard” and “Soft” principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; 14(1): 110-22.

Choi HR, Sturgis EM, Rosenthal DI, Luna MA, Batsakis JG, El-Naggar AK. Sarcomatoid carcinoma of the head and neck: molecular evidence for evolution and progression from conventional squamous cell carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2003; 27(9): 1216-20.

Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathology*. 2002; 40(5): 403-39.

Chuang R, Crowe DL. Understanding genetic progression of squamous cell carcinoma in a mouse model of head and neck cancer. *Int J Oncol*. 2007; 30(5): 1279-87.

Cotrim P, Fregnani ER, Villalba H, Vargas PA, Almeida OP de, Coletta RD. Carcinoma espinocelular bucal e suas variantes. *BCI*. 2001; 8(32): 313-19.

Dayan D, Nasrallah V, Vered M. Clinico-pathologic correlations of myofibroblastic tumors of the oral cavity: 1. Nodular fasciitis. *J Oral Pathol Med*. 2005; 34(7): 426-35.

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

De Pianto D, Coulombe PA. Intermediate filaments and tissue repair. *Exp Cell Res*. 2004; 301(1): 68-76.

Dei Tos AP. Classification of pleomorphic sarcomas: where are we now? *Histopathology*. 2006; 48(1): 51-62.

Dry SM, Jorgensen JL, Fletcher CDM. Leiomyosarcoma of the oral cavity: an unusual topographic subset easily mistaken for non mesenchymal tumours. *Histopathology*. 2000; 36(3): 210-20.

Ellis GL, Corio RL. Spindle cell carcinoma of the oral cavity. A clinicopathologic assessment of fifty-nine cases. *Oral Surg*. 1980; 50(6): 523-34.

Ellis GL, Langloss JM, Heffner DK, Hyams VJ. Spindle-cell carcinoma of the aerodigestive tract: an immunohistochemical analysis of 21 cases. *Am J Surg Pathol*. 1987; 11(5): 335-342.

Eyden B, Banerjee SS. Spindle-cell squamous carcinoma exhibiting myofibroblastic differentiation. A study of two cases showing fibronexus junctions. *Virchows Arch*. 2002; 440(1): 36-44.

Fernandez B, Lund J, Meyers F. Epithelial membrane antigen expression in benign and malignant squamous epithelium of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1987; 97(3): 288-93.

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.

Fisher C, de Bruijn DRH, Geurts van Kessel A. Synovial sarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editores. *World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone*. Lyon: IARC Press; 2002. p. 200-4.

Fletcher CDM. Peripheral neuroectodermal tumors. In: Fletcher CDM, organizador. Diagnostic histopathology of tumors. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000a. v.2. p.1679-1711.

Fletcher CDM. Soft tissue tumors. In: Fletcher CDM, organizador. Diagnostic histopathology of tumors. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2000b. v.2. p.1473-1540.

Fletcher CDM. The evolving classification of soft tissue tumours: an update based on the new WHO classification. *Histopathology*. 2006; 48(1): 3-12.

Folpe AL, Cooper K. Best practices in diagnostic immunohistochemistry: pleomorphic cutaneous spindle cell tumors. *Arch Pathol Lab Med*. 2007; 131(10): 1517-24.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984; 133(4): 1710-5.

Gleason BC, Fletcher CD. Myoepithelial carcinoma of soft tissue in children: an aggressive neoplasm analyzed in a Series of 29 cases. *Am J Surg Pathol*. 2007; 31(12): 1813-24.

Gnepp DR. Carcinosarcoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editores. World health organization classification of tumours. Pathology & genetics – head and neck tumors. IARC *Press*: Lyon; 2005. p. 244.

Goebel WM, High CJ, Kiviat J, Stoeckel DC. Anterior buccal mucosal mass. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004; 97(6): 667-71.

Gupta R, Singh S, Hedau S, Nigam S, Das BC, Singh I *et al.* Spindle cell carcinoma of head and neck: an immunohistochemical and molecular approach to its pathogenesis. *J Clin Pathol.* 2007; 60(5): 472-5.

Handra-Luca A, Terris B, Couvelard A, Molas G, Degott C, Flejou JF. Spindle cell squamous carcinoma of the oesophagus: an analysis of 17 cases, with new immunohistochemical evidence for a clonal origin. *Histopathology.* 2001; 39(2): 125-32.

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

Hessel AC, Byers RM. Desmoplastic melanoma of the lip. *Head Neck.* 2002; 24(6): 605-8.

