

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

LÍLIA ALVES ROCHA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE KI-67, MCM-2 E
HOXB7 EM NEOPLASIAS BASALÓIDES DE CABEÇA E PESCOÇO.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do Título de Doutor em Estomatopatologia, área de concentração em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas

**Piracicaba
2010**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

R582e	Rocha, Lília Alves. Estudo da expressão imunoistoquímica de Ki-67, Mcm-2 E HOXB7 em neoplasias basalóides de cabeça e pescoço. / Lília Alves Rocha. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010. Orientador: Pablo Agustin Vargas. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Tumores. 2. Células - Proliferação. I. Vargas, Pablo Agustin. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (mg/fop)
-------	---

Título em Inglês: Immunohistochemistry expression of Ki-67, Mcm-2 and HOXB7 in basaloid tumors of head and neck

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Tumors. 2. Cell proliferation

Área de Concentração: Patologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Pablo Agustin Vargas, Danyel Elias da Cruz Perez, Halbert Villalba, Edgard Graner, Márcio Ajudarte Lopes

Data da Defesa: 26-02-2010

Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 26 de Fevereiro de 2010, considerou a candidata LÍLIA ALVES ROCHA aprovada.

A stylized, cursive signature in purple ink.

Prof. Dr. PABLO AGUSTÍN VARGAS

A stylized, cursive signature in purple ink.

Prof. Dr. DANYEL ELIAS DA CRUZ PEREZ

A stylized, cursive signature in purple ink.

Prof. Dr. HALBERT VILLALBA

A stylized, cursive signature in purple ink.

Prof. Dr. EDGARD GRANER

A stylized, cursive signature in purple ink.

Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Adir** e **Edna**, por todo suporte, dedicação e apoio aos estudos.

Aos meus irmãos, **Leila** e **Luciano**, por toda atenção e incentivo.

Ao **Daniel**, com carinho, pelo companheirismo e por ser tão especial.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu orientador, professor **Pablo Agustin Vargas**, por ter colaborado ativamente na minha formação acadêmica.

Agradeço pela oportunidade, pela amizade e compreensão ao longo de todo caminho.

AGRADECIMENTOS

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

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP;

Aos professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP: **Drs. Edgard Graner, Jacks Jorge Júnior, Márcio Ajudarte Lopes, Oslei Paes de Almeida, Pablo Agustin Vargas e Ricardo Della Coletta**;

Ao **Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes**, agradeço pelo exemplo de retidão de caráter, solidariedade e competência. Obrigada pelas oportunidades, pela atenção e pelos aconselhamentos. Suas orientações foram fundamentais para a minha formação.

À Profa. **Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani**, do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP, sempre muito solícita e gentil, obrigada por fornecer parte do material e informações do estudo. Sua colaboração foi fundamental para a conclusão do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Roman Carlos Bregni** do Centro Clínico de Cabeça e Pescoço da Cidade da Guatemala, agradeço pela pronta colaboração com a tese, com casos e informações clínicas.

Aos colegas da turma de Doutorado, **Andréia Silva, Lucielma Salmito, Luiz Alcino Gueiros e Patrícia Abrahão**. Em especial à querida **Patrícia Abrahão**, pela amizade, pela cumplicidade e pelo exemplo de determinação e alegria.

Aos colegas de pós-graduação, **Ademar Takahama Júnior, Adriele Ferreira Gouvêa, Alan Roger dos Santos Silva, Ana Carolina Prado Ribeiro, Ana Lúcia Noronha Francisco, Ana Lúcia Rangel, Ana Terezinha Marques Mesquita, Andréia Bufalino, Bruno Augusto Benevenuto Andrade, Camila Maria Beder Ribeiro, Carolina Cavalcante Bitu, Daniel Berreta Moreira Alves, Débora Campanella Bastos, Fabiana Seguin, Fernanda Gonçalves Basso, Fernanda Viviane Mariano, Guillermo Mata, Jorge Esquiche Leon, Joseli Assem Bersaneti, Juliana Joanna de Carvalho Moraes, Katya Pulido Diaz, Lays Martin Sobral, Livia Martins Ribeiro Paranaíba, Marcelo Rodrigues, Marco Antônio Carvalho, Marco Aurélio Carvalho de Andrade, Maria Fernanda Destro, Mário José Románach Gonzalez Sobrinho, Marisol Martinez Martinez, Michele Gassen Kellermann, Michelle Agostini, Patrícia do Socorro Queiroz Feio, Rebecca Azevedo, Renato Nicolás Hopp, Rogério Gondak, Rose Maria Ortega, Victor Hugo Toral Rizo e Wilfredo Alejandro Gonzalez Arriagada.** Agradeço por todos os momentos compartilhados.

Aos funcionários do laboratório de Patologia, **Adriano Luís Martins, Fabiana Casarotti, Geovania Caldas Almeida, João Carlos Gomes da Silva Júnior, Luana Michele Aléscio, e Valéria Alessandra Prado Defávani Franco,** pelo auxílio e suporte.

A toda equipe do Orocentro, pela agradável convivência e colaboração. Em especial, à **Aparecida Conceição Campion, Débora Gazzola, Juliana Campion e Rogério Elias.**

Às funcionárias **Ana Cristina do Amaral Godoy, Selma Domingos do Nascimento e Rosa Maria Fornasier** pela atenção, generosidade e acolhimento.

À **CAPES** pela concessão da bolsa de doutorado.

RESUMO

O presente trabalho avaliou a expressão dos marcadores de proliferação celular Ki-67, Mcm-2 e HOXB7 em neoplasias malignas epiteliais basalóides de cabeça e pescoço. Foram avaliadas 42 amostras tumorais da região de cabeça e pescoço, sendo 15 de carcinoma espinocelular pouco diferenciado (CEC-pd), 18 de carcinoma escamoso basalóide (CEB) e nove de carcinoma adenóide cístico tipo sólido (CAC-sólido). Os dados clinicopatológicos foram coletados de formulários de encaminhamento para biópsia. Todas as amostras foram submetidas à análise imunoistoquímica para os três marcadores. A idade média dos pacientes avaliados foi de 57 ($\pm 14,5$) anos, e a maioria pertenceu ao gênero masculino (76%). A expressão de Ki-67 nas amostras de CAC-sólido foi menor quando comparada com os demais grupos tumorais (IM=18,74% $\pm 8,3$, $p < 0,05$). A proteína Mcm-2 apresentou um maior IM no grupo CEB (IM=55,57% $\pm 13,4$, $p < 0,05$), quando comparado com os grupos CEC-pd (IM=35,55% $\pm 19,5$) e CAC-sólido (IM=28,60%, $\pm 10,1$). Este mesmo padrão foi observado para a proteína HOXB7, que apresentou um maior IM no grupo de CEB (IM=31,28% $\pm 11,6$, $p < 0,05$), quando comparado aos demais grupos (CEC-pd: IM=23,19% $\pm 8,4$ e CAC-sólido: IM=18,66% $\pm 9,8$). Como o CEB apresenta um comportamento clínico mais agressivo quando comparado ao CEC-pd e CAC-sólido, os altos IMs para Mcm-2 e HOXB7 em CEB sugerem uma relação direta entre a maior expressão dessas proteínas e a agressividade tumoral. Os IMs de Mcm-2 e HOXB7 foram crescentes para os grupos CAC-sólido, CEC-pd e CEB. Assim, sugerimos que as proteínas Mcm-2 e HOXB7 podem ser úteis no diagnóstico diferencial de CEB, CEC-pd e CAC-sólido. Estudos adicionais devem ser realizados para confirmar nossos achados e determinar o valor prognóstico de Mcm-2 e HOXB7 nestas neoplasias malignas de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: imunoistoquímica, Ki-67, Mcm-2, HOXB7, carcinoma escamoso basalóide e neoplasias basalóides.

ABSTRACT

The aims of this study were to determine the expression of Mcm-2, Ki-67 and HOXB7 in malignant basaloid tumors located in the head and neck region, and to evaluate their usefulness for diagnosis or prediction of tumor behaviour. There were 18 basaloid squamous cell carcinoma (BSCC), 15 squamous cell carcinoma poorly differentiated (SCC-pd), and nine adenoid cystic carcinoma solid type (AdCC-st). Clinicopathological data were collected retrospectively and immunohistochemical analyses of Ki-67, Mcm-2 and HOXB7 were performed on all lesions (n=42). The nuclear stain was considered as positive or negative, and labelling index (LI) for each tumor was determined by counting the percentage of positive cells in six random fields. The mean age of patients was 57 years ($\pm 14,5$), and the most was male (76%). Ki-67 expression was lower in AdCC-st (LI=18,74% $\pm 8,3$, $p < 0,05$) than in BSCC (LI=42,22%) and SCC-pd (LI=43,54) groups. Mcm-2 LI was higher in BSCC (LI=55,57% $\pm 13,4$, $p < 0,05$) than in SCC-pd (LI=35,55 $\pm 19,5$) and AdCC-st (LI=28,60% $\pm 10,1$). A similar result was observed in HOXB7 that showed a higher LI expression in BSCC group (LI=31,28% $\pm 11,6$, $p < 0,05$) than in SCC-pd (LI=23,19% $\pm 8,4$) and AdCC-st (LI=18,66% $\pm 9,8$). It was not possible to establish a correlation between LI and outcome for any of the markers. The present study suggests that Mcm-2 and HOXB7 may be useful for differential diagnosis among BSCC, SCC-pd and AdCC-st. Further studies are needed to assess the value of Mcm-2 and HOXB7 as a predictor of recurrence and survival in malignant basaloid tumors of head and neck region.

Keywords: immunohistochemical, Ki-67, Mcm-2, HOXB7, basaloid squamous cell carcinoma, malignant basaloid neoplasias.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DA LITERATURA	03
2.1 Epidemiologia do câncer	03
2.2 Carcinoma espinocelular (CEC)	05
2.3 Carcinoma escamoso basalóide (CEB)	07
2.4 Carcinoma adenóide cístico (CAC)	12
2.5 Principais neoplasias malignas epiteliais basalóides de cabeça e pescoço	15
2.6 Ciclo celular e marcadores de proliferação celular	16
2.6.1 Ki-67	18
2.6.2 Mcm-2	19
2.6.3 HOXB7	22
3. PROPOSIÇÃO	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)	26
4.2 População estudada	26
4.3 Estudo imunoistoquímico	31
4.4 Histomorfometria (Contagem das células tumorais)	33
4.5 Análise estatística	34
5. RESULTADOS	35

5.1 Características epidemiológicas e clínicas	35
5.2 Características das amostras coradas em H&E	36
5.3 Características imunoistoquímicas	42
6. DISCUSSÃO	49
7. CONCLUSÕES	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO	73

1. INTRODUÇÃO

As neoplasias malignas epiteliais basalóides de cabeça e pescoço apresentam um comportamento biológico extremamente agressivo, podendo comprometer a qualidade de vida e a sobrevida dos pacientes (Bradley 2004; Al-Reefy *et al.*, 2007; Soriano *et al.*, 2008). O carcinoma espinocelular pouco diferenciado com padrão basalóide (CEC-pd), o carcinoma escamoso basalóide (CEB), e o carcinoma adenóide cístico do tipo sólido (CAC-sólido) são as neoplasias malignas epiteliais basalóides mais comuns em região de cabeça e pescoço e histopatologicamente caracterizadas pelo padrão de crescimento sólido e pela população de células basalóides. (Zbaren *et al.*, 2004).

O carcinoma espinocelular (CEC) corresponde a mais de 90% de todos os tumores malignos da cavidade oral e orofaringe (Johnson *et al.*, 2005). Ao exame clínico, o CEC pode apresentar-se como uma úlcera infiltrativa, massa exofítica ou como uma mancha leucoplásica, eritroplásica ou eritroleucoplásica, geralmente associada à sintomatologia dolorosa nos estágios mais avançados da doença. Ao exame microscópico pode ser classificado como bem-, moderadamente- e pouco diferenciado. O CEC-pd apresenta células neoplásicas indiferenciadas, capazes de infiltrar profundamente o tecido conjuntivo. Essas células podem estar dispersas no estroma ou agrupadas em ninhos ou cordões com margens pouco definidas apresentando então um padrão basalóide (Johnson *et al.*, 2005; Al-Reefy *et al.*, 2007).

O CEB foi descrito em 1986, por Wain *et al.*, como uma variante morfológica agressiva do CEC. Clinicamente, o CEB apresenta-se como uma massa exofítica de crescimento exuberante, muitas vezes ulcerada, podendo ou não estar associada à sintomatologia dolorosa (Zbaren *et al.*, 2004; Cardesa *et al.*, 2005). A principal característica histopatológica deste tumor é o padrão bifásico, com populações de células basalóides e de células escamosas (Wain *et al.*, 1986; Barnes *et al.*, 1996; Coletta *et al.*, 2002; Cardesa *et al.*, 2005). As células basalóides são pequenas com citoplasma escasso, os núcleos são

hipercromáticos e sem nucléolos evidentes, geralmente organizadas em ilhas ou lóbulos. Algumas ilhas tumorais apresentam pequenos espaços císticos contendo material similar à mucina e positivo ao PAS e/ou Alcian blue, e na periferia as células se organizam em paliçada. Focos de comedonecrose no centro das ilhas tumorais são freqüentes. No estroma tumoral é possível notar algumas áreas de intensa hialinização (Coletta *et al.*, 2002; Cardesa *et al.*, 2005).

O carcinoma adenóide cístico (CAC) é uma neoplasia de glândulas salivares, altamente agressiva (El-Naggar & Huvos, 2005; da Cruz Perez *et al.*, 2006a). O CAC pode apresentar-se como um nódulo de consistência firme, com crescimento infiltrativo, e algumas vezes pode estar associado à paralisia facial (Rapidis *et al.*, 2005; da Cruz Perez *et al.*, 2006a). Existem três subtipos histológicos: tubular, cribiforme e sólido. O subtipo histológico sólido é caracterizado por ninhos de células basalóides, pela perda do padrão tubular e das formações microcísticas. Este subtipo é o menos comum, porém é o mais agressivo e está associado a um prognóstico ruim. Muitas vezes mais de um padrão histológico pode ser visto, em proporções diferentes, em um mesmo caso (Speight & Barrett 2002; El-Naggar & Huvos, 2005; da Cruz Perez *et al.*, 2006a).

A proteína Ki-67 é um conhecido marcador de proliferação celular, amplamente estudada em diversas neoplasias malignas de cabeça e pescoço (Ferlito *et al.*, 1997; Kodani *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2004; Vargas *et al.*, 2008). Outras proteínas como a Mcm-2 e a HOXB-7 também estão sendo estudadas em tumores de cabeça e pescoço, mas ainda não existem estudos na literatura que correlacionem a expressão dessas proteínas com as neoplasias basalóides (Kodani *et al.*, 2002; Hassan *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2008; de Souza Setubal Destro *et al.*, 2010).

Não há trabalhos na literatura que comparem a expressão de Ki-67, Mcm-2 e HOXB7 em neoplasias basalóides de cabeça e pescoço, assim o presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão das proteínas Ki-67, Mcm-2 e HOXB7 em 15 amostras de CEC-pd, 18 amostras de CEB e nove amostras de CAC-sólido localizadas em região de cabeça e pescoço.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia do câncer

Câncer é um termo genérico utilizado para os tumores malignos, ou seja, está relacionado ao crescimento celular anormal e desordenado. As células normais crescem, se dividem e morrem de maneira organizada, porém as células malignas continuam o processo de divisão de maneira descontrolada e adquirem a capacidade de invadir os tecidos adjacentes, e produzir metástases. O processo de transformação de uma célula sadia em uma célula maligna ocorre devido ao acúmulo de alterações nos genes que regulam o crescimento, a diferenciação, a morte celular, a estabilidade e o reparo do DNA, e a imunidade. Esse processo ocorre em várias etapas e pode ser facilitado por fatores genéticos (hereditários ou não) e fatores externos (Scully *et al.*, 2000; Coletta *et al.*, 2002). Entre os fatores externos, estão os agentes físicos, os agentes químicos e os agentes biológicos, (Hayes *et al.*, 1986; Gillison *et al.*, 2000; Goldenberg *et al.*, 2004a; Goldenberg *et al.*, 2004b). A idade também é um importante fator de risco no desenvolvimento do câncer. A incidência da doença aumenta consideravelmente com o avanço da idade, devido à perda da capacidade dos mecanismos de reparo celular. Embora o câncer possa se desenvolver em qualquer idade, cerca de 80% dos tumores malignos são diagnosticados em adultos acima de 55 anos (WHO; Marur *et al.*, 2008).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), mais de 30% dos casos de câncer podem ser evitados com a realização periódica de exames preventivos e com a modificação de alguns hábitos nocivos, como o uso regular do tabaco e de bebidas alcoólicas, a desatenção ao sobrepeso ou obesidade, a baixa ingestão de frutas e vegetais, o sedentarismo, a transmissão sexual do HPV e a exposição prolongada à luz solar sem proteção (WHO).

Em 2005 foram registrados 7,6 milhões de mortes por câncer em todo mundo (13% do total de mortes), sendo que 70% dos casos ocorreram em países

de baixa e média renda. Estima-se que em 2030, esse número aumente para 12 milhões de mortes. No Brasil, aproximadamente 190 mil pessoas morreram de câncer em 2005, destes, 113 mil tinham menos de 70 anos de idade. A previsão para o ano de 2030 é de que o câncer se torne a terceira causa de morte no Brasil, com cerca de 310 mil óbitos (WHO).

O CEC corresponde a aproximadamente 90% de todas as neoplasias malignas de cabeça e pescoço, e tem como principais fatores de risco o uso regular de bebidas alcoólicas e tabaco (Johnson *et al.*, 2005; Marur *et al.*, 2008). Estima-se que 644.000 novos casos de tumores malignos de cabeça e pescoço sejam diagnosticados anualmente em todo o mundo, e que dois terços destes novos casos ocorram em países em desenvolvimento (Marur *et al.*, 2008).

