



## **Análise da Expressão Imuno-histoquímica de Citoqueratinas no Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço**

*Sueli Nunes Fonseca, Hercules Otacilio Santos, Lucyana Conceição Farias*

### **Introdução**

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) representa um dos principais problemas de saúde pública em vários países do mundo, em especial no Brasil, por ser o sétimo tipo de câncer mais incidente [1]. O fenômeno da carcinogênese é um processo complexo que ocorre através de múltiplos eventos, epigenéticos e genéticos, que alteram as funções normais de oncogenes, genes supressores de tumor, genes relacionados aos processos de invasão e metástase [2]. O estudo das alterações epiteliais em processos patológicos tem-se baseado nas características de proteínas do grupo das citoqueratinas (Cks), uma vez que, durante o processo de malignização do epitélio, o perfil de citoqueratina normalmente permanece constante. Isso tem auxiliado em um diagnóstico diferencial entre as neoplasias epiteliais [3]. Dessa forma, em casos onde os dados clínicos e a histopatologia convencional permanecem obscuros, o perfil de Cks pode auxiliar na identificação e classificação da origem da neoplasia. Além disso, têm-se destacado o papel dessas proteínas como marcador de prognóstico para carcinoma epidermóide de boca [4]. As citoqueratinas perfazem o maior subgrupo de proteínas do filamento intermediário; são encontradas, principalmente, nas células epiteliais, sendo essenciais para o seu desenvolvimento e diferenciação [5]. O objetivo desse trabalho foi avaliar o perfil de citoqueratinas no CECP e sua possível associação com parâmetros clínico-patológicos dessa neoplasia.

### **Material e métodos**

#### *A. Casuística*

Esse trabalho envolveu a coleta e análise de dados epidemiológicos de uma amostra de 69 indivíduos acometidos por CECP, em diferentes localizações anatômicas na região de cabeça e pescoço. Todos os indivíduos foram categorizados pelo sistema de estadiamento clínico TNM (Tamanho do tumor, presença de Nodos metastáticos e presença de Metástases à distância, respectivamente).

#### *A. Gradação morfológica e Reações de Imuno-histoquímica*

A partir de amostras teciduais de CECP acondicionadas em parafina, foram realizados cortes histológicos de 4,0 micrômetros. As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina sendo realizada a gradação da morfológica da região do *front* de invasão tumoral, segundo Bryne [6] e a gradação histológica da Organização Mundial de Saúde (OMS) [7].

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas em cortes histológicos, onde foram utilizados os anticorpos Ck6, Ck16, Ck17, Ck18 e Ck19. Nessa técnica foi utilizado o kit streptoavidina-biotina-peroxidase (LSAB Kit, Dako, Glostrup, Denmark). A imunexpressão das proteínas foi avaliada como positiva ou negativa. Essa avaliação microscópica utilizou o equipamento Olympus® CX31 com aumento 400X, investigando as regiões do *front* invasivo e em ilhotas malignas. Foram utilizadas amostras controles definidas pelo fabricante dos anticorpos utilizados.

#### *A. Análises estatísticas*

A análise estatística foi realizada utilizando o *software* estatístico SPSS®, versão 17.0 para Windows®. O teste qui-quadrado ( $\chi^2$ ) e exato de Fisher foram usados para analisar uma possível associação entre os parâmetros clínico-patológicos e a imunomarcagem das Cks. A análise multivariada com regressão logística binária foi realizada para construir um modelo de variáveis que poderiam resultar em uma melhor explicação para tamanho tumoral. O intervalo de confiança maior que 95% foi considerado significativo ( $p < 0,05$ ).

### **Resultados e Discussão**

Pela análise, foi possível verificar que o CECP apresenta maior incidência em indivíduos do gênero masculino, com faixa etária variando entre 37 a 92 anos. Foi observado que há uma distribuição homogênea da doença quanto ao sítio anatômico, mas sendo possível constatar que se apresenta com menor frequência na região da hipofaringe (n=8). A avaliação dos parâmetros clínico-patológicos relacionados à imunexpressão das Cks encontra-se apresentado na Tabela



1. A Ck19 apresentou maior expressão, estatisticamente significativa, em indivíduos jovens ( $p=0.008$ ). De acordo com a classificação TNM, apesar de não ter sido identificado resultados significativos, a expressão das Cks foi maior em estadiamento III/IV. Curiosamente, o teste Qui-quadrado mostrou uma associação significativa da Ck18 em estadiamento III/IV ( $p=0.026$ ). Entretanto, a partir da análise multivariada, observou-se associação significativa no Ck18 em tumores menores ( $p=0.036$ ). A análise da imunexpressão das Cks nas lesões de CECP revelou uma imunomarcagem predominantemente citoplasmática distribuída por todo o epitélio e, predominantemente, identificada nas ilhotas malignas. Estudos prévios mostraram que os pares de Ck8/Ck18 parecem ter uma importante função na patogênese e na progressão de CECP, uma vez que a indução dessas Cks em tecidos não malignos levam a modificações nas características fenotípicas, como o aumento da motilidade celular, sendo esta uma característica associada com a invasividade tumoral e pior prognóstico [8]. Um estudo realizado com o objetivo de verificar a expressão dos pares de Ck8/18 e Ck19 em carcinoma de células escamosas da cavidade oral não encontrou associação entre a expressão dessas Cks e parâmetros clínicos-patológicos, como tamanho do tumor, diferenciação tumoral e status do linfonodo. Entretanto, houve uma diminuição significativa da sobrevida que foi associada com um aumento da expressão da Ck8/18 e da Ck19 [4]. A partir dos achados desse estudo, sugere-se a importância da Ck18 nas fases iniciais do desenvolvimento do CECP. Assim, a determinação do aumento da expressão da Ck18 pode contribuir para distinguir tecidos malignos de tecido normais e a sua expressão parece estar relacionada com a transformação neoplásica no epitélio oral [9]. Portanto, a Ck18 é um marcador que pode ser, possivelmente, utilizado na avaliação de células alteradas e em estágios iniciais do câncer [10]. A expressão das Cks é altamente conservada e qualquer alteração no padrão de expressão dessas proteínas do filamento intermediário reflete em alterações substanciais nas propriedades das células [4].