Jay A, Piper K, Farthing PM, Carter J, Diwakar A. Low-grade myofibroblastic sarcoma of the tongue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radio Endod.* 2007; 104(5): e52-8.

Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schmid S, MacDonald DG *et al.* Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editores. *World health organization classification of tumours. Pathology & genetics – head and neck tumors.* IARC Press: Lyon; 2005. p. 168-75.

Jordan RC, Regezi JA. Oral spindle cell neoplasms: a review of 307 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003; 95(6): 717-24.

Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA *et al.* Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. *Histopathology.* 2007; 51(6): 849-53.

Kessler S, Bartley MH. Spindle cell squamous carcinoma of the tongue in the first decade of life. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1988; 66(4): 470-4.

Kill JR. Localization of the Ki-67 antigen within the nucleolus. Evidence for a fibrillar-deficient region of the dense fibrillar component. *J Cell Sci.* 1996; 109(Pt 6): 1253-63.

Kirfel J, Magin TM, Reichelt J. Keratins: a structural scaffold with emerging functions. *Cell Mol Life Sci.* 2003; 60(1): 56-71.

Kudo Y, Ogawa I, Kitagawa M, Kitajima S, Samadarani Siriwardena BS, Aobara N *et al.* Establishment and characterization of a spindle cell squamous carcinoma cell line. *J Oral Pathol Med.* 2006; 35(8): 479-83.

Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tanaka T, Tomoyose T *et al.* The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34(10): 602-7.

Lane N. Pseudosarcoma (polypoid sarcoma-like masses) associated with squamous-cell carcinoma of the mouth, fauces, and larynx; report of ten cases. *Cancer.* 1957; 10(1): 19-41.

Lauwers GY, Grant LD, Scott GV, Carr NJ, Sobin LH. Spindle cell squamous carcinoma of the esophagus: analysis of ploidy and tumor proliferative activity in a series of 13 cases. *Hum Pathol.* 1998; 29(8): 863-8.

Leifer C, Miller AS, Putong PB, Min BH. Spindle-cell carcinoma of the oral mucosa. A light and electron microscopic study of apparent sarcomatous metastasis to cervical lymph nodes. *Cancer.* 1974; 34(3): 597-605.

Leong CF, Raudhawati O, Cheong SK, Sivagengei K, Noor Hamidah H. Epithelial membrane antigen (EMA) or MUC1 expression in monocytes and monoblasts. *Pathology*. 2003; 35(5): 422-7.

Leventon GS, Evans HL. Sarcomatoid squamous cell carcinoma of the mucous membranes of the head and neck: a clinicopathologic study of 20 cases. *Cancer*. 1981; 48: 994-1003.

Lewis JE, Olsen KD, Sebo TJ. Spindle cell carcinoma of the larynx: review of 26 cases including DNA content and immunohistochemistry. *Hum Pathol*. 1997; 28(6): 664-73.

Lewis Jr JS, Ritter JH, El-Mofty S. Alternative epithelial markers in sarcomatoid carcinomas of the head and neck, lung, and bladder – p63, MOC-31, and TTF-1. *Mod Pathol*. 2005; 18(11): 1471-81.

Lichtiger B, Mackay B, Tessmer CF. Spindle-cell variant of squamous carcinoma. A light and electron microscopic study of 13 cases. *Cancer*. 1970; 26(6): 1311-20.

Lin L, Skacel M, Sigel JE, Bergfeld WF, Montgomery E, Fisher C *et al*. Epithelioid sarcoma: an immunohistochemical analysis evaluating the utility of cytokeratin 5/6 in distinguishing superficial epithelioid sarcoma from spindled squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol*. 2003; 30(2): 114-7.

Lont AP, Gallee MP, Snijders P, Horenblas S. Sarcomatoid squamous cell carcinoma of the penis: a clinical and pathological study of 5 cases. *J Urol*. 2004; 172(3): 932-5.

Maeda T, Adachi E, Kajiyama K, Takenaka K, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. Spindle cell hepatocellular carcinoma. A clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 15 cases. *Cancer*. 1996; 77(1): 51-7.

Meer S, Coleman H, Altini M. Oral synovial sarcoma: a report of 2 cases and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003; 96(3): 306-15.

Mentzel T, Fletcher JA. Low grade myofibroblastic sarcoma. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F, editores. *World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of soft tissue and bone*. Lyon: IARC Press; 2002. p. 94-5.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982; 31(1): 11-24.