Entre as neoplasias malignas de cabeça e pescoço, os tumores malignos epiteliais basalóides são conhecidos por serem incomuns, por apresentarem comportamento clínico agressivo e prognósticos ruins. Recebem o nome de tumores malignos epiteliais basalóides porque apresentam algumas características histopatológicas comuns, como: padrão sólido de crescimento; presença de ilhas formadas por células malignas organizadas em paliçada na periferia; pela presença de células basalóides que apresentam núcleos hipercromáticos e citoplasma escasso; e comedonecrose (necrose coagulativa central) na região central de ilhas ou lóbulos tumorais. Embora sejam muito semelhantes na histopatologia, os tumores malignos basalóides se diferenciam no comportamento clínico, assim, alguns autores reforçam a importância em estabelecer um correto diagnóstico, com tratamento e prognóstico compatíveis (Coletta *et al.*, 2001; Coletta *et al.*, 2006; Khaldi *et al.*, 2006; Soriano *et al.*, 2008). Tumores como o CEC-pd, o CEB, e o CAC-sólido apresentam essas características histopatológicas e são considerados neoplasias malignas epiteliais basalóides. Esses tumores merecem atenção, pois embora apresentem semelhanças histopatológicas, apresentam diferenças relacionadas ao comportamento clínico, protocolo de tratamento e prognóstico (Coletta *et al.*, 2001; Coletta *et al.*, 2006; Khaldi *et al.*, 2006; Soriano *et al.*, 2008).

Outros tumores como o carcinoma sinusal indiferenciado, carcinoma neuroendócrino, CEC de pequenas células e o adenocarcinoma de células basais também possuem características basalóides e participam dos diagnósticos diferenciados das neoplasias basalóides de cabeça e pescoço (Banks *et al.*, 1992; Coppola *et al.*, 1993; Barnes *et al.*, 1996; Ferlito *et al.*, 1997; Coletta *et al.*, 2002).

2.2 Carcinoma espinocelular (CEC)

O CEC corresponde a mais de 90% de todos os tumores malignos de cabeça e pescoço (Neville & Day 2002; Cardesa *et al.*, 2005; Marur *et al.*, 2008). Trata-se de uma neoplasia agressiva e que frequentemente produz metástases para linfonodos regionais. Geralmente os pacientes são adultos entre a quinta e sexta décadas de vida, com histórico de uso abusivo de álcool e tabaco. Em região de cabeça e pescoço, o CEC é mais comum em cavidade oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe e laringe (Cardesa *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005; Al-Reefy *et al.*, 2007; Marur *et al.*, 2008).

Durante os estágios iniciais da doença, os sinais e sintomas são muito discretos, e a apresentação clínica da lesão varia de acordo com a sua localização. Pacientes com CEC em cavidade oral podem apresentar lesões planas indolores ou úlceras doloridas. Na região de orofaringe o paciente pode apresentar queixa de disfagia e otalgia. Pacientes com câncer na hipofaringe apresentam sintomas tardios como disfagia, otalgia e rouquidão. O CEC de laringe pode apresentar diferentes sinais e sintomas nos diferentes estágios de desenvolvimento da doença. Na região da glote, os sinais se manifestam nos estágios iniciais como uma rouquidão persistente. Ao contrário, pacientes com tumores em região supraglótica geralmente apresentam uma massa na região do pescoço apenas nos estágios mais avançados da doença. Tumores em cavidade nasal e seio paranasal estão associados a sintomas como sinusite, obstrução nasal e epístase. Já os tumores em nasofaringe podem apresentar sinais e sintomas como: otalgia, obstrução nasal, epístase e paralisia de nervos cranianos

(Forastiere *et al.*, 2001; Cardesa *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005; Marur *et al.*, 2008).

Microscopicamente, as lesões de CEC em cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, laringe e traquéia apresentam padrões histopatológicos muito semelhantes, por isso recebem a mesma classificação. O CEC pode ser classificado como bem-, moderadamente- e pouco-diferenciado. O CEC bem diferenciado embora apresente o tecido conjuntivo invadido pelas células epiteliais neoplásicas, mantém a arquitetura semelhante ao epitélio escamoso normal. O CEC moderadamente diferenciado apresenta pleomorfismo nuclear, mitoses típicas e atípicas e eventuais processos de queratinização. Já o CEC-pd é caracterizado pela grande quantidade de células imaturas, mitoses atípicas freqüentes, ausência de queratinização e está associado a um pior prognóstico (Barnes *et al.*, 1996; Cardesa *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005). Além da gradação histológica, o padrão de invasão do fronte tumoral apresenta um importante valor prognóstico, ou seja, é muito provável que um tumor com fronte infiltrativo apresente um comportamento mais agressivo quando comparado a outro tumor com fronte expansivo (Cardesa *et al.*, 2005).

O CEC localizado em cavidade nasal e seios paranasais apresentam características histopatológicas semelhantes às anteriormente citadas, porém são separados em dois grandes grupos, CEC queratinizante e CEC não queratinizante. No primeiro grupo, as lesões podem ser sub-classificadas em bem-, moderadamente- e pouco-diferenciadas, sendo que a diferenciação escamosa precisa ser demonstrada. Já no segundo grupo, as lesões podem ser sub-classificadas em moderadamente- e pouco-diferenciadas, e a diferenciação escamosa não é óbvia devendo ser distinguida do neuroblastoma olfatório ou carcinoma neuroendócrino (Pilch *et al.*, 2005). O CEC encontrado na região de nasofaringe também apresenta algumas diferenças relacionadas à classificação histopatológica. A OMS (2005) identifica três subtipos histológicos: o queratinizante, que pode ser bem-, moderadamente- ou pouco-diferenciado; o não-queratinizante; e o carcinoma escamoso basalóide (Chan *et al.*, 2005).

Os CECs da região de cabeça e pescoço podem apresentar sete subtipos histológicos: carcinoma verrucoso, CEB, carcinoma escamoso papilífero, carcinoma de células fusiformes, carcinoma escamoso acantolítico, carcinoma adenoescamoso e o carcinoma linfoepitelial. Entre os subtipos, o CEB apresenta o comportamento clínico mais agressivo e está associado a um pior prognóstico (Johnson *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007).

O tratamento de escolha para o CEC depende do estadiamento clínico da lesão (Greene *et al.*, 2002). Até a década de 1980 a cirurgia e a radioterapia eram consideradas as únicas modalidades de tratamento efetivas para pacientes com CEC em região de cabeça e pescoço. Atualmente, o tratamento de câncer de cabeça e pescoço é abordado de maneira mais abrangente, envolvendo procedimentos como cirurgia, radioterapia e quimioterapia (Al-Sarraf *et al.*, 1998; Forastiere *et al.*, 2003; Bernier *et al.*, 2005).

2.3 Carcinoma escamoso basalóide (CEB)

O CEB é uma variante pouco comum e agressiva do CEC, caracterizada histologicamente pela presença de componentes basalóides e escamosos, em diferentes proporções (Zbaren *et al.*, 2004; Cardesa *et al.*, 2005). Este tumor corresponde a aproximadamente 2% de todas as neoplasias malignas de cabeça e pescoço, com cerca de 200 casos publicados na literatura (Soriano *et al.*, 2008). O CEB foi descrito inicialmente em 1986, por Wain *et al.*, como uma variante morfológica pouco comum e agressiva do CEC.

O CEB afeta principalmente os homens, entre 50 e 60 anos de idade. Apresenta como principais fatores etiológicos o uso de tabaco e o hábito de ingerir bebidas alcoólicas (Banks *et al.*, 1992; Barnes *et al.*, 1996; Ferlito *et al.*, 1997; Cardesa *et al.*, 2005). Porém, alguns trabalhos também relacionam a infecção pelo papilomavírus humano (HPV) e pelo vírus Epstein-Barr (EBV), como possíveis fatores etiológicos deste tumor (Wan *et al.*, 1995; Kleist *et al.*, 2004; Begum *et al.*, 2008; Winters *et al.*, 2008).

Clinicamente, o CEB apresenta-se como uma massa exofítica ulcerada e de crescimento exuberante, na grande maioria das vezes. As lesões normalmente são doloridas, causam disfagia e são diagnosticados em estágios avançados (Banks *et al.*, 1992; Ferlito *et al.*, 1997; Ide *et al.*, 2002; Rodriguez-Tojo *et al.*, 2005). O CEB comumente afeta a região de cabeça e pescoço, principalmente em seio piriforme, hipofaringe, laringe supraglótica e base de língua (Barnes *et al.*, 1996; Ide *et al.*, 2002). Além da região de cabeça e pescoço, outros órgãos podem ser acometidos pelo CEB, como esôfago, traquéia, pulmão, anus, útero, vagina, bexiga e pênis (Saltarelli *et al.*, 1995; Cubilla *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2000; Vakar-Lopez & Abrams, 2000; Grayson & Cooper, 2002; Moro-Sibilot *et al.*, 2008; Ghigna *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2009)

Microscopicamente o CEB caracteriza-se por apresentar um padrão bifásico com populações de células basalóides e de células escamosas. As células basalóides são pequenas com citoplasma escasso, os núcleos são hipercromáticos e sem nucléolos evidentes, geralmente encontradas em ilhas ou lóbulos. Algumas ilhas tumorais apresentam pequenos espaços císticos contendo material similar à mucina e positivo ao PAS e/ou Alcian blue, e na periferia as células se organizam em paliçada. Nas áreas centrais dos lóbulos ou ilhas podem-se observar focos de comedonecrose. O componente escamoso pode apresentar-se na forma de diferenciação escamosa focal, carcinoma *in situ* ou carcinoma espinocelular invasivo. Muitas vezes o estroma apresenta áreas com hialinização intensa. (Wain *et al.*, 1986; Banks *et al.*, 1992; Barnes *et al.*, 1996; Sampaio-Góes *et al.*, 2005; Soriano *et al.*, 2008).

Uma das amostras mais significativas de CEB foi analisada por Banks *et al.* (1992), com 40 casos localizados na região de cabeça e pescoço. Os tumores apresentaram as seguintes localizações: base de língua (n=12), seio piriforme (n=8), laringe (n=8), tonsilas (n=5), faringe (n=3), cavidade nasal (n=2) e em dois casos não havia a localização disponível. Os autores verificaram que o abuso do tabaco e do álcool estavam intimamente relacionados com o desenvolvimento da doença, e que os diagnósticos foram realizados em estádios clínicos muito

avançados. Os autores confirmaram o comportamento biológico agressivo do CEB, pois os tumores apresentaram altos índices de recorrências, metástases para linfonodos regionais e à distância. Apesar do comportamento agressivo, os autores consideraram que o CEB apresentou um comportamento clínico semelhante ao CEC.

Wain *et al.* (1986) avaliaram 10 amostras tumorais localizadas no trato aerodigestivo superior. A maioria dos pacientes avaliados pertenceu ao gênero masculino (n=9), com idades variando entre 49 e 68 anos. No momento do diagnóstico, seis pacientes apresentaram metástases em linfonodos regionais e quatro apresentaram metástases à distância para pulmão, cérebro e pele. O tratamento foi cirúrgico, seguido de radioterapia (n=7) e/ou quimioterapia (n=3). Após o tratamento, dois pacientes desenvolveram metástases à distância.

Paulino *et al.* (2000) avaliaram 20 pacientes diagnosticados com CEB em região de cabeça e pescoço. Destes, 14 eram homens e seis eram mulheres, com idades entre 43 e 85 anos. Os tumores estavam localizados em laringe (n=4), língua (n=3), seio piriforme (n=3), cavidade nasal (n=2), assoalho bucal (n=2), tonsila (n=2), epiglote (n=1), nasofaringe (n=1) e traquéia (n=1). Dezesete dos vinte pacientes relataram abuso no consumo de bebidas alcoólicas e de tabaco. As modalidades de tratamento adotadas foram: cirurgia com radio- ou quimioterapia adjuvante (n=13), quimio- e radioterapia (n=2), quimioterapia (n=2) e radioterapia (n=3). Após o tratamento, 11 pacientes ainda apresentaram sinais de doença, quatro estavam livres da doença e cinco faleceram devido às complicações causadas pelo tumor.

Alguns autores consideram o comportamento biológico e o prognóstico do CEB semelhantes ao CEC (Luna *et al.*, 1990; Sarbia *et al.*, 1997; Ide *et al.*, 2002; Sapaio-Góes *et al.*, 2005; Yu *et al.*, 2008). Outros acreditam que embora apresentem características clínicas e histológicas semelhantes, o CEB seja mais agressivo e letal em comparação ao CEC convencional (Wain *et al.*, 1986; Coppola *et al.*, 1993; Ferlito *et al.*, 1997; Winzenburg *et al.*, 1998; Coletta *et al.*, 2001; Soriano *et al.*, 2008).

Luna *et al.* (1990) analisaram nove casos de CEB localizados em língua, seio piriforme e faringe. Estes autores compararam o comportamento clínico entre CEB e CEC com mesma localização e estadiamento clínico, e verificaram que os dois tumores apresentaram cursos clínicos semelhantes. Sarbia *et al.* (1997) avaliaram 17 amostras de CEB e 133 amostras de CEC convencional em esôfago. Não encontraram diferenças quanto ao tamanho do tumor, metástases linfonodais, invasão linfática, nervosa ou venosa, e na taxa de sobrevida.

Coppola *et al.* (1993) compararam amostras de CEB e CEC em assoalho bucal, e demonstraram que os CEBs apresentavam maiores índices de recorrência, metástase local e à distância, mortalidade, e menor taxa de sobrevida. O mesmo padrão de comportamento foi encontrado por Ferlito *et al.* (1997), quando avaliou 15 amostras de CEB em laringe e hipofaringe.

Winzenburg *et al.* (1998), diferente da maioria dos autores compararam amostras de CEB apenas com amostras de CEC-pd, e verificaram que as primeiras apresentaram maior agressividade devido ao alto índice de metástases à distância e baixos índices de sobrevida. Este trabalho tem especial importância, pois compara duas entidades com características histopatológicas muito semelhantes. Os autores ainda recomendam que o protocolo de atendimento dos pacientes diagnosticados com CEB seja diferente do protocolo seguido para pacientes com CEC convencional, pois indicam o esvaziamento cervical independentemente da presença de metástases locais.

Coletta *et al.* (2001) compararam a expressão de alguns marcadores como regiões argirofílicas organizadoras nucleolares (AgNOR), antígeno nuclear anti-proliferação celular (PCNA), p53 e matriz de metaloproteínase (MMP), em CEB e CEC orais. Foi verificado que o CEB apresentou maior atividade proliferativa e de invasão. Além disso, as amostras de CEB apresentaram maior expressão de p53, que está relacionada com a falta de controle no processo de crescimento celular. Diante desses resultados, os autores sugeriram que o CEB apresenta maior potencial para recorrências e metástases, e pior prognóstico quando comparado ao CEC.

Ide *et al.* (2002) analisaram 46 amostras de CEB em cavidade oral, e sugeriram que o comportamento clínico mais agressivo do CEB estava relacionado ao estadiamento clínico avançado das lesões no momento do diagnóstico. Sampaio-Góes *et al.* (2005) compararam 17 amostras de CEB com outras 27 amostras de CEC-pd, e não observaram diferenças quanto a características clínicas, imunoistoquímicas (expressão de PCNA, p53 e Bcl-X), e sobrevida. Os autores sugeriram que o CEB e o CEC-pd apresentam comportamentos biológicos semelhantes quando avaliados em uma mesma localização e em um mesmo estadiamento clínico.

Soriano *et al.* (2008) compararam 62 amostras de CEB com outras 62 amostras de CEC, todas em região de cabeça e pescoço. Entre as amostras de CEB, 31 estavam localizadas em hipofaringe, 19 em orofaringe e cavidade oral, oito em laringe, três em linfonodos cervicais e uma em nasofaringe. Os autores utilizaram como critérios de comparação a classificação TNM, a localização dos tumores e o tratamento empregado. Os resultados indicaram que o CEB apresenta um pior comportamento clínico associado a altos índices de metástases locais e à distância, menores índice de sobrevida e piores prognósticos.

Diversos trabalhos confirmam o comportamento biológico agressivo do CEB em região de cabeça e pescoço e verificam que as lesões são diagnosticadas tardiamente na maioria dos casos. No momento do diagnóstico aproximadamente 2/3 dos pacientes apresentam metástases em linfonodos regionais e pouco menos de 50% dos pacientes apresentam metástases à distância (pele, pulmão, fígado, ossos e cérebro), com índices de sobrevida muito baixos (Ferlito *et al.*, 1997; Wieneke *et al.*, 1999; Paulino *et al.*, 2000; Rodriguez-Tojo *et al.*, 2005; Soriano *et al.*, 2008).

O tratamento para este tumor tão agressivo depende do estadiamento clínico da lesão e da possibilidade de ressecção cirúrgica, além disso, pode envolver diferentes modalidades terapêuticas como a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia (Luna *et al.*, 1990; Ferlito *et al.*, 1997; Khaldi *et al.*, 2006).

2.4 Carcinoma adenóide cístico (CAC)

As neoplasias de glândulas salivares são relativamente incomuns, contabilizando menos de 7% dos cânceres de cabeça e pescoço (Rapidis *et al.*, 2005; da Cruz Perez *et al.*, 2006a). O CAC corresponde a cerca de 7,5% de todas as neoplasias epiteliais malignas de glândulas salivares e 4% de todos os tumores de glândulas salivares (Bradley, 2004; Rapidis *et al.*, 2005). Trata-se de uma neoplasia que afeta principalmente as glândulas parótidas, submandibulares e glândulas salivares menores. Nestas últimas, afeta principalmente o palato, seguido pela língua, mucosa jugal, mucosa labial e assoalho bucal (Lopes *et al.*, 1999; Ellis & Auclair 1996; da Cruz Perez *et al.*, 2004; Ito *et al.*, 2005; El-Naggar & Huvos 2005; da Cruz Perez *et al.*, 2006a; Pires *et al.*, 2007).

O CAC apresenta como principais características clínicas o crescimento tumoral lento e persistente, e significativamente metástases tardias (Rapidis *et al.*, 2005; da Cruz Perez *et al.*, 2006a). Alguns autores demonstram que o gênero feminino é o mais afetado, outros indicam que são os homens, mas há ainda os que relatam ausência de predileção por gênero (Nascimento *et al.*, 1986; van der Wal *et al.*, 2002; Rapidis *et al.*, 2005; Moukarbel *et al.*, 2008). O CAC acomete com maior frequência, adultos entre a quarta e sexta décadas de vida, sendo incomum em jovens (Ellis & Auclair 1996; Rapidis *et al.*, 2005; da Cruz Perez *et al.*, 2004; Moukarbel *et al.*, 2008).