## Considerações finais

Os resultados sugerem que a Ck18 pode ser usada como um marcador biológico para prognóstico clínico adicional no CECP, visto que foi identificada uma associação entre a imunexpressão dessa expressão em lesões de CECP de menores tamanhos clínicos. Além disso, observou-se que a Ck19 pode ser, frequentemente, identificada em indivíduos jovens acometidos pela neoplasia.

## Referências

- [1] MOORE, S. R. *et al.* The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. **Oral Dis**, v. 6, n. 2, 2000.
- [2] SASAKI, S. *et al.* Differential roles of alterations of p53, p16, and SMAD4 expression in the progression of intraductal papillary-mucinous tumors of the pancreas. **Oncol Rep**, v.10, n. 1, 2003.
- [3] CHU, P. G.; WEISS, L. M. Keratin expression I human tissues and neoplasms. **Histopathol**, v. 40, n. 5, 2002.
- [4] FILLIES, T. *et al.* Cytokeratin 8/18 expression indicates a poor prognosis in squamous cell carcinomas of the oral cavity. **BMC Cancer**, v. 6, 2006.
- [5] COULOMBE, P. A.; OMARY, M. B. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. **Curr Opin Cell Biol**, v. 14, n. 1, 2002.
- [6] BRYNE, M. *et al.* Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J Pathol**, n. 4, 1992.
- [7] BRODERS, A. C. Squamous-cell epithelioma of the skin: a study of 256 cases. **An Surg**, n. 2, 1921.
- [8] RAUL, U. *et al.* Implications of cytokeratin 8/18 filament formation in stratified epithelial cells: induction of transformed phenotype. **Int J Cancer**, v. 111, n. 5, 2004.
- [9] LINDBERG, K.; RHEINWALD, J. G. Suprabasal 40 kd keratin (K19) expression as an immunohistologic marker of premalignancy in oral epithelium. **Am J Pathol**, v. 134, n. 1, 1989.
- [10] FILLIES, T. *et al.* Cytokeratin alteration in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, v. 18, n. 3, 2007.



**Tabela 1.** Perfil de expressão de

citoqueratinas em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e sua associação com parâmetros clínicoatológicos

Variáveis	Ck6			Ck16			Ck17			Ck18			Ck19		
	Neagtivo	Positivo	Valor <i>p</i>	Negativo	Positivo	Valor <i>p</i>	Negativo	Positivo	Valor <i>p</i>	Negativo	Positivo	Valor <i>p</i>	Negativo	Positivo	Valor <i>p</i>
<b>Gênero</b>															
Feminino	0	11	0.097	0	11	0.097	0	11	0.532	04	07	0.556	02	09	0.581
Masculino	12	46		12	46		02	56		16	42		07	58	
<b>Idade</b>															
≤ 60 anos	05	31	0.423	07	29	0.638	02	34	0.169	08	28	0.196	01	35	<b>0.008*</b>
> 60 anos	07	26		05	28		0	33		12	21		08	25	
<b>Estadiamento clinic TNM</b>															
I/II	03	08	0.346	02	09	0.940	0	11	0.532	01	10	0.113	01	10	0.671
III/IV	09	49		10	48		02	56		19	39		08	50	
<b>Tamanho do Tumor</b>															
I/II	04	16	0.715	02	18	0.301	01	19	0.506	02	18	<b>0.026*</b>	02	18	0.632
III/IV	08	41		10	39		01	48		18	31		07	42	
<b>Metástases</b>															
Ausente	04	30	0.224	04	30	0.224	0	34	0.157	08	26	0.325	03	31	0.305
Presente	08	27		08	27		02	33		12	23		06	29	
<b>Gradação de diferenciação celular</b>															
Bem diferenciado	03	15	0.981	06	12	0.079	0	18	0.692	07	11	0.284	03	15	0.686
Moderadamente diferenciado	04	20		04	20		01	23		08	16		02	22	
Pobremente diferenciado	05	22		02	25		01	26		05	22		04	23	
<b>Gradação de Bryne (do fronte invasive)</b>															
4-8	01	05	0.925	01	05	0.572	0	06	0.283	0	06	0.235	0	06	0.580
9-12	06	25		07	24		02	29		09	22		04	27	
13-16	05	27		04	28		0	32		11	21		05	27	
<b>Histórico de Câncer na família</b>															
Sim	05	30	0.490	06	29	0.956	01	34	0.983	11	24	0.650	06	29	0.305
Não	07	27		06	28		01	33		09	25		03	31	

\*: indica uma relação estatisticamente significativa