Munakata R, Cheng J, Nakajima T, Saku T. Spindle cell carcinoma of the gingiva: report of an autopsy case. *J Oral Pathol Med*. 1998; 27: 180-84.

Nikitakis NG, Lopes MA, Bailey JS, Blanchaert RH Jr, Ord RA, Sauk JJ. Oral leiomyosarcoma: review of the literature and report of two cases with assessment of the prognostic and diagnostic significance of immunohistochemical and molecular markers. *Oral Oncol*. 2002; 38(2): 201-8.

Nishihara K, Tsuneyoshi M. Undifferentiated spindle cell carcinoma of the gallbladder: a clinicopathologic, immunohistochemical, and flow cytometric study of 11 cases. *Hum Pathol*. 1993; 24(12): 1298-305.

Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med.* 2000; 29(9): 413-25.

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

Omary MB, Ku NO, Tao GZ, Toivola DM, Liao J. "Heads and Tails" of intermediate filament phosphorylation: multiple sites and functional insights. *Trends Biochem Sci.* 2006; 31(7): 383-94.

Pallari HM, Eriksson JE. Intermediate filaments as signaling platforms. *Sci STKE.* 2006; 2006(366): pe53.

Pelissier A, Ouhayoun JP, Sawaf MH, Forest N. Changes in cytokeratin expression during the development of the human oral mucosa. *J Periodontal Res.* 1992; 27(6): 588-98.

Pereira MC, Jorge J Jr, Di Hipólito O Jr, Kowalski LP, Lopes MA. Primary intraosseous fibrosarcoma of jaw. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 34(5): 579-81.

Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. *J Can Dent Assoc.* 2007; 73(4): 339-44.

Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Iezzi G, Santinelli A. Prevalence of p53, bcl-2 and Ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 60(5): 532-40.

Pires FR, Chen SY, da Cruz Perez DE, de Almeida OP, Kowalski LP. Cytokeratin expression in central mucoepidermoid carcinoma and glandular odontogenic cyst. *Oral Oncol.* 2004; 40(5): 545-51.

Raul U, Sawant S, Dange P, Kalraiya R, Ingle A, Vaidya M. Implications of cytokeratin 8/18 filament formation in stratified epithelial cells: induction of transformed phenotype. *Int J Cancer.* 2004; 111(5): 662-8.

Rizzardi C, Frezzini C, Maglione M, Tirelli G, Melato M. A look at the biology of spindle cell squamous carcinoma of the oral cavity: report of a case. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 61: 264-68.

Ro JY, Chen JL, Lee JS, Sahin AA, Ordóñez NG, Ayala AG. Sarcomatoid carcinoma of the lung. Immunohistochemical and ultrastructural studies of 14 cases. *Cancer.* 1992; 69(2): 376-86.

Rodini CO, Pontes FS, Pontes HA, Santos PS, Magalhães MG, Pinto DS Jr. Oral leiomyosarcomas: report of two cases with immunohistochemical profile. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104(4): e50-5.

Rosai J. Oral cavity and oropharynx. In: Rosai and ackerman's surgical pathology. 9. ed. St. Louis: Mosby; 2004. p. 254-259.

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

Shibuya Y, Umeda M, Yokoo S, Komori T. Spindle cell squamous carcinoma of the maxilla: report of a case with immunohistochemical analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000; 58: 1164-69.

Sholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000; 182(3): 311-22.

Sigel JE, Skacel M, Bergfeld WF, House NS, Rabkin MS, Goldblum JR. The utility of cytokeratin 5/6 in the recognition of cutaneous spindle cell squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol.* 2001; 28(10): 520-4.

Silveira EJD, Medeiros KBD, Queiroz LMG, Figueiredo CRLV. Citoqueratinas: aplicação na patologia oral. *RBO Rio de Janeiro.* 2002; 59(1): 46-49.

Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehulsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB 1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol.* 1999; 35(6): 583-9.

Skálová A, Jäkel KT. Myoepithelial carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editores. *World health organization classification of tumours. Pathology & genetics – head and neck tumors.* IARC Press: Lyon; 2005. p. 240-1.

Sloane JP, Ormerod MG. Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. *Cancer.* 1981; 47(7): 1786-95.

Slootweg PJ, Richardson M. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive system. In: Gnepp DR, organizador. *Diagnostic surgical pathology of the head and neck.* 1 ed. Philadelphia: W.B Saunders Company; 2001. p. 47-67.