Ao exame clínico, o CAC pode se apresentar como um nódulo de consistência firme, algumas vezes dolorido e infiltrativo. (Nascimento *et al.*, 1986; da Cruz Perez *et al.*, 2006a; da Cruz Perez *et al.*, 2006b). Além disso, o paciente pode desenvolver paralisia facial (quando a glândula parótida é atingida), sendo este, um indicativo de prognóstico ruim (El-Naggar & Huvos 2005; da Cruz Perez *et al.*, 2006a ;da Cruz Perez *et al.*, 2006b). Porém, os sinais e sintomas da doença variam de acordo com a sua localização (Moukarbel *et al.*, 2008). A natureza infiltrativa do tumor possibilita a disseminação local, que pode ocorrer muitos anos após o tratamento cirúrgico e/ou após a radioterapia inicial (Ustundag *et al.*, 2000).

As metástases à distância são comuns, particularmente se forem tardias, sendo o pulmão o sítio mais comumente afetado, seguido dos ossos, fígado e cérebro (McFall *et al.*, 1997; Rapidis *et al.*, 2005; da Cruz Perez *et al.*, 2006a).

Com relação à histopatologia, o CAC apresenta dois tipos celulares principais: as células ductais (luminais) e as células mioepiteliais (abluminais), com predominância destas últimas (Rapidis *et al.*, 2005). De acordo com o arranjo celular, o tumor pode apresentar três padrões histopatológicos principais: padrão tubular, cribiforme e sólido. No padrão tubular, as células neoplásicas se organizam em múltiplos pequenos ductos ou túbulos, que são envolvidos pelo estroma hialino. O padrão cribiforme é o mais freqüente e caracteriza-se por ilhas de células neoplásicas pequenas e cuboidais, exibindo núcleos basofílicos e citoplasma escasso, delimitando espaços císticos cilindromatosos. Estes espaços císticos contêm material mucóide ou hialinizado, bem como a combinação de ambos. O padrão sólido é o tipo menos comum e também o que apresenta um comportamento clínico mais agressivo. As células basalóides formam ninhos em diferentes tamanhos, tornando menos freqüente as formações tubulares ou microcísticas. As células epiteliais se tornam mais hipercromáticas e as figuras de mitoses são mais freqüentes. Áreas de comedonecrose no centro das ilhas tumorais também podem ocorrer neste subtipo histológico. O estroma geralmente é hialino e as invasões neurais e ósseas são relativamente comuns (Ellis & Auclair, 1996; El-Naggar & Huvos, 2005).

As características histopatológicas do CAC têm sido correlacionadas a sua evolução, começando pelo padrão tubular com o melhor prognóstico, seguindo para o padrão cribiforme, e por último para o padrão sólido, que apresenta o pior prognóstico. Além do padrão histopatológico, outros fatores possuem considerável valor prognóstico como o sítio primário da lesão, o estadiamento clínico, e as áreas anatômicas invadidas. A invasão perineural é um achado comum em todos os subtipos de CAC, e está provavelmente relacionada ao grande número de metástases à distância (Speight & Barret., 2002; Rapidis *et al.*, 2005; El-Naggar & Huvos., 2005).

Rapidis *et al.* (2005) avaliaram 23 pacientes diagnosticados com CAC em cabeça e pescoço, sendo 13 mulheres e 10 homens. O tratamento de escolha para 22 pacientes foi cirúrgico com a remoção total da lesão, seguida de radioterapia adjuvante. Apenas um paciente foi submetido à quimio- e radioterapia. Após o tratamento, seis pacientes apresentaram recidivas e 11 apresentaram metástases à distância para pulmão, osso e fígado.

Da Cruz Perez *et al.* (2006a) avaliaram uma grande série com 129 amostras de CAC em região de cabeça e pescoço, sendo 71 homens e 58 mulheres, com idades variando entre 10 e 98 anos. Os sintomas mais freqüentemente apresentados pelos pacientes foram dor, parestesia e congestão nasal. As glândulas salivares menores intraorais foram as mais afetadas, em seguida as glândulas salivares maiores e as glândulas salivares menores extra-orais. Cerca de 10% dos pacientes apresentaram metástases cervicais e 8,5% apresentaram metástases à distância no momento do diagnóstico. Microscopicamente o subtipo histológico mais comum foi o cribiforme, seguido pelo padrão tubular e sólido. A maioria dos pacientes foi tratada com cirurgia seguida de radioterapia adjuvante, ou apenas cirurgicamente. Os autores verificaram também que a positividade para p53 se relacionou com piores prognósticos e por isso sugerem a p53 como um bom indicador de prognóstico.

Da Cruz Perez *et al.* (2006b) avaliaram 18 casos de CAC em seio maxilar. Os pacientes avaliados apresentaram idade média de 46 anos, com predileção pelo gênero masculino. Aproximadamente 89% dos pacientes apresentaram estadiamentos clínicos avançados no momento do diagnóstico. Dois pacientes apresentaram metástases para linfonodos cervicais e sete apresentaram metástases à distância. As principais modalidades terapêuticas adotadas foram o tratamento cirúrgico seguido de radioterapia adjuvante, e apenas tratamento cirúrgico. Nos casos de impossibilidade de ressecção cirúrgica do tumor, optou-se pelo tratamento radio- e/ou quimioterápico. Os autores sugeriram que a falta de controle local da doença, assim como as metástases à distância são fatores que influenciaram diretamente na sobrevida dos pacientes.

Entre os vários fatores prognósticos, o estadiamento clínico do tumor parece ser o fator prognóstico mais importante e confiável (Rapidis *et al.*, 2005; da Cruz Perez *et al.*, 2006a; da Cruz Perez *et al.*, 2006b). Ao contrário de outras neoplasias malignas epiteliais, o CAC apresenta altas taxas de sobrevida em cinco anos, porém esta taxa de sobrevida diminui consideravelmente em 10 e 20 anos (Rapidis *et al.*, 2005; El-Naggar & Huvos, 2005). O tipo sólido apresenta o pior prognóstico, com múltiplas recidivas, metástases tardias, e conseqüentemente altas taxas de mortalidade. O tratamento de escolha é a remoção cirúrgica seguida de radioterapia adjuvante. O acompanhamento dos pacientes diagnosticados com CAC deve ser longo devido aos altos índices de metástases tardias (Khan *et al.*, 2001; Rapidis *et al.*, 2005; da Cruz Perez *et al.*, 2006).

2.5 Principais neoplasias malignas epiteliais basalóides de cabeça e pescoço

As neoplasias malignas epiteliais basalóides apresentam como características comuns o padrão sólido de crescimento, a presença de células basalóides organizadas em lóbulos ou ilhas, comedonecrose e mitoses atípicas. O CEB, o CEC-pd e o CAC-sólido são as principais neoplasias malignas epiteliais basalóides de cabeça e pescoço, pois são as mais freqüentes nesta localização e apresentam características histopatológicas muito semelhantes. A correta diferenciação desses tumores é muito importante, pois apresentam comportamentos clínicos, protocolos de tratamento e prognósticos diferentes (Coletta *et al.*, 2002; Soriano *et al.*, 2008). O CEB apresenta como principal característica histológica, o padrão bifásico, composto por populações de células basalóides e células escamosas. O CEC-pd apresenta apenas a população de células escamosas, e isso pode auxiliar na diferenciação entre os dois tumores (Wain *et al.*, 1986; Luna *et al.*, 1990; Barnes *et al.*, 1996). O CAC-sólido é a neoplasia basalóide mais comumente confundida com o CEB, pois também apresenta áreas microcísticas e células basalóides. Em contrapartida o CAC-

sólido não apresenta a população de células escamosas, o que pode ajudar na diferenciação dos dois tipos tumorais.

Em casos de amostras teciduais muito pequenas, o estabelecimento do diagnóstico correto com colorações de rotina pode se tornar difícil. Nestes casos, as reações imunoistoquímicas são grandes auxiliares no diagnóstico e devem ser empregadas (Luna *et al.*, 1990; Banks *et al.*, 1992; Wedenberg *et al.*, 1997; Coletta *et al.*, 2002).

Coletta *et al.* (2002), em um estudo comparativo avaliou a expressão de citoqueratinas (CK) entre amostras de CEC, CAC e adenocarcinoma de células basais. Nas amostras de CEB, as células basalóides expressaram a CK14, porém não reagiram a CK7, e as células da população escamosa apresentaram positividade para a CK1. Nos casos de CAC, as células basalóides foram positivas para a CK7 e a CK19. As células basalóides do adenocarcinoma de células basais além de apresentaram positividade para a CK7, foram positivas para CK8. Os autores notaram também positividade para laminina e para colágeno tipo IV nos espaços microcísticos presentes apenas nas amostras de CEB. Em 2008, Winters *et al.* também sugeriram as CK1, CK7 e CK14 como ferramentas auxiliares no diagnóstico do CEB.

Além das citoqueratinas, alguns marcadores de proliferação celular têm sido usados para auxiliar na diferenciação entre alguns tumores de cabeça e pescoço (Ferlito *et al.*, 1997; Kodani *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2008).

2.6 Ciclo celular e marcadores de proliferação celular

Nas células eucariontes normais o genoma é duplicado uma única vez por ciclo celular (Bell & Dutta, 2002). Alterações neste processo podem resultar no desenvolvimento de diversas neoplasias malignas. Assim, o conhecimento dos processos envolvidos no ciclo celular pode indicar a importância de determinados marcadores de proliferação no estudo dos tumores malignos (van Diest *et al.*,

1998; Pich *et al.*, 2004). O ciclo celular pode ser compreendido em duas etapas. A primeira corresponde à mitose (M), aquela em que a célula se divide dando origem às células descendentes. A segunda etapa, chamada interfase (I), corresponde ao período entre duas divisões celulares sucessivas, nesta fase a célula duplica seu DNA e dobra de tamanho. A interfase corresponde a aproximadamente 90% do tempo total do ciclo celular e é dividida em 03 fases: gap1 (G1), síntese (S) e gap2 (G2), (Hartwell & Weinert, 1989).

Durante a fase G1 ocorre uma intensa síntese de RNA e proteínas. O citoplasma celular se recompõe do último processo de divisão, e a cromatina está descondensada. Na fase de síntese, o DNA celular é duplicado. A dupla hélice se separa, e cada fita única serve como molde para a síntese de uma nova molécula de DNA. Ao final desta fase, a célula apresenta o dobro da quantidade de material genético. Na fase G2, a célula completa seu crescimento antes de entrar na fase de mitose. Neste período ocorre uma discreta síntese de RNA e proteínas essenciais para a divisão propriamente dita. Por ser um evento essencial para a integridade da célula, o ciclo celular deve ser bem controlado. Um dos mecanismos de controle é a averiguação do material genético duplicado e segregado. São reconhecidos dois pontos de checagem: um em G1 (logo após a mitose), e o outro em G2 (antes da célula entrar em divisão), (Hartwell & Weinert, 1989).

A atividade proliferativa de um tecido normal ou neoplásico está relacionada com a média de crescimento e o tempo médio do ciclo celular. Assim, quanto mais alta a atividade proliferativa de um tumor, espera-se um maior potencial de malignidade e conseqüentemente um pior prognóstico. Desta forma, o estudo de marcadores de proliferação celular possui considerável importância nas pesquisas sobre o câncer, em especial, em cabeça e pescoço (Jones *et al.*, 1994; Vargas *et al.*, 2008; Torres-Rendon *et al.*, 2009; de Souza Setubal Destro *et al.*, 2010).

2.6.1 Ki-67

A proteína Ki-67 é um conhecido marcador biológico de proliferação celular. Seu nome é uma derivação da cidade de origem (Kiel, Alemanha), e do número da placa onde seu clone foi cultivado (67^a placa). A Ki-67 foi descoberta por Gerdes *et al.*, em 1983, no núcleo de células de linfoma de Hodgkin, da linhagem L468. A proteína possui cerca de 395 KDa, e é produzida por um gene localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q25). Durante o ciclo celular, a Ki-67 está presente nas fases G1, S, G2 e M, mas está ausente na fase G0, início de G1, e durante os processos de reparação do DNA (Gerdes *et al.*, 1984; Key *et al.*, 1994). Sasaki *et al.* (1987) relataram que a expressão da proteína aumenta com a progressão do ciclo celular, alcançando picos nas fases G2 e M. Guillaud *et al.* (1989) observaram este mesmo evento tanto em linhagem de células normais como neoplásicas.

Diversos estudos relacionam a expressão de Ki-67, com o comportamento clínico das neoplasias, prognóstico e com a sobrevida dos pacientes. Nas neoplasias de cabeça e pescoço, altas expressões de Ki-67 estão relacionadas a prognósticos ruins e baixas taxas de sobrevida (Silva *et al.*, 2004; Rodriguez-Tojo *et al.*, 2005; Vargas *et al.*, 2008). Liu *et al.* (2003) em um estudo com CEC em laringe e hipofaringe verificaram uma maior expressão de Ki-67 em tumores com metástase para linfonodos cervicais, quando comparados com tumores que não haviam produzido metástases. Silva *et al.* (2004) notaram que amostras de CEC de cabeça e pescoço que apresentaram altos índices de marcação de Ki-67 estavam relacionadas a um pior prognóstico e com a diminuição da sobrevida dos pacientes.

Em 1997, Sarbia *et al.* compararam amostras de CEB e de CEC, e observaram que as amostras de CEB apresentaram uma maior expressão de Ki-67, indicando um maior potencial proliferativo deste grupo. Porém, os autores relataram que após a ressecção cirúrgica dos tumores, não havia diferença quanto ao prognóstico das duas entidades tumorais. Ohashi *et al.* (2003) não encontraram

diferença estatisticamente significativa na expressão de Ki-67 entre amostras de CEC e CEB ainda em estágios iniciais, localizados em esôfago, bem como no comportamento clínico dos tumores. Rodriguez-Tojo *et al.* (2005) verificaram que altas expressões de Ki-67 em amostras de CEB de laringe estavam relacionadas a um comportamento clínico mais agressivo e a prognósticos muito ruins.

A expressão da proteína Ki-67 também foi estudada em neoplasias de glândulas salivares, e a sua alta expressão foi relacionada ao comportamento biológico mais agressivo, e conseqüentemente a um pior prognóstico. Alguns trabalhos da literatura indicam que o CAC-sólido apresenta uma maior expressão de Ki-67, quando comparado aos demais subtipos histológicos, e sugeriram que a expressão do marcador é sensível a gradação histológica convencional. (Norberg-Spaak *et al.*, 2000; Seethala *et al.*, 2007; Malhotra *et al.*, 2009). Vargas *et al.* (2008) verificaram a expressão de Ki-67 em diferentes neoplasias de glândulas salivares, CAC, carcinoma ex-adenoma pleomorfo, carcinoma mucoepidermóide, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, carcinoma de células acinares e adenoma pleomorfo. As amostras de CAC apresentaram a maior expressão da proteína, confirmando os resultados dos estudos anteriores. Ferlito *et al.*, 1997 verificou que a expressão de Ki-67 foi menor em amostras de CAC-sólido quando comparada a amostras de CEB e sugeriram que a proteína Ki-67 seja importante na diferenciação das duas neoplasias basalóides de cabeça e pescoço. Diante dos diversos trabalhos envolvendo proliferação celular e prognóstico, a Ki-67 se mostra um marcador de proliferação celular confiável no estudo das neoplasias basalóides de cabeça e pescoço.

2.6.2 Mcm-2

As proteínas Mcm (minichromosome maintenance/ proteínas mantenedoras de minicromossomos) correspondem a um grupo de 10 proteínas envolvidas na replicação do genoma. Entre elas a família Mcm2-Mcm7 é formada por seis proteínas que interagem umas com as outras, e estão envolvidas com a fase

inicial de replicação do DNA (Moirano *et al.*, 2006). As Mcm recebem este nome porque leveduras mutantes que não possuem essas proteínas tornam-se incapazes de manter elementos extracromossômicos ligados à cromatina (Bell & Dutta, 2002; Moirano *et al.*, 2006).

O complexo Mcm2-7 liga-se a cromatina no final da fase de mitose e no início da fase G1 sendo altamente expressas neste período. Nas fases S e G2 a expressão desta família de proteínas tende a diminuir (Kearsey & Labib 1998). O complexo Mcm2-7 é responsável pelo início do processo de replicação, garante que o DNA seja replicado apenas uma vez a cada ciclo celular, e mantém a integridade do genoma durante a fase S (Ibarra *et al.*, 2008).

As Mcm estão presentes em todas as fases do ciclo celular nas células em divisão, mas estão ausentes durante os períodos de quiescência. Devido a esta característica, as Mcm têm sido consideradas como uma nova classe de marcadores de proliferação celular (Stoeber *et al.*, 2001). A alteração na expressão das proteínas iniciadoras da replicação do DNA pode resultar em instabilidade genômica e contribuir para a transformação maligna celular (Tanaka & Diffley 2002). Assim, o complexo Mcm2-7 está sendo estudado como marcador preditivo de tumores malignos, uma vez que as células neoplásicas ou com perda de diferenciação reiniciam o ciclo celular de maneira acentuada, favorecendo assim, o aumento da expressão de proteínas envolvidas no início do processo de proliferação. Nas células normais a expressão dessas proteínas tende a ser mais baixa, já que o ciclo celular não é reiniciado tantas vezes (Gonzalez *et al.*, 2003). Assim, alguns trabalhos verificaram que a família Mcm, em especial as Mcm-2 e Mcm-5, funcionam como bons biomarcadores de lesões pré-malignas e malignas (Going *et al.*, 2002; Alison *et al.*, 2002; Ishimi *et al.*, 2003, Torres-Rendon *et al.*, 2009).

Kodani *et al.* (2003) estudaram alguns marcadores de proliferação celular em CECs orais, e levaram em consideração alguns fatores como a diferenciação histológica das lesões, o padrão de invasão, metástases e prognóstico. Os autores verificaram que a expressão de Mcm-2 em CEC moderadamente diferenciado foi

significativamente maior quando comparada com CEC bem diferenciado. Além disso, correlacionaram a expressão da Mcm-2 com o padrão de invasão tumoral e prognóstico. Embora não tenha sido estatisticamente significativa, o índice de proliferação do Mcm-2 foi maior no grupo que apresentou metástase quando comparado ao grupo com ausência de metástases.

Li *et al.* (2008) em um estudo com displasia epitelial e CEC em língua, verificaram que a expressão de Mcm-2 através da quantificação de RNA mensageiro foi significativamente maior nos casos de CEC quando comparado com os casos de displasia. Notaram também que a expressão de Mcm-2 aumentava de acordo com a severidade da displasia, indicando assim que Mcm-2 pode ser um bom marcador na diferenciação de lesões displásicas e CECs de língua.

Vargas *et al.* (2008) em um estudo avaliando a expressão de Ki-67, Mcm-2 e geminina em diferentes neoplasias malignas de glândulas salivares verificaram que a expressão de Mcm-2 foi maior que a dos outros marcadores e atribuem esta diferença ao fato da Mcm-2 ser expressa em todo ciclo celular, inclusive no início de G1. Os autores sugerem que a Mcm-2 é um marcador de proliferação celular sensível para os tumores de glândulas salivares e que pode ser útil no diagnóstico diferencial entre o adenoma pleomorfo, carcinoma ex-adenoma pleomorfo, CAC e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau.

Torres-Rendon *et al.* (2009) avaliaram a expressão de Mcm-2, geminina e Ki-67 em mucosa oral normal, com displasia e CEC oral. A expressão dos três marcadores foi estatisticamente significativa e crescente nas amostras de mucosa normal, mucosa displásica e CEC. A expressão de Mcm-2 foi estatisticamente maior nos casos de displasia epitelial que evoluíram para CEC quando comparada com os casos de displasia que não sofreram diferenciação maligna, o que reforça a efetividade da Mcm-2 como marcador de lesões pré-malignas epiteliais. Os autores encontraram uma alta expressão de Mcm-2 em lesões displásicas quando comparada com o valor encontrado em mucosa oral normal, e relacionam esta diferença com um possível mecanismo de defesa do genoma antes que a

transformação maligna ocorra, já que as proteínas Mcm são importantes na manutenção da integridade do genoma durante a fase S. Chatrath *et al.* (2003) encontraram resultados semelhantes em amostras teciduais de laringe. Os autores verificaram a expressão crescente de Ki-67 e Mcm-2 nas amostras de mucosa normal, mucosa displásica e CEC.

Alguns autores sugerem as Mcm como bons marcadores de proliferação celular e indicadores de prognóstico em diversos tipos de tumores, porém a literatura ainda não relata estudos que relacionem a expressão destas proteínas em CEC-pd e CEB em região de cabeça e pescoço.

2.6.3 HOXB7

Os genes homeobox (“master control genes”) são conhecidos como os genes controladores do desenvolvimento, pois regulam aspectos da embriogênese e morfogênese, através do controle da proliferação e diferenciação celular. Esses genes possuem um segmento de DNA característico (“homeobox”), que codifica proteínas com a função de fatores de transcrição que atuam na regulação desses processos (Yoshida *et al.*, 2006). O nome homeobox foi dado a este grupo de genes a partir dos genes homeóticos da mosca *Drosophila melanogaster*, que são responsáveis pelo fenômeno de homeose, onde há substituição parcial ou completa de um segmento do corpo por outro, que normalmente não é encontrado naquele lugar (Lord *et al.*, 2005; Samuel & Naora, 2005). Esta família de genes conta com mais de 200 membros, e apresentam como característica comum a sequência altamente conservada da mosca *Drosophila melanogaster*, chamada de hemodomínio, que é formada por 183 nucleotídeos (Chen *et al.*, 2005; Freschi *et al.*, 2005).

Estes genes também são responsáveis pela ativação, repressão ou modulação de outros genes que codificam moléculas de adesão, fatores de crescimento e proteínas da matriz extracelular (Caré *et al.*, 1996; Leroy *et al.*, 2004; Argiropoulos & Humphries, 2007). Além da proliferação e diferenciação

celular, os genes homeobox estão envolvidos em outros processos como morte celular, interação célula-célula e célula-matriz extracelular (Raman *et al.*, 2000; Leroy *et al.*, 2004; Hassan *et al.*, 2006).

Os genes homeobox são divididos em duas classes. A classe I contém genes agrupados em complexos de acordo com a seqüência de nucleotídeos, posição dos íntrons e a associação com co-fatores. A classe II corresponde aos genes homeobox divergentes e dispersos pelo genoma, e corresponde a maioria dos genes (Owens & Hawley, 2002). Os genes da família HOX pertencem à classe I e correspondem ao principal grupo de genes homeobox, são os genes mais bem descritos e amplamente estudados na literatura.

Os genes HOX são encontrados em quase todos os animais, exceto nas esponjas (Lemons & McGinnis, 2006). Em humanos, os genes HOX possuem 39 membros dispostos em quatro grupos (A, B, C e D), com 9 a 11 genes em cada grupo, localizados nos cromossomos 7, 17, 12 e 2, respectivamente (Chen *et al.*, 2005). Muitos estudos sugerem que a família HOX atua diretamente em tecidos adultos que possuem atividades proliferativas, de diferenciação e regeneração muito intensas. Além desses processos, os genes HOX ativos podem também estimular a produção dos fatores de crescimento. O gene HOXB7 quando superexpresso ativa o fator de crescimento fibroblástico básico (b-FGF) favorecendo a proliferação celular descontrolada em melanomas de pele (Caré *et al.*, 1996).

Nos tecidos neoplásicos, os genes homeobox podem apresentar diferentes padrões de expressão. Alguns genes são re-expressos em células tumorais que são originárias de tecidos em que esses genes foram expressos durante a embriogênese. Outro grupo de genes desenvolve uma nova expressão no tecido tumoral, ou seja, são expressos nas células tumorais, mas normalmente não são expressos nas células de origem durante a embriogênese. O terceiro grupo corresponde aos genes que têm sua expressão diminuída em células neoplásicas quando comparada à sua expressão no tecido sadio.

Em 2006, Wu *et al.* verificaram que o HOXB7 estava associado a um pior prognóstico de câncer de mama devido a sua interação com b-FGF. Chen *et al.* (2005) estudaram a expressão de diferentes genes HOX em amostras de mucosa normal esofágica e de CEC esofágico. Os autores verificaram que o gene HOXB7 foi expresso apenas nas amostras de CEC, sugerindo seu papel no desenvolvimento tumoral. Yamashita *et al.* (2006) demonstraram que a inibição do HOXB7 se relaciona a diminuição da capacidade de invasão de células malignas, em câncer de ovário.

Hassan *et al.* (2006) realizaram um estudo com amostras de mucosa oral, comparando amostras de tecido normal, apresentando displasia e CEC. Os autores verificaram que a expressão de HOXB7 foi crescente nas amostras de tecido normal, com displasia e com CEC, sugerindo sua importância no desenvolvimento e na progressão tumoral. De Souza Setubal Destro *et al.* (2010) verificaram que a expressão de HOXB7 foi estatisticamente significante maior em amostras de CEC oral quando comparadas com amostras de mucosa normal. Além disso, os autores verificaram que a superexpressão deste gene favorece a proliferação celular tumoral, e que a sua expressão se relaciona diretamente com o tamanho dos tumores, com metástases regionais e com a sobrevida dos pacientes.

Existem trabalhos na literatura que demonstram que a alteração no padrão de expressão de HOXB7 está envolvida com o desenvolvimento e progressão tumoral, prognóstico e sobrevida dos pacientes, porém, ainda não há estudos que relatem o padrão de expressão imunoistoquímica de HOXB7 em neoplasias malignas basalóides em região de cabeça e pescoço.

3. PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

- Avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas Ki-67, MCM-2 e HOXB7 em neoplasias basalóides de cabeça e pescoço (carcinomas espinocelulares pouco diferenciados, carcinomas escamosos basalóides e carcinomas adenóide císticos variante sólida).
- Avaliar a utilidade destas três proteínas indicadoras de proliferação celular no diagnóstico diferencial destas neoplasias basalóides.
- Correlacionar o índice de marcação (IM) entre os três marcadores de proliferação celular independentemente do grupo tumoral.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

A realização do presente pesquisa foi aprovada pelo CEP da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (001/2008).

4.2 População estudada

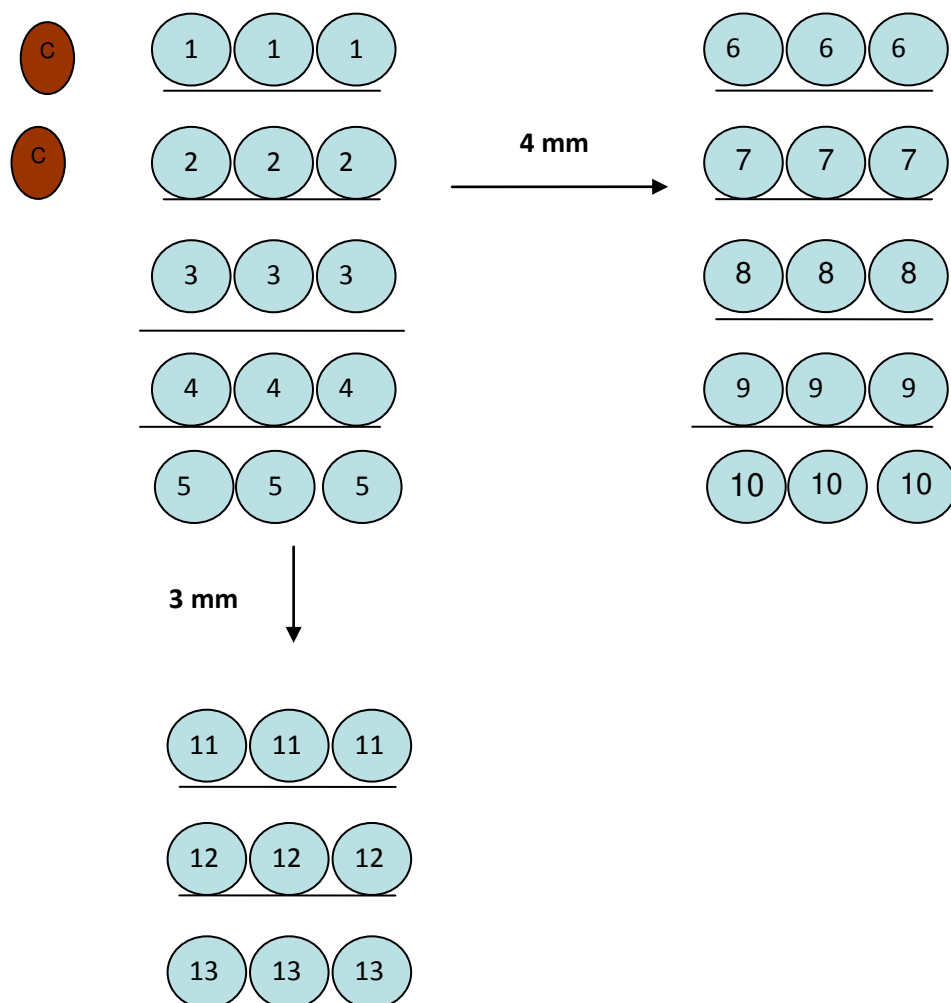
Foram analisadas 42 amostras de tumores basalóides malignos de cabeça e pescoço, as quais foram compostas por 15 CEC-pd, 18 CEB e nove CAC-sólido. Estas amostras foram coletadas dos arquivos dos seguintes laboratórios: 1- Laboratório de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas; 2- Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (Profa. Albina Altemani); 3- Departamento de Patologia Oral da Universidade de Sheffield – Inglaterra (Prof. Paul Michael Speight); 4- Centro Clínico de Cabeça e Pescoço, Cidade da Guatemala – Guatemala (Dr. Román Carlos-Bregni). Os critérios histopatológicos usados para diagnosticar e classificar estas neoplasias basalóides seguiram os critérios descritos e recomendados da OMS-2005.

Todas as amostras teciduais já estavam emblocadas em parafina. Foram feitos cortes de 5 µm em cada bloco, e estes foram corados com hematoxilina e eosina (H&E). Os cortes em H&E foram utilizados para a análise histopatológica de cada amostra e os diagnósticos foram confirmados pelos pesquisadores LAR e PAV. A análise dos cortes foi realizada em microscopia de luz, em microscópio binocular (Nikon YS 100, Japão).

As amostras cedidas pelo Departamento de Patologia Oral da Universidade de Sheffield – Inglaterra estavam distribuídas em uma única lâmina, através da técnica “Tissue Microarray”, (TMA). Vale salientar que este bloco de parafina (TMA) foi confeccionado pelo pesquisador PAV usando um “tissue arrayer”

(organizador de tecido), (Mitogen, Beecher Instruments, Inc.), presente no Departamento de Patologia da Universidade de Sheffield, após classificar estas neoplasias segundo os critérios descritos e recomendados pela OMS em lâminas de H&E convencionais. Esta técnica se baseia na organização de diferentes amostras de tecidos em um mesmo bloco de parafina (Kononen *et al.*, 1998). Para a sua construção, foi utilizada uma agulha cilíndrica (“punch”), que retirou uma pequena parte dos tecidos incluídos em blocos de parafina pré-existent (blocos doadores). Posteriormente, os tecidos removidos dos blocos doadores foram rearranjados em um novo bloco de parafina (bloco receptor). Dessa forma, 13 amostras foram colocadas em um único bloco de parafina. Esta técnica permitiu grande economia de reagentes e de tempo para a realização das reações imunoistoquímicas. Outra vantagem da técnica é a uniformização das reações e facilitação da interpretação comparativa entre os casos pesquisados. No presente trabalho, 13 amostras (CEB, n=9 e CAC-sólido, n=4) foram analisadas em triplicata em uma única lâmina, conforme o exemplo a seguir.

Figura 1. Legenda utilizada para a confecção de lâmina através da técnica de TMA.



Grande parte das amostras teciduais estudadas foi obtida através de biópsias incisionais (23 amostras, 52%) e apenas seis amostras (14%) foram obtidas de peças cirúrgicas. A média de idade encontrada entre os 42 pacientes foi de 57 ($\pm 14,5$) anos, sendo a maioria do gênero masculino (76%). Apenas 27 das 42 amostras estudadas apresentaram informações quanto ao tamanho do tumor (variando de 0,2-10,0cm). Destas 27 amostras, nove pertenceram ao grupo CEC-pd, 13 ao grupo CEB e cinco ao grupo CAC-sólido (**Tabela 1**). A **Tabela 2**

resume as informações gerais obtidas sobre a população estudada, em relação à presença de metástases, tratamento empregado e recorrências.

Com relação ao hábito de fumar, foi verificado que 10 pacientes eram fumantes (seis pacientes do grupo CEC-pd e quatro pacientes do grupo CEB), oito não fumavam (cinco pacientes do grupo CEC-pd, dois pacientes do grupo CEB e um paciente do grupo CAC-sólido), e em 34 casos esta informação não estava disponível. Entre os pacientes fumantes, um utilizava cigarro de palha e o restante utilizava cigarros com filtro de papel, variando entre 10 a 20 cigarros por dia. Quanto ao hábito de consumir bebida alcoólica regularmente, apenas cinco pacientes relataram não consumir este tipo de produto, porém esta informação não estava disponível para os demais pacientes.

Tabela 1. Características gerais da população estudada.

Tipo de tumor	Gênero	Idade média (anos)	Localização	Tamanho (variação da maior extensão - cm)
CEC-pd (n=15)	F=1	57	gengiva (maxila) (n=1)	1,1 – 10,0
	M=14		gengiva (mandíbula) (n=1)	
			palato duro (n=2)	
			assoalho bucal (n=2)	
			lábio superior (n=1)	
			lábio inferior (n=1)	
			hipofaringe (n=2)	
			laringe (n=3)	
			órbita (n=1)	
			ND (n=1)	
CEB (n=18)	F=1	61	gengiva (maxila) (n=1)	0,2 – 9,0
	M=17		palato duro (n=1)	
			palato mole (n=1)	
			trígono retromolar (n=1)	
			língua (n=4)	
			assoalho bucal (n=1)	
			mucosa jugal (n=2)	
			laringe (n=2)	
			ND (n=5)	
CAC Sólido (n=9)	F=8	50	palato mole (n=3)	0,2 – 10,0
	M=1		mucosa jugal (n=1)	
			glândula submandibular (n=1)	
			ND (n=4)	

*F= feminino; M= masculino; ND= não disponível; CEC-pd= carcinoma espinocelular pouco-diferenciado; CEB= carcinoma escamoso basalóide; CAC-sólido= carcinoma adenóide cístico do tipo sólido

Tabela 2. Avaliação da presença de metástases, tratamento empregado e recorrências.

Tipo de tumor	Número de amostras	Metástase	Tratamento	Recorrência
CEC-pd	15	linfonodos cervicais (n=4) ausente (n= 4) ND= (n=7)	Cirúrgico (n=2) ND (n=13)	Ausente (n=3) ND (n=12)
CEB	18	linfonodos cervicais (n=3) ausente (n=9) ND (n=6)	Cirúrgico (n=2) C+R+Q (n=1) ND (n=15)	Presente (n=2) Ausente (n=3) ND (n=13)
CAC-sólido	09	Pulmão (n=2) Ausente (n=6) ND (n=1)	Cirúrgico (n=3) ND (n=6)	Presente (n=2) Ausente (n=1) ND (n=6)

* ND= não disponível. C+R+Q= cirurgia, radioterapia e quimioterapia.

4.3 Estudo Imunoistoquímico

As reações de imunoistoquímica para Ki-67, Mcm-2 e HOXB7 foram realizadas em cortes de 3µm fixados em lâminas previamente silanizadas. Os cortes foram diafanizados em xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool e lavados em água corrente e em água destilada. Em seguida foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 10 volumes em cinco banhos de cinco minutos cada. A recuperação antigênica utilizada foi o ácido cítrico 0,01M, pH=6,0, em panela de pressão durante três minutos. Depois de

atingirem a temperatura ambiente, os cortes foram então lavados em solução salina tamponada com fosfato (PBS) em pH=7,4.

Em seguida, os cortes foram tratados com 1% albumina sérica bovina (BSA) em PBS durante uma hora, e incubados em câmara úmida por 18h a 4⁰C com o anticorpo primário. Após a incubação, os cortes foram lavados por três vezes com solução de PBS, e em seguida foram incubados com o anticorpo secundário. Os anticorpos primários e secundários utilizados, a diluição empregada e os fabricantes dos anticorpos estão descritos na **Tabela 3**.