Soares AB, Lins LH, Macedo AP, Pereira-Neto JS, Vargas PA. Fibrosarcoma originating in the mandible. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006; 11(3): E243-6.

Su HH, Chu ST, Hou YY, Cjang KP, Chen CJ. Spindle cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: factors affecting outcome. *J Chin Med Assoc.* 2006; 69(10): 478-83.

Takahama A Jr, Nascimento AG, Brum MC, Vargas PA, Lopes MA. Low-grade myofibroblastic sarcoma of the parapharyngeal space. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006; 35(10): 965-8.

Takata T, Ito H, Ogawa I, Miyauchi M, Ijuhin N, Nikai H. Spindle cell squamous carcinoma of the oral region: an immunohistochemical and ultrastructural study on the histogenesis and differential diagnosis with a clinicopathological analysis of six cases. *Virchows Archiv A Pathol Anat.* 1991; 419(3): 177-82.

Tanaka N, Sugihara K, Odajima T, Mimura M, Kimijima Y, Ichinose S. Oral squamous cell carcinoma: electron microscopic and immunohistochemical characteristics. *Med Electron Microsc.* 2002; 35(3): 127-38.

Tatemoto Y, Saka M, Tanimura T, Mori M. Immunohistochemical observations on binding of monoclonal antibody to epithelial membrane antigen in epithelial tumors of the oral cavity and skin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987; 64: 721-6.

Thomé Capuano AC, Dos Santos Pinto Júnior D, Carvalhosa AA, de Araújo VC. Immunoprofile of a carcinosarcoma of the submandibular gland. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 103(3): 398-402.

Thompson LDR, Wieneke JA, Miettinen M, Heffner DK. Spindle cell (sarcomatoid) carcinomas of the larynx. A clinicopathologic study of 187 cases. *Am J Surg Pathol.* 2002; 26(2): 153-170.

Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. 2002; 31(10): 598-604.

Vilos GA, Rapidis AD, Lagogiannis GD, Apostolidis C. Leiomyosarcomas of the oral tissues: clinicopathologic analysis of 50 cases. J Oral Maxillofac Surg. 2005; 63(10): 1461-77.

Vora HH, Shah NG, Patel DD, Trivedi TI, Chikhlikar PR. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: Multivariate analysis. J Surg Oncol. 2003; 82(1): 34-50.

Völker HU, Scheich M, Höller S, Ströbel P, Hagen R, Müller-Hermelink HK, Eck M. Differential diagnosis of laryngeal spindle cell carcinoma and inflammatory myofibroblastic tumor – report of two cases with similar morphology. Diagn Pathol. 2007; 2:1.

Weiss SW, Goldblum JR. Malignant tumors of the peripheral nerves. In: Weiss SW, Goldblum JR, editores. Enzinger and Weiss's soft tissue tumours. St Louis: Mosby; 2001a. p. 1209-63.

Weiss SW, Goldblum JR. Tumours of uncertain differentiation. In: Weiss SW, Goldblum JR, editores. Enzinger and Weiss's soft tissue tumours. St Louis: Mosby; 2001b. p. 1483-509.

Wenig BM, Pilch BZ. Tumors of the upper respiratory tract. In: Flether CDM, organizador. Diagnostic histopathology of tumors. Edinburgh: Churchill livingstone; 2000. v.1. p.147-56.

Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshida H, Yoshitomi I, Iwamoto T, Mizuno A *et al.* Rapidly growing mass of the anterior maxillary gingiva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104(2): 153-9.

Zhong LP, Chen WT, Zhang CP, Zhang ZY. Increased CK19 expression correlated with pathologic differentiation grade and prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007; 104(3): 377-84.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Características clinicopatológicas e imunohistoquímicas do carcinoma de células fusiformes e do carcinoma cuniculatum da cavidade bucal**", protocolo nº **045/2007**, dos pesquisadores **MARIO JOSÉ ROMÃOACH GONZALEZ SOBRINHO, FABIO RAMÓA PIRES e OSLEI PAES DE ALMEIDA**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 26/10/2007.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Clinicopathological and Immunohistochemical findings of spindle-cell carcinoma and carcinoma cuniculatum of oral cavity**", register number **045/2007**, of **MARIO JOSÉ ROMÃOACH GONZALEZ SOBRINHO, FABIO RAMÓA PIRES and OSLEI PAES DE ALMEIDA**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 26/10/2007.

Cíntia Pereira Machado Tabchoury
Prof. Cíntia Pereira Machado Tabchoury

Secretária
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Jacks Jorge Júnior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.