Nos casos em que o LSABTM foi utilizado com anticorpo secundário, os cortes foram cobertos com biotina e colocados em estufa a 37⁰C durante 30 minutos, e posteriormente lavados com PBS por três vezes. Em seguida, os cortes foram cobertos com a streptavidina, e novamente colocados em estufa a 37⁰C por 30 minutos, para depois serem lavados com PBS. Após esta etapa, os cortes foram então incubados com a solução cromógena (diamino-benzidina-DAB), em estufa, durante cinco minutos.

Para os casos em que o sistema AdvanceTM HRP foi utilizado como anticorpo secundário, os cortes foram cobertos com o AdvanceTM HPR Link e colocados em estufa a 37⁰C por 30 minutos. Após as três lavagens com PBS, os cortes foram cobertos com a enzima AdvanceTM HRP, e colocados em estufa a 37⁰C por 30 minutos. Em seguida foram incubados com a solução cromógena diaminobenzidina (DAB), em estufa, durante cinco minutos.

Após a revelação com o cromógeno, todos os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Carazzi por três minutos, lavados em água corrente e água destilada, desidratados com soluções alcoólicas em concentrações crescentes e diafanizados em xilol. As lâminas finalmente foram montadas com as lamínulas utilizando Bálsamo do Canadá. Em todas as reações imunoistoquímicas foram utilizados controles positivos (amostras de CEC de língua) e controles negativos (amostras de CEC de língua com omissão do anticorpo primário).

Tabela 3. Informações sobre os anticorpos primários e secundários utilizados.

Anticorpo Primário	Clone	Isótopo	Diluição e Anticorpo secundário	Marca e Origem
Ki-67	MIB-1	Monoclonal, Rato	1:200, LSAB™	Dako, Glostrup, Dinamarca
Mcm-2	CTRCT2.1	Monoclonal, Rato	1:50, Advance™	Novocastra, Newcastle, Reino Unido
HOXB7	-	Policlonal, Coelho	1:100, LSAB™	Invitrogen, Camarillo, EUA

4.4 Histomorfometria (Contagem das Células Tumorais)

O índice de marcação (IM) das proteínas Ki-67, Mcm-2 e HOXB7 foi obtido através da porcentagem de células positivas de cada caso. Foram avaliadas as populações celulares neoplásicas dos três tipos tumorais. As células consideradas positivas apresentavam somente marcação nuclear, independente da intensidade da marcação (cor marrom). Já as células consideradas negativas não apresentaram coloração característica na região nuclear. Foram analisados aleatoriamente seis campos com aumento de 400X para cada caso. A contagem das células foi realizada no sistema de análise de imagem KONTRON KS 400 (Carl Zeiss, Alemanha).

4.5 Análise Estatística

Os dados obtidos neste trabalho foram analisados através de testes estatísticos não paramétricos (Teste de Kruskal-Wallis e Coeficiente de Spearman). O programa NCSS 2000 (NCSS, Kaysville – EUA) foi utilizado para o processamento destes dados, os quais foram compostos por idade, gênero e média da porcentagem de expressão de Ki-67, Mcm-2 e HOXB7. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Características epidemiológicas e clínicas

A idade média encontrada nos 42 pacientes estudados foi 57($\pm 14,5$) anos, e este mesmo valor foi encontrado para o grupo CEC-pd (57 anos, $\pm 12,1$). Para os grupos CEB e CAC-sólido, a idade média foi de 61 anos ($\pm 14,1$) e 50 anos ($\pm 17,4$), respectivamente. O gênero masculino foi predominantemente afetado nos grupos CEC-pd e CEB, em 93% e 94% dos casos. Porém, nos casos de CAC-sólido o gênero feminino foi o mais acometido (89%), (**Tabela 4**).

Tabela 4. Distribuição da população estudada em idade e gênero em relação aos distintos tipos de neoplasias.

	CEC-pd	CEB	CAC sólido
Idade			
(anos)	57 ($\pm 12,1$)	61 ($\pm 14,1$)	50 ($\pm 17,4$)
Gênero			
(F:M)	(1:14)	(1:17)	(8:1)

Abreviaturas similares à tabela 1.

Quanto à localização, 23 casos estudados acometeram a cavidade oral, cinco estavam localizados em laringe, dois em hipofaringe, um em glândula submandibular, um em órbita, e em 10 casos as informações sobre a localização das lesões não estavam disponíveis.

Não foi possível correlacionar o tamanho dos tumores com o IM das proteínas estudadas, ou seja, a expressão das proteínas variou de forma independente do tamanho das lesões tumorais (**Tabela 5**). As informações

relacionadas ao tratamento dos pacientes não foram obtidas na maioria dos casos. Apenas dois casos encaminhados ao Laboratório de Patologia (FOP-UNICAMP) e três casos atendidos no Orocentro (FOP-UNICAMP) apresentaram informações relacionadas ao tratamento das lesões. Os pacientes foram encaminhados para o cirurgião de cabeça e pescoço, e o tratamento proposto foi cirúrgico em quatro casos (dois casos de CEB e dois casos de CEC-pd) e cirúrgico com radioterapia e quimioterapia adjuvantes em um caso (CEB).

Tabela 5. Tamanho médio das lesões tumorais.

	CEC-pd	CEB	CAC sólido
Tamanho médio (cm)	4,3 ($\pm 3,4$)	2,9 ($\pm 2,6$)	4,8 ($\pm 4,8$)

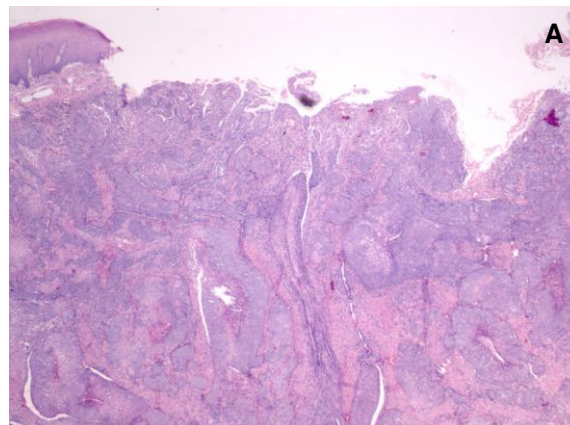
5.2 Características histopatológicas das amostras coradas em H&E.

CEC-pd

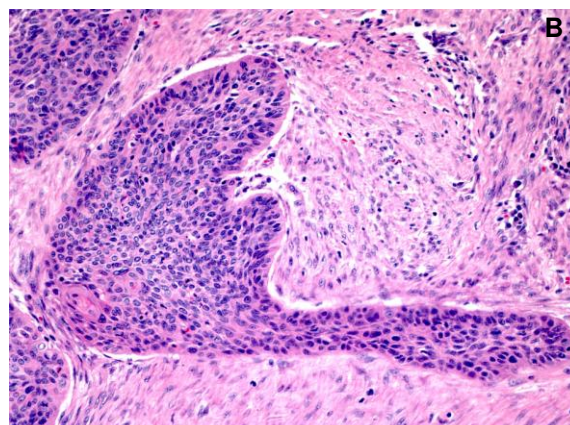
As amostras de CEC-pd apresentaram cordões neoplásicos com margens pouco definidas e ilhas de células tumorais indiferenciadas invadindo o tecido conjuntivo subjacente. As células neoplásicas apresentaram morfologia variável, com citoplasma eosinofílico escasso e núcleos hipercromáticos. O tecido conjuntivo apresentou aspecto fibrocelular e as figuras de mitoses foram freqüentes. No entanto, a diferenciação escamosa foi evidente em todos estes casos, na forma de queratinização focal (extracelular ou intracelular), de grupos celulares a células individuais. É possível notar a presença de ilha formada por células basalóides neoplásicas. (**Figura 2**).

Figura 2. Carcinoma espinocelular pouco-diferenciado. Coloração em H&E.

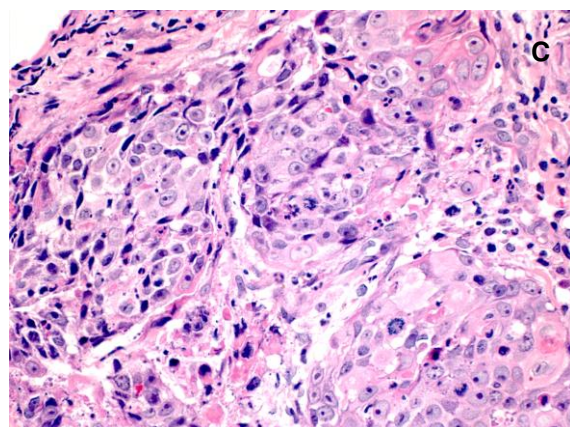
A. Visão panorâmica do tumor em assoalho bucal, apresentando superfície ulcerada, cordões neoplásicos com margens pouco definidas e ilhas de células tumorais invadindo o tecido conjuntivo subjacente (25x).



B. Ilha de células tumorais com evidente diferenciação escamosa. As células apresentam morfologia variável, discreta paliçada periférica, citoplasma eosinofílico escasso e núcleos hipercromáticos. Evidencia-se também tecido conjuntivo fibrocelular associado a infiltrado inflamatório linfoplasmocitário focal (200x).



C. Células neoplásicas indiferenciadas mostrando citoplasma eosinofílico evidente, núcleo vesicular com nucléolo central evidente e figuras de mitoses atípicas (400x).

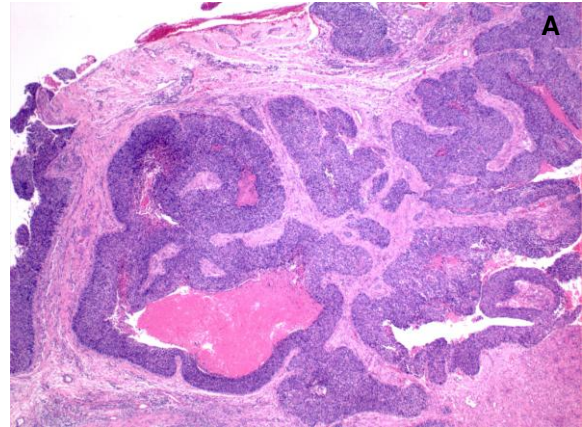


CEB

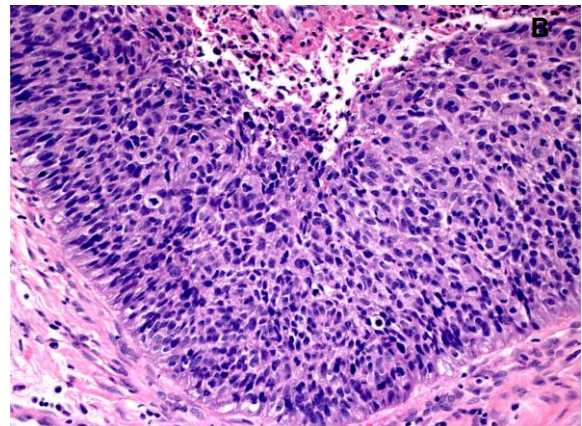
Ao exame microscópico, as amostras de CEB apresentaram como característica principal duas populações celulares distintas, uma formada por células basalóides, e outra população de células com diferenciação escamosa. As células basalóides organizaram-se em lóbulos irregulares apresentando áreas centrais de comedonecrose. Foi possível notar núcleos celulares hipercromáticos e nucléolos pouco evidentes. As células basalóides se organizaram em paliçada na periferia dos lóbulos. Mitoses atípicas foram comuns em todas as amostras. As células da população escamosa apresentaram pleomorfismo e citoplasma eosinofílico (**Figura 3**).

Figura. 3. Carcinoma escamoso basalóide. Coloração em H&E.

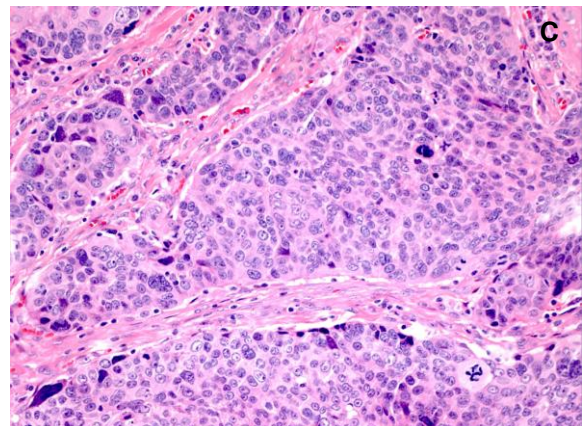
A. Visão panorâmica do tumor afetando gengiva. Presença de lóbulos tumorais apresentando células basalóides e comedonecrose na porção central (25x).



B. Lóbulo tumoral mostrando a diversidade morfológica das células neoplásicas. Note mitoses atípicas, hiperchromatismo nuclear e nucléolos pouco evidentes. Na periferia dos lóbulos, as células basalóides organizam-se em paliçada, enquanto na parede central é possível observar comedonecrose (400x).



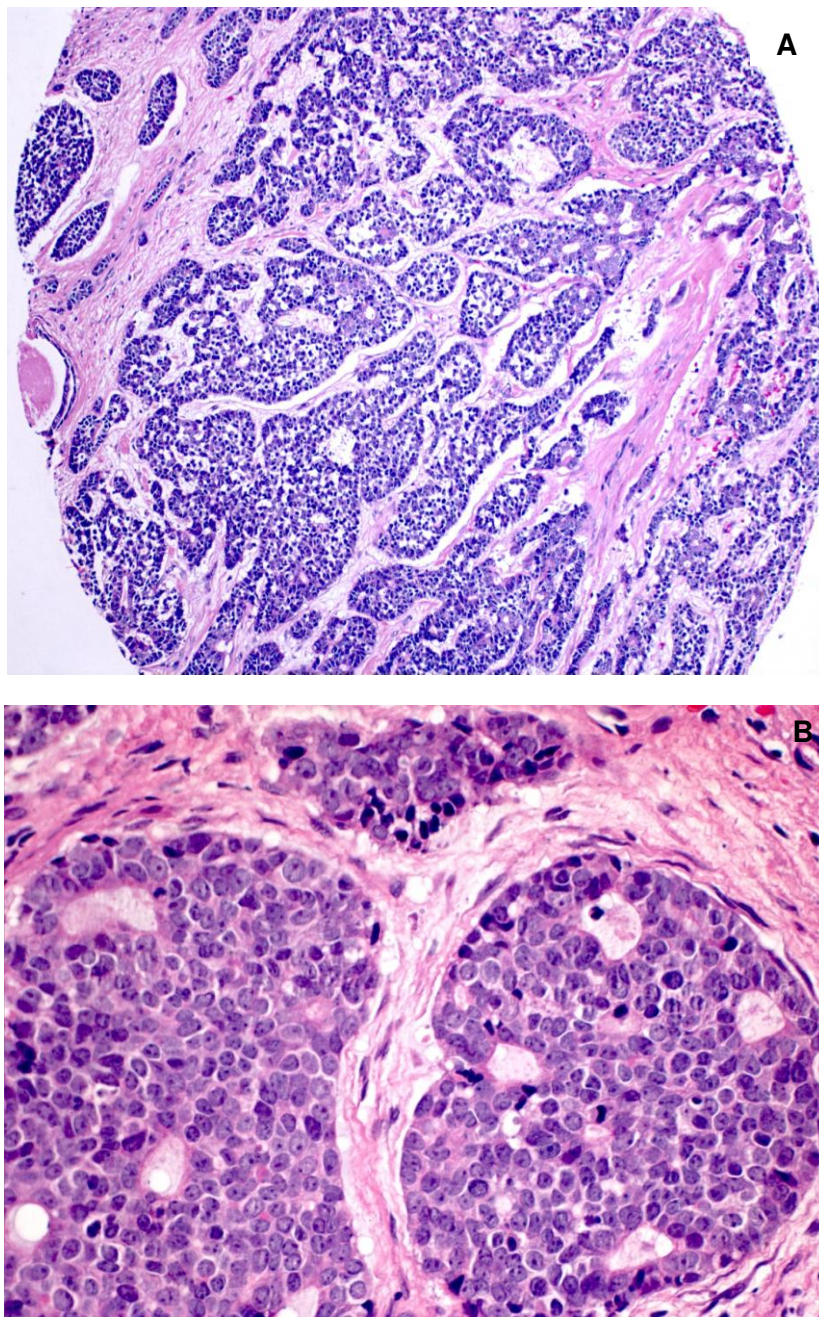
C. Ilhas tumorais com células apresentando diferenciação escamosa com discretas junções intercelulares. Pleomorfismo celular e mitoses atípicas evidentes. As ilhas tumorais estão separadas por feixes de tecido conjuntivo fibrocelular (200x).



CAC-sólido

O CAC-sólido apresentou ninhos ou cordões formados por células basalóides, pequenos espaços preenchidos com material mucoso, figuras de mitoses atípicas freqüentes e tecido conjuntivo hialino circundando esses ninhos ou cordões celulares (**Figura 4**).

Figura 4. Carcinoma adenóide cístico tipo sólido. Coloração em H&E.



A. Visão panorâmica do tumor em palato mole utilizando a técnica TMA. Presença de ninhos e cordões com células basalóides e estroma hialino (100x). **B.** Ninhos de células basalóides apresentando núcleos hipercromáticos e citoplasma escasso, figuras de mitoses, e espaços pseudoductais preenchidos com material mucóide (400x).

5.3 Características Imunoistoquímicas

Todos os marcadores de proliferação celular foram positivos em todos os casos avaliados (n=42).

Ki-67

A proteína Ki-67 apresentou IM semelhante entre os grupos CEC-pd (IM=43,56 $\pm$ 10,7) e CEB (IM=42,22 $\pm$ 16,8). O IM de Ki-67 para o grupo CAC sólido (IM=18,74 $\pm$ 8,3, $p < 0,05$) foi menor quando comparado aos dois primeiros grupos, correspondendo quase à metade dos valores encontrados (**Tabela 6**), (**Figura 5**).

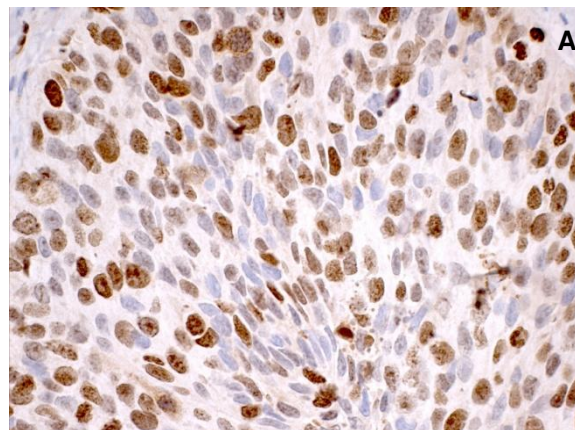
Tabela 6. Índice de marcação da proteína Ki-67 nos diferentes tipos de neoplasias basalóides avaliadas neste estudo.

	CEC-pd	CEB	CAC-sólido
Média	43,54 $\pm$ 10,7	42,22 $\pm$ 16,8	18,74 $\pm$ 8,3
Variação	27,74 – 63,51	11,32 – 69,41	11,65 – 34,26
Mediana	46,98	42,10	15,53

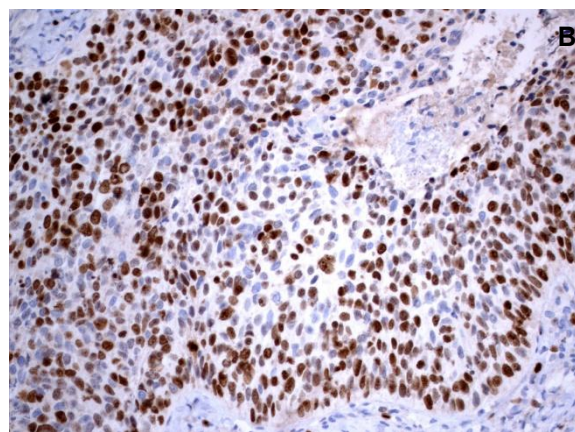
Abreviaturas similares à tabela 1.

Figura 5. Padrão da imunoexpressão de Ki-67 em carcinoma espinocelular pouco-diferenciado, carcinoma escamoso basalóide e carcinoma adenóide cístico tipo sólido.

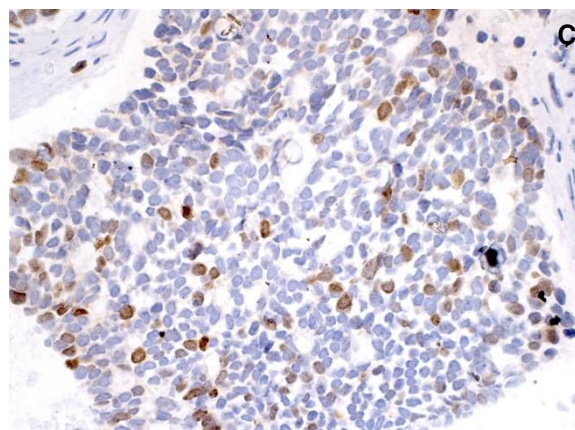
A. Carcinoma espinocelular pouco-diferenciado. A marcação é intensa e distribuída de forma homogênea por toda população neoplásica (400X).



B. Carcinoma escamoso basalóide. A marcação da proteína é intensa e distribuída por todo o lóbulo tumoral (200x).



C. Carcinoma adenóide cístico tipo sólido. Numerosas células são positivas, porém em menor número quando comparado com o carcinoma espinocelular pouco-diferenciado e carcinoma escamoso basalóide (400x).



Mcm-2

O IM de Mcm-2 foi maior no grupo do CEB e estatisticamente significativo (IM=55,57 $\pm$ 13,4, $p < 0,05$), quando comparado aos demais grupos estudados. Seguindo em ordem decrescente, o IM para Mcm-2 foi igual a 35,55 $\pm$ 19,5 para o grupo CEC-pd e 28,60 $\pm$ 10,1 para o CAC-sólido (**Tabela 7**), (**Figura 6**).

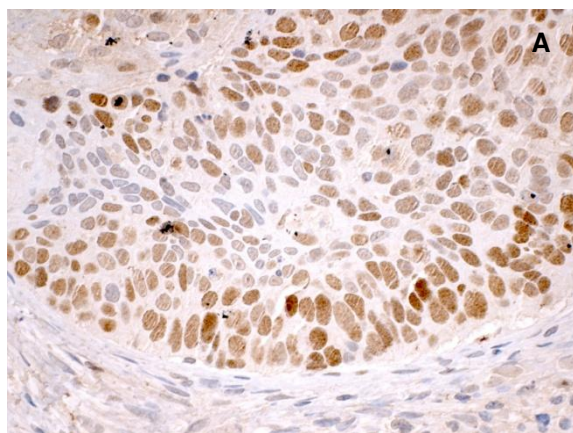
Tabela 7. Índice de marcação da proteína Mcm-2 nos diferentes tipos de neoplasias basalóides avaliadas neste estudo.

	CEC-pd	CEB	CAC-sólido
Média	35,55 ($\pm$ 19,5)	55,57 ($\pm$ 13,4)	28,60 ($\pm$ 10,1)
Variação	7,69 – 73,28	27,29 – 76,05	11,00 – 43,16
Mediana	39,89	53,70	26,69

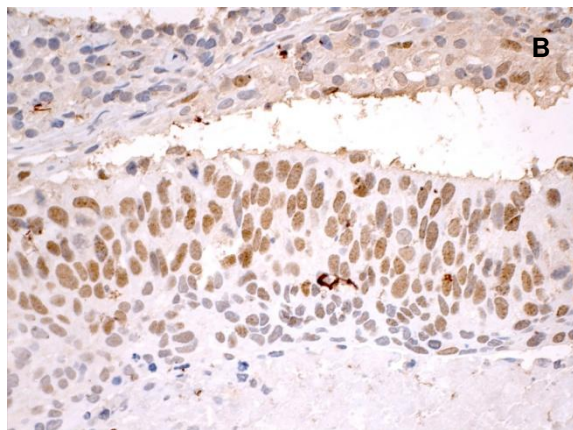
Abreviaturas similares à tabela 1.

Figura 6. Padrão da imunexpressão de Mcm-2 em carcinoma espinocelular, carcinoma escamoso basalóide e carcinoma adenóide cístico tipo sólido.

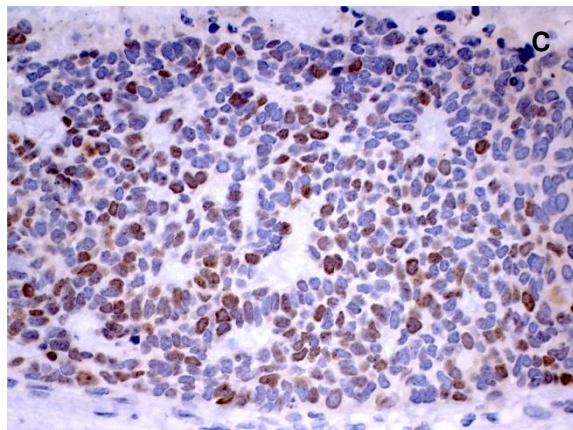
A. Carcinoma espinocelular pouco-diferenciado. A periferia da ilha tumoral apresenta células neoplásicas fortemente positivas para Mcm-2. Note que algumas células ao centro são negativas (400x).



B. Carcinoma escamoso basalóide. A marcação é intensa e bem distribuída em todas as células tumorais (400x).



C. Carcinoma adenóide cístico tipo sólido. A marcação nuclear está distribuída de maneira homogênea. Note que a marcação das células luminais também são positivas (400x).



HOXB7

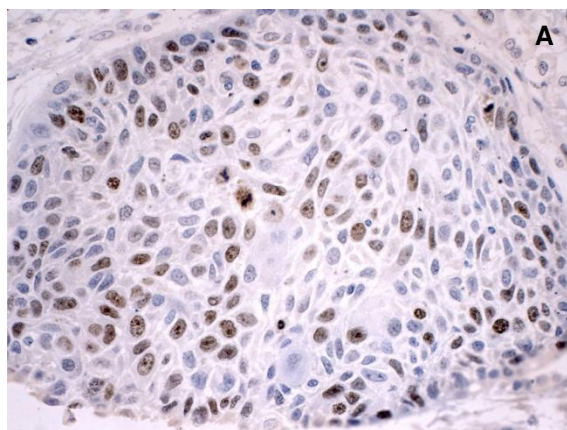
O padrão de imunoexpressão da proteína HOXB7 nos tumores analisados foi similar ao da proteína Mcm-2, ou seja, o grupo CEB (31,28 $\pm$ 11,6) apresentou uma maior expressão quando comparado ao CEC-pd (23,19 $\pm$ 8,4) e ao CAC-sólido (18,66 $\pm$ 9,8), (**Tabela 8**), (**Figura 7**). A reação para HOXB7 não foi realizada em quatro casos de CAC sólido por falta de amostra tecidual.

Tabela 8. Índice de marcação da proteína HOXB7.

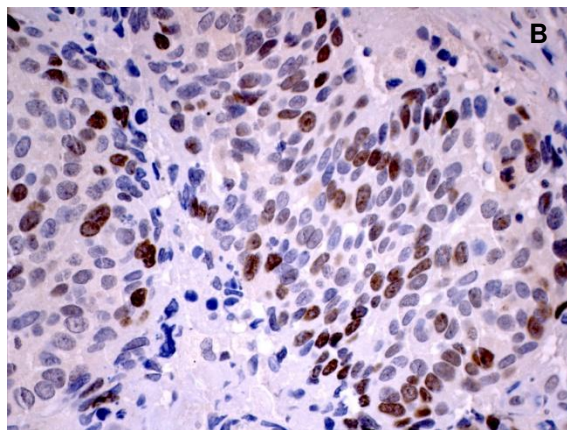
	CEC-pd	CEB	CAC-sólido
Média	23,19 $\pm$ 8,4	31,28 $\pm$ 11,6	18,66 $\pm$ 9,8
Variação	7,74 – 37,56	10,58 – 49,88	4,44 – 32,34
Mediana	25,00	31,39	17,64

Figura 7. Padrão da imunoexpressão de HOXB7 em carcinoma espinocelular pouco-diferenciado, carcinoma escamoso basalóide e carcinoma adenóide cístico tipo sólido.

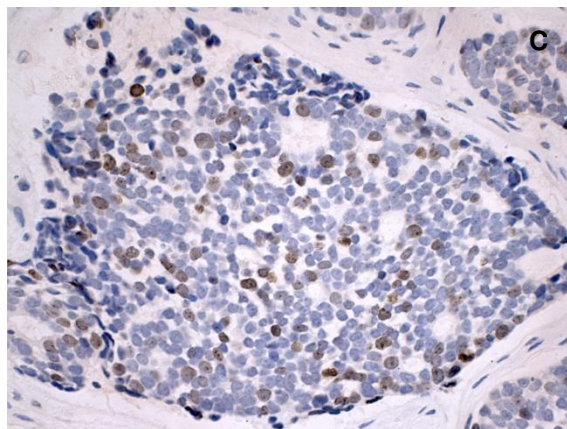
A. Carcinoma espinocelular pouco-diferenciado. Marcação nuclear nas células neoplásicas periféricas e centrais com igual intensidade. Note que algumas células são negativas (400x).



B. Carcinoma escamoso basalóide. A marcação de HOXB7 com intensidade variável envolve numerosas células por todo lóbulo tumoral (400x).



C. Carcinoma adenóide cístico tipo sólido. Marcação nuclear intensa, porém em menor número quando comparado com o carcinoma espinocelular pouco-diferenciado e carcinoma escamoso basalóide (400x).



No grupo CEC-pd, o marcador biológico com maior IM foi o Ki-67, seguido do Mcm-2 e HOXB7. Para os grupos CEB e CAC-sólido o IM referente ao Mcm-2 foi o maior, seguido do Ki-67 e HOXB7. A mediana foi determinada entre os grupos de tumores com o objetivo de se determinar a alta e a baixa expressão dos marcadores de proliferação celular.

Para avaliar a positividade dos marcadores de proliferação celular, independente do grupo tumoral, foi utilizado o “Coeficiente de Spearman”. Foi possível observar uma correlação direta e estatisticamente significativa entre a expressão dos marcadores de proliferação celular avaliados, como mostra a **Tabela 9**.

Tabela 9. Coeficiente de Sperman para avaliação da imunoexpressão dos marcadores Ki-67, Mcm-2 e HOXB7.

	Ki-67	Mcm-2	HOXB7
Ki-67	rs= 1,00000 p= 0,000000	rs= 0,331996 p= 0,031715	rs= 0,464092 p= 0,002920
Mcm-2	rs= 0,331996 p= 0,031715	rs= 1,000000 p= 0,000000	rs= 0,468016 p= 0,002660
HOXB7	rs= 0,464092 p= 0,002920	rs= 0,468016 p= 0,002660	rs= 1,000000 p= 0,000000

6. DISCUSSÃO

As neoplasias malignas epiteliais basalóides apresentam algumas características histopatológicas comuns, como o padrão sólido de crescimento formado por ilhas de células neoplásicas, células malignas com citoplasma escasso, núcleo hipercromático e comedonecrose no centro das ilhas tumorais. Embora os tumores basalóides compartilhem de algumas características microscópicas, apresentam diferenças importantes relacionadas ao comportamento clínico, prognóstico e protocolo de tratamento (Coletta *et al.*, 2002; Coletta *et al.*, 2006; Khaldi *et al.*, 2006). Além do CEB, CAC-sólido e CEC-pd, outros tumores são considerados neoplasias basalóides de cabeça e pescoço como carcinoma neuroendócrino, CEC de pequenas células, adenocarcinoma de células basais e ameloblastoma maligno (Banks *et al.*, 1992; Coppola *et al.*, 1993; Barnes *et al.*, 1996; Ferlito *et al.*, 1997; Coletta *et al.*, 2002). Na presente pesquisa conseguimos coletar um número razoável de amostras tumorais de CEC-pd (n=15), CEB (n=18) e CAC-sólido (n=9) através da união de quatro laboratórios de histopatologia, sendo dois nacionais (Piracicaba-SP e Campinas-SP) e dois internacionais (Guatemala e Reino Unido). Vale ressaltar que existem poucos trabalhos na literatura avaliando séries com mais de 15 amostras de CEB.

O CEC corresponde a 90% de todas as neoplasias malignas em região de cabeça e pescoço, portanto, é o tumor maligno mais comum em nasofaringe, hipofaringe, laringe, cavidade oral e orofaringe (Chan *et al.*, 2005; Cardesa *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005; Al-Reefy *et al.*, 2007; Marur *et al.*, 2008). Em região de cabeça e pescoço, o CEC é mais freqüente em homens, embora a relação homem/mulher varie entre as diferentes populações. No presente trabalho, os homens (n=14) foram mais afetados por CEC-pd do que as mulheres (n=1). A faixa etária mais acometida pelo CEC varia de acordo com a região anatômica afetada. Assim, nos casos de CEC em laringe e hipofaringe, a faixa etária mais atingida está entre 50 e 70 anos, e entre 40 e 60 anos para CECs localizados em nasofaringe, cavidade oral e orofaringe (Chan *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2005). A

idade média encontrada entre os nossos pacientes foi 57 anos. Porém, quando dividimos o grupo CEC-pd de acordo com a localização tumoral este valor muda para 59 anos para tumores em cavidade oral e orofaringe, 58 anos em laringe e 56 anos para aqueles localizados em nasofaringe. Recentemente, a incidência de câncer em região de orofaringe entre pacientes jovens tem aumentado. Este aumento tem sido atribuído a uma maior exposição dos jovens ao HPV. Embora a presença do HPV não tenha sido avaliada nas nossas amostras, alguns estudos demonstram que pacientes infectados pelo HPV apresentam um melhor prognóstico e respondem melhor ao tratamento quando comparados aos demais pacientes com CEC (Gillson *et al.*, 2000; Kreimer *et al.*, 2005; Chaturvedi *et al.*, 2008).

Microscopicamente, o CEC-pd caracteriza-se por células epiteliais indiferenciadas que invadem profundamente o tecido conjuntivo adjacente. Embora não seja comum, algumas vezes essas células podem se organizar em padrões basalóides com pequenos ninhos ou cordões irregulares, com discreta paliçada periférica. Geralmente, o padrão de queratinização no CEC-pd é pouco evidente. As células neoplásicas são predominantemente imaturas, ou seja, são pequenas, pleomórficas, e com núcleos hipercromáticos. As figuras de mitoses atípicas são freqüentes neste tipo de tumor. O estroma normalmente reage à invasão das células tumorais, com aumento no depósito de matriz extracelular, proliferação de miofibroblastos e aumento da vascularização local (Barnes *et al.*, 1996; Cardesa *et al.*, 2005). As amostras de CEC-pd (n=15) avaliadas neste estudo obedeceram às características histopatológicas descritas pela OMS, como mostra a **figura 2**.

Até o início da década de 1990, a cirurgia e a radioterapia eram consideradas as únicas modalidades terapêuticas efetivas para o tratamento do câncer em cabeça e pescoço. A partir daí, a quimioterapia foi inserida em alguns protocolos de atendimento com o objetivo de reduzir o número de metástases (Al-Sarraf *et al.*, 1998; Forastiere *et al.*, 2003; Marur *et al.*, 2008). O estadiamento clínico do tumor (TNM) e a viabilidade da ressecção cirúrgica são fatores

determinantes no estabelecimento do protocolo de tratamento. O tratamento do câncer de cabeça e pescoço requer uma abordagem multidisciplinar envolvendo médicos e outros profissionais da área da saúde (Marur *et al.*, 2008). Pelo menos dois dos 15 pacientes avaliados foram tratados apenas cirurgicamente.

O CEB corresponde a 2% de todas as neoplasias malignas da região de cabeça e pescoço, com cerca de 200 casos publicados na literatura (Soriano *et al.*, 2008). Trata-se de uma variante altamente agressiva do CEC, caracterizada microscopicamente pela presença do padrão basalóide e do padrão escamoso (Zbaren *et al.*, 2004; Cardesa *et al.*, 2005). Embora a sua ocorrência seja relatada em ambos os gêneros, os homens são mais freqüentemente afetados. Em concordância com a literatura, o presente estudo avaliou 18 pacientes diagnosticados com CEB em região de cabeça e pescoço, sendo que destes, apenas um pertenceu ao gênero feminino. A idade média encontrada no grupo de pacientes da pesquisa foi igual a 61 anos, também em concordância com a literatura que relata uma variação entre 60 e 80 anos de idade (Cardesa *et al.*, 2005).

Clinicamente o CEB apresenta-se como uma massa exofítica, geralmente ulcerada e sangrante em sua porção central. Os sintomas variam de acordo com a área acometida, sendo os mais comuns: dor, perda de peso, rouquidão, disfagia e tosse (Wain *et al.*, 1986; Banks *et al.*, 1992; Cardesa *et al.*, 2005). O hábito de fumar e o consumo excessivo de bebidas alcoólicas estão intimamente associados com o desenvolvimento da doença (Banks *et al.*, 1992; Cardesa *et al.*, 2005). Embora poucas informações clínicas tenham sido obtidas, foi possível verificar que dos 18 pacientes estudados quatro eram fumantes e dois não tinham o hábito de fumar.

A principal característica histopatológica do CEB é a presença de grandes áreas de epitélio neoplásico com aspecto basalóide associado à(s) área(s) de CEC *in situ*, invasivo ou foco(s) de displasia no epitélio de revestimento (Wain *et al.*, 1986; Banks *et al.*, 1992; Barnes *et al.*, 1996; Sampaio-Góes *et al.*, 2005; Soriano *et al.*, 2008). Os casos de CEB aqui relatados apresentaram

características como padrão basalóide composto por massas sólidas formadas por células em arranjo lobular em proximidade com a superfície; células basalóides pequenas com citoplasma escasso, com núcleos hipercromáticos e nucléolos pouco evidentes; células com diferenciação escamosa focal; assim como áreas de comedonecrose conforme ilustrado na **figura 3**.

Quanto ao tratamento, Soriano *et al.* (2008) sugeriram uma abordagem mais agressiva do que a adotada para o CEC, com esvaziamento cervical em todos os casos independente da presença ou não de linfonodos metastáticos. De acordo com Bonner *et al.* (2006), a associação das modalidades terapêuticas no tratamento de tumores de cabeça e pescoço se mostrou mais eficiente quando comparado ao tratamento radioterápico isoladamente. Pelo menos três dos 18 pacientes avaliados foram tratados cirurgicamente, sendo que apenas um deles recebeu quimioterapia adjuvante (presença de metástase cervical).

O CAC é a segunda neoplasia maligna mais comum em glândulas salivares, sendo superada apenas pelo carcinoma mucoepidermóide (Lopes *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 2005; da Cruz Perez *et al.*, 2006a; Pires *et al.*, 2007). Trata-se de uma neoplasia maligna basalóide formada por populações de células epiteliais e mioepiteliais modificadas. Dependendo de como essas células se organizam, o CAC pode apresentar diferentes padrões morfológicos como: tubular, cribiforme e sólido. Embora apresente um curso clínico lento, o CAC-sólido é uma neoplasia maligna muito agressiva com capacidade de invasão neural e óssea, e de produzir metástases à distância tardiamente. Este tumor representa cerca de 10% das neoplasias epiteliais de glândulas salivares, e afeta principalmente as glândulas parótidas, submandibulares e salivares menores intra-orais (El-Naggar & Huvos 2005; da Cruz Perez *et al.*, 2006a). Entre os nove casos de CAC-sólido analisados, um estava localizado em glândula submandibular e oito em glândulas salivares menores (sendo dois casos em palato mole, um em mucosa jugal, e as demais sem localização específica). Este tumor ocorre com maior frequência em pacientes adultos ou idosos. A média de idade encontrada no presente trabalho foi de 61 anos. A literatura também relata que o CAC não apresenta predileção por

gênero, exceto em casos de tumores localizados em glândula submandibular que são mais comuns em mulheres (Nascimento *et al.*, 1986; Bradley, 2004; El-Naggar & Huvos 2005). No presente estudo oito pacientes pertenceram ao gênero feminino e apenas um paciente pertenceu ao gênero masculino.

Ao exame clínico, o CAC comumente se apresenta como uma massa de crescimento lento, e pode ou não estar associada à dor e paralisia do nervo facial, dependendo da sua localização (Nascimento *et al.*, 1986; El-Naggar & Huvos 2005; Rapidis *et al.*, 2005). Como características histopatológicas, o CAC apresenta dois tipos celulares principais, as células epiteliais ductais e as células mioepiteliais modificadas. Este componente mioepitelial normalmente apresenta núcleos pequenos angulados e hipercromáticos, e citoplasma basofílico. O padrão morfológico sólido é caracterizado pela presença de ninhos formados por células basalóides e pequenas formações ductais. O estroma comumente se apresenta hialinizado, mas pode apresentar áreas mixóides. Invasões tumorais em tecido ósseo, peri- e intraneurais são comuns (Ellis & Auclair 1996; El-Naggar & Huvos 2005; Rapidis *et al.*, 2005; da Cruz Perez *et al.*, 2006a). As amostras de tumores CAC-sólido avaliados neste estudo apresentaram as características descritas anteriormente, conforme mostra a **figura 4**.

O ciclo celular é um evento altamente regulado que tem como objetivo principal duplicar o genoma uma única vez a cada novo ciclo. Alterações neste processo tão complexo resultam em proliferação celular descontrolada e exacerbada, e conseqüentemente no desenvolvimento de neoplasias malignas (van Diest *et al.*, 1998; Pich *et al.*, 2004). Assim, células tumorais apresentam uma maior atividade proliferativa, e por isso o estudo de marcadores de proliferação celular como Ki-67, Mcm-2 e expressão do HOXB7 se torna imprescindível para avaliar o potencial de malignidade e prognóstico dos tumores malignos. Além disso, os marcadores de proliferação celular também podem auxiliar no diagnóstico de tumores com características morfológicas semelhantes, mas com diferentes padrões de atividade proliferativa.

A proteína Ki-67 é um polipeptídeo amplamente conhecido como marcador de proliferação celular, que é expressa nas fases G1, S e G2, no núcleo de células ciclitizantes (Gerds *et al.*, 1984). Estudos prévios com CECs orais demonstraram que altos índices de Ki-67 estão associados a um prognóstico desfavorável, com diminuição da sobrevida (Silva *et al.*, 2004; Rodriguez-Tojo *et al.*, 2005; Malhotra *et al.*, 2009). Altas expressões de Ki-67 também estão relacionadas com o comportamento clínico mais agressivo e a um pior prognóstico em tumores de glândulas salivares (Norberg-Spaak *et al.*, 2000; Seethala *et al.*, 2007; Vargas *et al.*, 2008). Ferlito *et al.* (1997) sugeriram que a proteína também pode auxiliar na diferenciação entre CEB e CAC-sólido, já que o IM de Ki-67 foi maior nas amostras de CEB quando comparadas com as amostras de CAC. Os valores médios dos IMs encontrados nas amostras de CEC-pd, CEB e CAC sólido, foram iguais a 43,54%, 42,22% e 18,74%, respectivamente. Os valores encontrados para os grupos CEC-pd e CEB foram muito semelhantes, porém o grupo CAC-sólido apresentou o menor IM para Ki-67 ($p < 0.05$). Esses resultados reforçam a sugestão de Ferlito *et al.* (1997), que indicaram o Ki-67 como biomarcador na diferenciação de neoplasias basalóides de cabeça e pescoço como o CAC e o CEB.

A proteína Mcm-2 pertence a uma família de proteínas envolvidas na fase inicial de replicação do genoma (Moirano *et al.*, 2006). O aumento na expressão destas proteínas está relacionado ao reinício constante do ciclo celular, ou seja, com a atividade proliferativa intensa dos tumores malignos. Kodani *et al.* (2003) verificaram que a expressão de Mcm-2 foi maior em CECs moderadamente diferenciados em comparação aos CECs bem-diferenciados. Seguindo a mesma linha, Li *et al.* (2008) também observaram uma maior expressão desta proteína em CECs de língua quando comparada com a expressão encontrada em lesões displásicas. Vargas *et al.* (2008) avaliaram a expressão de Mcm-2 em diferentes neoplasias de glândulas salivares e sugeriram que a Mcm-2 é um marcador de proliferação celular sensível em tumores de glândula salivar e que esta proteína pode auxiliar no diagnóstico diferencial entre CAC e adenocarcinoma polimorfo de

baixo grau. De maneira semelhante a alguns trabalhos relatados na literatura, o presente estudo também encontrou uma relação direta entre a expressão de Mcm-2 e a agressividade tumoral. Entre as 42 amostras estudadas, o IP de Mcm-2 foi maior e estatisticamente significativo no CEB (55,57) em comparação aos grupos CEC-pd (35,55) e CAC-sólido (28,60).

A proteína HOXB7 foi imunoreativa em todas as amostras estudadas. O gene HOXB7 pertence à família de genes HOX, cuja expressão inapropriada está associada ao desenvolvimento e progressão de tumores malignos. Hassan *et al.* (2006) observaram que a expressão de HOXB7 foi maior em amostras de CEC oral, quando comparada com amostras de tecidos normais ou displásicos. De Souza Setubal Destro *et al.* (2010) verificaram que a expressão de HOXB7 foi maior em amostras de CEC oral ($p < 0.05$), quando comparadas com amostras de mucosa normal. Além disso, os autores verificaram que a sua expressão se relacionou diretamente com o tamanho dos tumores, metástases regionais e sobrevida dos pacientes. O padrão de expressão de HOXB7 nos tumores deste estudo foi semelhante ao padrão encontrado para Mcm-2. O grupo CEB apresentou maior imunoexpressão (31,88, $p < 0,05$), seguido dos grupos CEC-pd (23,19) e CAC-sólido (18,66).

Devido à grande dificuldade em obter as informações clínicas dos pacientes não encontramos correlação estatisticamente significativa entre os dados clínicos como, tamanho do tumor, tratamento, metástases, recorrências e prognóstico dos tumores. Esta não significância na correlação entre esses dados e a expressão dos marcadores de proliferação celular não deve ser considerada, já que os dados obtidos foram mínimos.

Comparado os valores de IM encontrados em cortes histológicos comuns e em cortes histológicos pequenos confeccionados através da técnica TMA verifica-se que não há diferença estatisticamente significativa entre esses valores. Os resultados encontrados reforçam a importância da técnica TMA que se baseia na organização de diferentes amostras de tecidos em um mesmo bloco de parafina (Kononen *et al.*, 1998). Esta técnica permitiu grande economia de reagentes e de

tempo para a realização das reações imunoistoquímicas, e favoreceu a uniformização das reações. Além disso, esta técnica facilitou a interpretação comparativa entre os casos pesquisados, pois diferentes amostras estavam organizadas lado-a-lado em uma única lâmina.

No presente trabalho foi verificado que Mcm-2 apresentou um maior IP quando comparada com a Ki-67, assim como com a expressão do HOXB7. De acordo com a literatura a Mcm-2 é expressa durante todo o ciclo celular, inclusive no início de G1, ao passo que a Ki-67 inicia a sua expressão apenas em estágios mais avançados de G1 (Gerdes *et al.*, 1984; Key *et al.*, 1994; Kearsey & Labib 1998; Vargas *et al.*, 2008). Embora a literatura não relate com clareza em que ou quais fases do ciclo celular a proteína HOXB7 está expressa, no presente estudo a HOXB7 apresentou um padrão de expressão semelhante a Mcm-2.

Embora as três neoplasias basalóides apresentem comportamentos clínicos agressivos e prognósticos ruins, diversos trabalhos indicam o CEB como sendo o pior deles, seguido do CEC-pd e CAC-sólido, respectivamente (Wain *et al.*, 1986; Ferlito *et al.*, 1997; Coletta *et al.*, 2001). O padrão de expressão apresentado pela Mcm-2 e a HOXB7 sugere que possivelmente sejam marcadores de proliferação muito sensíveis, já que a expressão destas proteínas foi decrescente para os grupos CEB, CEC-pd e CAC-sólido, respectivamente. A sensibilidade destes marcadores já havia sido relatada por outros autores em alguns trabalhos envolvendo CECs e lesões pré-malígnas em região de cabeça e pescoço (Kodani *et al.*, 2001; Kodani *et al.*, 2003; Hassan *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2008; Torres-Rendon *et al.*, 2009). As proteínas Ki-67, Mcm-2 e HOXB7 também podem também funcionar como biomarcadores auxiliares na determinação do correto diagnóstico de neoplasias basalóides de cabeça e pescoço como o CEB e o CAC-sólido.

O presente trabalho é o primeiro na literatura a correlacionar a expressão de Mcm-2 e HOXB7 em neoplasias basalóides de cabeça e pescoço. Os resultados encontrados sugerem que a expressão dessas proteínas está diretamente relacionada com o comportamento biológico agressivo dos tumores

estudados. Novos estudos sobre a expressão dessas proteínas em neoplasias de cabeça e pescoço são necessários para confirmar os resultados encontrados no presente trabalho e para determinar o valor prognóstico de Mcm-2 e HOXB7.

7. CONCLUSÕES

- Os três grupos tumorais estudados acometeram pacientes adultos entre 40 e 60 anos de idade e o tamanho médio desses tumores foi de 4,0cm.
- A expressão de Mcm-2 e HOXB7 foram crescentes para os grupos CAC-sólido, CEC-pd e CEB. Esses resultados sugerem que o CEB apresenta um maior potencial proliferativo, seguido do CEC-pd e CAC-sólido.
- A expressão de Ki-67 nas amostras de CAC sólido foi estatisticamente menor quando comparada com os demais grupos tumorais (18,74% $\pm$ 8,3, $p < 0,05$).
- No grupo CEC-pd, o marcador biológico com maior índice de marcação foi o Ki-67, seguido do Mcm-2 e HOXB7. Já para os grupos CEB e CAC sólido, o Mcm-2 apresentou o maior índice de marcação, seguido do Ki-67 e HOXB7.
- Os resultados sugerem o Mcm-2 e HOXB7 sejam bons indicadores de agressividade tumoral.
- Os resultados sugerem também que os três marcadores podem auxiliar no diagnóstico diferencial de CEB e CAC-sólido.

REFERÊNCIAS

Al-Reefy H, Dhar V, Dilkes M. Squamous cell carcinoma in the head and neck. *Br J Hosp Med (Lond)*. 2007; 68(7): 380-3.

Al-Sarraf M, LeBlanc M, Giri PG, Fu KK, Cooper J, Vuong T, *et al*. Chemoradiotherapy versus radiotherapy in patients with advanced nasopharyngeal cancer. *J Clin Oncol*. 1998; 16(4): 1310-7.

Alison MR, Hunt T, Forbes SJ. Minichromosome maintenance (MCM) proteins may be pre-cancer markers. *Gut*. 2002; 50(3): 290-1.

Argiropoulos B, Humphries RK. Hox genes in hematopoiesis and leukemogenesis. *Oncogene*. 2007; 26(47): 6766-76.

Banks ER, Frierson HF Jr, Mills SE, George E, Zarbo RJ, Swanson PE. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. A clinicopathologic and immunohistochemical study of 40 cases. *Am J Surg Pathol*. 1992; 16(10): 939-46.

Barnes L, Ferlito A, Altavilla G, MacMillan C, Rinaldo A, Doglioni C. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck: clinicopathological features and differential diagnosis. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1996; 105(1): 75-82.

Begum S, Westra WH. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck is a mixed variant that can be further resolved by HPV status. *Am J Surg Pathol*. 2008; 32(7): 1044-50.

Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem*. 2002; 71:333-74.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J. Radiotherapy plus ctuximab for squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med*. 2006; 6: 567-78.

Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, van Glabbeke M, Bourhis J, Forastiere A, *et al*. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative

analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck*. 2005; 27(10): 843-50.

Bradley PJ. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004; 12(2): 127-32.

Cardesa A, Zidar N, Ereño C. Basaloid squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *Head and Neck Tumours*. França: Lyon; 2005. p. 124-25.

Caré A, Silvani A, Meccia E, Mattia G, Stoppacciaro A, Parmiani G, *et al*. HOXB7 constitutively activates basic fibroblast growth factor in melanomas. *Mol Cell Biol*. 1996; 16(9): 4842-51.

Chan JKC, Bray F, McCarron, Foo W, Lee AWM, Yip T, *et al*. Nasopharyngeal carcinoma. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *Head and Neck Tumours*. França: Lyon; 2005. p. 85-97.

Chatrath P, Scott IS, Morris LS, Davies RJ, Rushbrook SM, Bird K, *et al*. Aberrant expression of minichromosome maintenance protein-2 and Ki67 in laryngeal squamous epithelial lesions. *Br J Cancer*. 2003; 89(6): 1048-54.

Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillson ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and –unrelated oral squamous cell carcinoma in the United States. *J Clin Oncol*. 2008; 26(4): 612-619.

Chen KN, Gu ZD, Ke Y, Li JY, Shi XT, Xu GW. Expression of 11 HOX genes is deregulated in esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005; 11(3): 1044-9.

Coletta RD, Cotrim P, Vargas PA, Villalba H, Pires FR, de Moraes M, *et al*. Basaloid squamous carcinoma of the oral cavity: report of 2 cases and study of AgNOR, PCNA, p53, and MMP expression. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001; 91(5): 563-9.

Coletta RD, Cotrim P, Almeida OP, Alves VA, Wakamatsu A, Vargas PA. Basaloid squamous carcinoma of oral cavity: a histologic and immunohistochemical study. *Oral Oncol.* 2002; 38(7): 723-9.

Coletta RD, Almeida OP, Vargas PA. Cytokeratins 1, 7 and 14 immunoexpression are helpful in the diagnosis of basaloid squamous carcinoma. *Histopathology.* 2006; 48(6): 773-4.

Coppola D, Catalano E, Tang CK, Elfenbein IB, Harwick R, Mohr R. Basaloid squamous cell carcinoma of floor of mouth. *Cancer.* 1993 Oct 15;72(8):2299-305.

da Cruz Perez DE, Pires FR, Alves FA, Almeida OP, Kowalski LP. Salivary gland tumors in children and adolescents: a clinicopathologic and immunohistochemical study of fifty-three cases. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2004; 68(7): 895-902.

da Cruz Perez DE, de Abreu Alves F, Nobuko Nishimoto I, de Almeida OP, Kowalski LP. Prognostic factors in head and neck adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol.* 2006a; 42(2): 139-46.

da Cruz Perez DE, Pires FR, Lopes MA, de Almeida OP, Kowalski LP. Adenoid cystic carcinoma and mucoepidermoid carcinoma of the maxillary sinus: report of a 44-year experience of 25 cases from a single institution. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006b; 64(11): 1592-7.

Cubilla AL, Reuter VE, Gregoire L, Ayala G, Ocampos S, Lancaster WD, *et al.* Basaloid squamous cell carcinoma: a distinctive human papilloma virus-related penile neoplasm: a report of 20 cases. *Am J Surg Pathol.* 1998; 22(6): 755-61.

van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol.* 1998; 51(10): 716-24.

Ellis GL, Auclair PL. Malignant epithelial tumors. In: Rosai J, Sobin LH, editors. *Atlas of tumor pathology. Tumors of salivary glands.* Armed Forces Institute of Pathology (AFIP); 1996: 155-457.

El-Naggar AK, Huvos AG. Adenoid cystic carcinoma. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. Head and Neck Tumours. França: Lyon; 2005. p. 221-22.

Ferlito A, Altavilla G, Rinaldo A, Doglioni C. Basaloid squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. Ann Otol Rhinol Laryngol. 1997; 106(12): 1024-35.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. N Engl J Med. 2001; 345(26): 1890-900.

Forastiere AA, Goepfert H, Maor M, Pajak TF, Weber R, Morrison W, *et al.* Concurrent chemotherapy and radiotherapy for organ preservation in advanced laryngeal cancer. N Engl J Med. 2003; 349(22): 2091-8.

Freschi G, Taddei A, Bechi P, Faiella A, Gulisano M, Cillo C, Bucciarelli G, *et al.* Expression of HOX homeobox genes in the adult human colonic mucosa (and colorectal cancer?). Int J Mol Med. 2005; 16(4): 581-7.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. Int J Cancer. 1983; 31(1): 13-20.

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.

Ghigna MR, Drak Alsibai K, Porras J, Palazzo L, Godchaux JM, Fabre M. Deep-seated rectal/anal basaloid carcinoma: useful immunocytochemistry in rare squamous cell carcinoma variants. Cytopathology. 2009; 20(5): 315-20.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, *et al.* Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. J Natl Cancer Inst. 2000; 92(9): 709-20.

Going JJ, Keith WN, Neilson L, Stoeber K, Stuart RC, Williams GH. Aberrant expression of minichromosome maintenance proteins 2 and 5, and Ki-67 in dysplastic squamous oesophageal epithelium and Barrett's mucosa. *Gut*. 2002; 50(3) :373-7.

Goldenberg D, Benoit NE, Begum S, Westra WH, Cohen Y, Koch WM, *et al*. Epstein-Barr virus in head and neck cancer assessed by quantitative polymerase chain reaction. *Laryngoscope*. 2004**a**; 114(6): 1027-31.

Goldenberg D, Lee J, Koch WM, Kim MM, Trink B, Sidransky D, *et al*. Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004**b**; 131(6): 986-93.

Gonzalez MA, Pinder SE, Callagy G, Vowler SL, Morris LS, Bird K, *et al*. Minichromosome maintenance protein 2 is a strong independent prognostic marker in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003; 21(23): 4306-13.

Grayson W, Cooper K. A reappraisal of "basaloid carcinoma" of the cervix, and the differential diagnosis of basaloid cervical neoplasms. *Adv Anat Pathol*. 2002 ;9(5): 290-300.

Greene FL, Sobin LH. The TNM system: our language for cancer care. *J Surg Oncol*. 2002; 80(3): 119-20.

Guillaud P, du Manoir S, Seigneurin D. Quantification and topographical description of Ki-67 antibody labelling during the cell cycle of normal fibroblastic (MRC-5) and mammary tumour cell lines (MCF-7). *Anal Cell Pathol*. 1989; 1(1): 25-39.

Hartwell LH, Weinert TA. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science*. 1989; 246(4930): 629-34.

Hassan NM, Hamada J, Murai T, Seino A, Takahashi Y, Tada M, *et al.* Aberrant expression of HOX genes in oral dysplasia and squamous cell carcinoma tissues. *Oncol Res.* 2006; 16(5): 217-24.

Hayes RB, Gerin M, Raatgever JW, de Bruyn A. Wood-related occupations, wood dust exposure, and sinonasal cancer. *Am J Epidemiol.* 1986; 124(4): 569-77.

Ibarra A, Schwob E, Méndez J. Excess MCM proteins protect human cells from replicative stress by licensing backup origins of replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008; 105(26): 8956-61.

Ide F, Shimoyama T, Horie N, Kusama K. Basaloid squamous cell carcinoma of the oral mucosa: a new case and review of 45 cases in the literature. *Oral Oncol.* 2002; 38(1): 120-4.

Ishimi Y, Okayasu I, Kato C, Kwon HJ, Kimura H, Yamada K, *et al.* Enhanced expression of Mcm proteins in cancer cells derived from uterine cervix. *Eur J Biochem.* 2003; 270(6): 1089-101.

Ito FA, Ito K, Vargas PA, de Almeida OP, Lopes MA. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 34(5): 533-6.

Jemal A, Ward E, Hao Y, Thun M. Trends in the leading causes of death in the United States, 1970-2002. *JAMA.* 2005; 294(10): 1255-9.

Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schmid S, MacDonald DG *et al.* Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *Head and Neck Tumours.* França: Lyon; 2005. p. 168-75.

Jones AS, Roland NJ, Caslin AW, Cooke TG, Cooke LD, Forster G. A comparison of cellular proliferation markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Laryngol Otol.* 1994; 108(10): 859-64.

Kearsey SE, Labib K. MCM proteins: evolution, properties, and role in DNA replication. *Biochim Biophys Acta*. 1998; 1398(2): 113-36.

Key G, Kubbutat MH, Gerdes J. Assessment of cell proliferation by means of an enzyme-linked immunosorbent assay based on the detection of the Ki-67 protein. *J Immunol Methods*. 1994; 177(1-2): 113-7.

Khaldi L, Apostolidis TCh, Pappa DA, Apostolidis MT, Apostolidis TI. Basaloid squamous carcinoma of the larynx. A potential diagnostic pitfall. *Ann Diagn Pathol*. 2006; 10(5): 297-300.

Khan AJ, DiGiovanna MP, Ross DA, Sasaki CT, Carter D, Son YH, *et al*. Adenoid cystic carcinoma: a retrospective clinical review. *Int J Cancer*. 2001; 96(3): 149-58.

Kleist B, Bankau A, Lorenz G, Jäger B, Poetsch M. Different risk factors in basaloid and common squamous head and neck cancer. *Laryngoscope*. 2004; 114(6): 1063-8.

Kobayashi Y, Nakanishi Y, Taniguchi H, Sekine S, Igaki H, Tachimori Y, *et al*. Histological diversity in basaloid squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus*. 2009; 22(3): 231-8.

Kodani I, Shomori K, Osaki M, Kuratate I, Ryoke K, Ito H. Expression of minichromosome maintenance 2 (MCM2), Ki-67, and cell-cycle-related molecules, and apoptosis in the normal-dysplasia-carcinoma sequence of the oral mucosa. *Pathobiology*. 2001; 69(3): 150-8.

Kodani I, Osaki M, Shomori K, Araki K, Goto E, Ryoke K, *et al*. Minichromosome maintenance 2 expression is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2003; 32(8): 468-74.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, *et al*. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998; 4(7): 844-7.

Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2005; 14(2): 467-475.

Lemons D, McGinnis W. Genomic evolution of Hox gene clusters. *Science.* 2006; 313(5795): 1918-22.

Leroy P, Berto F, Bourget I, Rossi B. Down-regulation of Hox A7 is required for cell adhesion and migration on fibronectin during early HL-60 monocytic differentiation. *J Leukoc Biol.* 2004; 75(4): 680-8.

Li H, Heller DS, Sama J, Bolanowski PJ, Anderson J. Basaloid squamous cell carcinoma of the vagina metastasizing to the lung. A case report. *J Reprod Med.* 2000; 45(10): 841-3.

Li JN, Feng CJ, Lu YJ, Li HJ, Tu Z, Liao GQ, *et al.* mRNA expression of the DNA replication-initiation proteins in epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the tongue. *BMC Cancer.* 2008; 8:395.

Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Ide C, Coche E, Weynand B, *et al.* Predictive value of the fraction of cancer cells immunolabeled for proliferating cell nuclear antigen or Ki67 in biopsies of head and neck carcinomas to identify lymph node metastasis: comparison with clinical and radiologic examinations. *Head Neck.* 2003; 25(4): 280-8.

Lopes MA, Kowalski LP, da Cunha Santos G, Paes de Almeida O. A clinicopathologic study of 196 intraoral minor salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med.* 1999; 28(6): 264-7.

Lord RV, Brabender J, Wickramasinghe K, DeMeester SR, Holscher A, Schneider PM, *et al.* Increased CDX2 and decreased PITX1 homeobox gene expression in Barrett's esophagus and Barrett's-associated adenocarcinoma. *Surgery.* 2005; 138(5): 924-31

Luna MA, el Naggar A, Parichatikanond P, Weber RS, Batsakis JG. Basaloid squamous carcinoma of the upper aerodigestive tract. Clinicopathologic and DNA flow cytometric analysis. *Cancer*. 1990; 66(3): 537-42.

Malhotra KP, Agrawal V, Pandey R. High Grade Transformation in Adenoid Cystic Carcinoma of the Parotid: Report of a Case with Cytologic, Histologic and Immunohistochemical Study. *Head Neck Pathol*. 2009; 3(4): 310-314.

Marur S, Forastiere AA. Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment. *Mayo Clin Proc*. 2008; 83(4): 489-501.

McFall MR, Irvine GH, Eveson JW. Adenoid cystic carcinoma of the sublingual salivary gland in a 16-year-old female--report of a case and review of the literature. *J Laryngol Otol*. 1997; 111(5): 485-8.

Maiorano D, Lutzmann M, Méchali M. MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol*. 2006; 18(2): 130-6.

Moro-Sibilot D, Lantuejoul S, Diab S, Moulai N, Aubert A, Timsit JF, *et al*. Lung carcinomas with a basaloid pattern: a study of 90 cases focusing on their poor prognosis. *Eur Respir J*. 2008; 31(4): 854-9.

Moukarbel RV, Goldstein DP, O'Sullivan B, Gullane PJ, Brown DH, Wang L, *et al*. Adenoid cystic carcinoma of the larynx: a 40-year experience. *Head Neck*. 2008; 30(7): 919-24.

Nascimento AG, Amaral AL, Prado LA, Kligerman J, Silveira TR. Adenoid cystic carcinoma of salivary glands. A study of 61 cases with clinicopathologic correlation. *Cancer*. 1986; 57(2): 312-9.

Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002; 52(4): 195-215.

Norberg-Spaak L, Dardick I, Ledin T. Adenoid cystic carcinoma: use of cell proliferation, BCL-2 expression, histologic grade, and clinical stage as predictors of clinical outcome. *Head Neck*. 2000; 22(5): 489-97.

Ohashi K, Horiguchi S, Moriyama S, Hishima T, Hayashi Y, Momma K, *et al*. Superficial basaloid squamous carcinoma of the esophagus. A clinicopathological and immunohistochemical study of 12 cases. *Pathol Res Pract*. 2003; 199(11): 713-21.

Owens BM, Hawley RG. HOX and non-HOX homeobox genes in leukemic hematopoiesis. *Stem Cells*. 2002; 20(5): 364-79.

Paulino AF, Singh B, Shah JP, Huvos AG. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope*. 2000; 110(9): 1479-82.

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.

Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol*. 2004; 15(9): 1319-29.

Pilch BZ, Bouquot J, Thompson LDR. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *Head and Neck Tumours*. França: Lyon; 2005. p. 15-17.

Pires FR, Pringle GA, de Almeida OP, Chen SY. Intra-oral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 546 cases. *Oral Oncol*. 2007; 43(5): 463-70.

Raman V, Martensen SA, Reisman D, Evron E, Odenwald WF, Jaffee E, *et al*. Compromised HOXA5 function can limit p53 expression in human breast tumours. *Nature*. 2000; 405(6789): 974-8.

Rapidis AD, Givalos N, Gakiopoulou H, Faratzis G, Stavrianos SD, Vilos GA, *et al.* Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. Clinicopathological analysis of 23 patients and review of the literature. *Oral Oncol.* 2005; 41(3): 328-35.

Rodríguez Tojo MJ, García Cano FJ, Infante Sánchez JC, Velázquez Fernández E, Aguirre Urizar JM. Immunoexpression of p53, Ki-67 and E-cadherin in basaloid squamous cell carcinoma of the larynx. *Clin Transl Oncol.* 2005; 7(3): 110-4.

Saltarelli MG, Fleming MV, Wenig BM, Gal AA, Mansour KA, Travis WD. Primary basaloid squamous cell carcinoma of the trachea. *Am J Clin Pathol.* 1995; 104(5): 594-8.

Sampaio-Góes FC, Oliveira DT, Dorta RG, Nonogaki S, Landman G, Nishimoto IN, *et al.* Expression of PCNA, p53, Bax, and Bcl-X in oral poorly differentiated and basaloid squamous cell carcinoma: relationships with prognosis. *Head Neck.* 2005; 27(11): 982-9.

Samuel S, Naora H. Homeobox gene expression in cancer: insights from developmental regulation and deregulation. *Eur J Cancer.* 2005; 41(16): 2428-37.

Sarbia M, Verreet P, Bittinger F, Dutkowski P, Heep H, Willers R, *et al.* Basaloid squamous cell carcinoma of the esophagus: diagnosis and prognosis. *Cancer.* 1997; 79(10): 1871-8.

Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol.* 1987; 133(3): 579-84.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* 2000; 36(3): 256-63.

Seethala RR, Hunt JL, Baloch ZW, Livolsi VA, Leon Barnes E. Adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation: a report of 11 cases and a review of the literature. *Am J Surg Pathol*. 2007; 31(11): 1683-94.

Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA, *et al*. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol*. 2004; 40(7): 688-96.

Soriano E, Faure C, Lantuejoul S, Reyt E, Bolla M, Brambilla E, *et al*. Course and prognosis of basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck: a case-control study of 62 patients. *Eur J Cancer*. 2008; 44(2): 244-50.

de Souza Setubal Destro MF, Bitu CC, Zecchin KG, Graner E, Lopes MA, Kowalski LP, *et al*. Overexpression of HOXB7 homeobox gene in oral cancer induces cellular proliferation and is associated with poor prognosis. *Int J Oncol*. 2010; 36(1): 141-9.

Speight PM, Barrett AW. Salivary gland tumours. *Oral Dis*. 2002; 8(5): 229-40.

Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, Thomas GA, Romanov S, Bobrow L, *et al*. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci*. 2001; 114: 2027-41.

Tanaka S, Diffley JF. Deregulated G1-cyclin expression induces genomic instability by preventing efficient pre-RC formation. *Genes Dev*. 2002; 16(20): 2639-49.

Torres-Rendon A, Roy S, Craig GT, Speight PM. Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. *Br J Cancer*. 2009; 100(7): 1128-34

Ustündağ E, Iseri M, Aydin O, Dal H, Almaç A, Paksoy N. Adenoid cystic carcinoma of the tongue. *J Laryngol Otol*. 2000; 114(6): 477-80.

Vakar-López F, Abrams J. Basaloid squamous cell carcinoma occurring in the urinary bladder. *Arch Pathol Lab Med*. 2000; 124(3): 455-9.

Vargas PA, Cheng Y, Barrett AW, Craig GT, Speight PM. Expression of Mcm-2, Ki-67 and geminin in benign and malignant salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37(5): 309-18.

Wain SL, Kier R, Vollmer RT, Bossen EH. Basaloid-squamous carcinoma of the tongue, hypopharynx, and larynx: report of 10 cases. *Hum Pathol.* 1986; 17(11): 1158-66.

Wan SK, Chan JK, Lau WH, Yip TT. Basaloid-squamous carcinoma of the nasopharynx. An Epstein-Barr virus-associated neoplasm compared with morphologically identical tumors occurring in other sites. *Cancer.* 1995; 76(10): 1689-93.

van der Wal JE, Becking AG, Snow GB, van der Waal I. Distant metastases of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands and the value of diagnostic examinations during follow-up. *Head Neck.* 2002; 24(8): 779-83.

Wedenberg C, Jesslén P, Lundqvist G, Lundgren J, Hellquist HB. Basaloid squamous cell carcinoma of the maxilla. *Oral Oncol.* 1997; 33(2): 141-4.

Wieneke JA, Thompson LD, Wenig BM. Basaloid squamous cell carcinoma of the sinonasal tract. *Cancer.* 1999; 85(4): 841-54.

Winters R, Naud S, Evans MF, Trotman W, Kasznica P, Elhosseiny A. Ber-EP4, CK1, CK7 and CK14 are useful markers for basaloid squamous cell carcinoma: A study of 45 cases. *Head and Neck Pathol.* 2008; 2: 265-271.

Winzenburg SM, Niehans GA, George E, Daly K, Adams GL. Basaloid squamous carcinoma: a clinical comparison of two histologic types with poorly differentiated squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998; 119(5): 471-5.

World Health Organization. Geneva: WHO. [acesso 2010 jan 29]. Disponível em: <http://www.who.int/about/contacthq/en/index.html>

Wu X, Chen H, Parker B, Rubin E, Zhu T, Lee JS, *et al.* HOXB7, a homeodomain protein, is overexpressed in breast cancer and confers epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2006; 66(19): 9527-34.

Yamashita T, Tazawa S, Yawei Z, Katayama H, Kato Y, Nishiwaki K, *et al.* Suppression of invasive characteristics by antisense introduction of overexpressed HOX genes in ovarian cancer cells. *Int J Oncol.* 2006; 28(4): 931-8.

Yoshida H, Broaddus R, Cheng W, Xie S, Naora H. Deregulation of the HOXA10 homeobox gene in endometrial carcinoma: role in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res.* 2006; 66(2): 889-97.

Zbären P, Nuyens M, Stauffer E. Basaloid squamous cell carcinoma of the head and neck. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004; 12(2): 116-21.



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 "Estudo da expressão imunohistoquímica de MCM-2, geminina e Ki-67 e análise da ploidia em neoplasias basaloídes de cabeça e pescoço. Um estudo multicêntrico", protocolo nº 001/2008, dos pesquisadores **LILIA ALVES ROCHA e PABLO AGUSTIN VARGAS**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 23/01/2008.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Expression of MCM-2, geminin and Ki-67 and ploidy analysis in basaloid neoplasms of head and neck. A multicentric study", register number 001/2008, of **LILIA ALVES ROCHA and PABLO AGUSTIN VARGAS**, 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 23/01/2008.

Cynthia Pereira Machado Tabchoury
Prof. Cinthia Pereira Machado Tabchoury

Secretária
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Jacks Jorge Júnior
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.