



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

MARCOS ANTONIO NUNES COSTA SILAMI

**INVESTIGAÇÃO DE METÁSTASE CERVICAL OCULTA
EM PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
EM LÍNGUA E ASSOALHO DE BOCA ASSOCIADA
À DENSIDADE DE VASOS LINFÁTICOS**

Orientadores: Prof. Dr. Fernando Luiz Dias
Prof^a. Dr^a. Simone de Queiroz Chaves Lourenço

RIO DE JANEIRO

2018



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu***

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

MARCOS ANTONIO NUNES COSTA SILAMI

**INVESTIGAÇÃO DE METÁSTASE CERVICAL OCULTA
EM PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
EM LÍNGUA E ASSOALHO DE BOCA ASSOCIADA
À DENSIDADE DE VASOS LINFÁTICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia do Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Oncologia.

Orientadores: Prof. Dr. Fernando Luiz Dias
Prof^a. Dr^a. Simone de Queiroz Chaves Lourenço

RIO DE JANEIRO
2018

Bibliotecária Responsável: Nanci Simão da Rocha – CRB7/ 4235

S581i Silami, Marcos Antonio Nunes Costa.

Investigação de metástase cervical oculta em pacientes com carcinoma de células escamosas em língua e assoalho de boca associada à densidade de vasos linfáticos/ Marcos Antonio Nunes Costa Silami. – Rio de Janeiro, 2018.
xvi, 98p. : il.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018.

Orientador: Fernando Luiz Dias.

Co-orientadora: Simone de Queiroz Chaves Lourenço.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Metástase linfática. 3. Citoqueratinas. 4. Imuno-histoquímica. 5. Linfangiogênese. 6. Vasos linfáticos. I. Dias, Fernando Luiz (Orient.). II. Lourenço, Simone de Queiroz Chaves (Co-orient.). III. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD: 616.994



Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação *Stricto sensu*

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia
MARCOS ANTONIO NUNES COSTA SILAMI

**INVESTIGAÇÃO DE METÁSTASE CERVICAL OCULTA
EM PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS
EM LÍNGUA E ASSOALHO DE BOCA ASSOCIADA
À DENSIDADE DE VASOS LINFÁTICOS**

Orientadores: Prof. Dr. Fernando Luiz Dias
Prof^ª. Dr^ª. Simone de Queiroz Chaves Lourenço

Aprovado em ____/____/____ .

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Pós-doutora Etel Rodrigues Pereira Gimba - Presidente
Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva

Prof^ª. Doutora Anke Bergmann
Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva

Prof^ª. Doutor Héilton Spíndola Antunes
Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva

Prof^ª. Pós-doutora Leila Maria Cardão Chimelli
Instituto Estadual do Cérebro

Prof. Doutor Andre Luiz Mencialha –Suplente I
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof^ª. Pós-doutora Sheila Coelho Soares Lima –Suplente II
Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva

RIO DE JANEIRO

2018

AGRADECIMENTOS

Inicialmente, agradeço a Deus por ter saúde e força para buscar meus objetivos.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia do INCA, pela oportunidade na realização do Doutorado. Aos funcionários, Andréia, Danielle e Rodrigo pela perfeição no exercício de suas funções.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Oncologia do INCA, responsáveis pelo ensino em alto nível.

Ao meu orientador Dr. Fernando Luiz Dias, pelos conhecimentos compartilhados e pela oportunidade em realizar o doutorado no INCA.

Ao Dr. Luiz Felipe Ribeiro Pinto, por abrir as portas do Laboratório de Toxicologia e Oncologia Molecular do Departamento de Bioquímica do Hospital Universitário Pedro Ernesto, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

A Priscila Valverde Fernandes, por todo o suporte oferecido no Laboratório de Suporte a Pesquisa e Diagnóstico Molecular na Divisão de Patologia do INCA (DIPAT), no momento de maior dificuldade de realização do trabalho.

Ao grupo BRODERS, que me confirmou que a união faz a força. Obrigado á todos e em especial: Dani Camisasca, Renata, Thais, Elisa, Vagner, pela ajuda no laboratório da UERJ, Luisa, constante suporte com o INCA e o estudo e Julia, pelo extenuante trabalho na parte estatística. Cada um sabe o quanto me ajudou em todas as etapas desse trabalho.

A responsável por esse grupo dar certo, e coorientadora, professora Simone Lourenço, um exemplo profissional. Parabéns por saber cobrar e saber elogiar, por saber liderar e saber delegar funções. Você também é um exemplo de caráter, ética e dignidade. O meu muito obrigado por me orientar de forma tão perfeita.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ, por fomento concedido para realização do estudo.

Aos meus familiares, em especial pelo apoio incondicional, minhas tias Vilma Silami e Vânia Silami. Vânia, que além de tia, participou efetivamente na minha formação como coorientadora do mestrado.

Aos meus pais, Marco Silami e Leila Silami, exemplos de docentes na plenitude da palavra. Obrigado pelos valores morais me passados e pelo constante incentivo profissional. Grandes incentivadores do meu ingresso na vida acadêmica. Obrigado pela paciência da minha irmã Amanda e pela grande ajuda científica do meu irmão Pedro, meu jovem pesquisador.

A minha esposa Máira, pela paciência e compreensão nas minhas frequentes ausências, pelo amor e carinho!! Obrigado pela força e palavras de incentivo. Te amo! E a sua Família, muito obrigado.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a conclusão deste trabalho muito obrigado mesmo!

INVESTIGAÇÃO DE METÁSTASE CERVICAL OCULTA EM PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS EM LÍNGUA E ASSOALHO DE BOCA ASSOCIADA À DENSIDADE DE VASOS LINFÁTICOS

RESUMO

Tese

Marcos Antonio Nunes Costa Silami

No carcinoma de células escamosas (CCE) de boca a metástase cervical é considerada principal fator de pior prognóstico e a sobrevida global é significativamente baixa. CCE de língua/assoalho de boca (ADB) apresentam alta frequência de metástase oculta (20% a 30%) e sua identificação é fundamental no planejamento terapêutico. A metástase é um processo complexo resultante das interações de células malignas com o microambiente tumoral, que por meio de fatores de crescimento endoteliais vasculares, estimula a formação de novos vasos linfáticos (linfangiogênese) que participam ativamente do extravasamento de células malignas para os linfonodos cervicais. Marcadores específicos para endotélio linfático como a podoplanina permitem a identificação da densidade de vasos linfáticos que, quando aumentada, tem sido associada à metástase, recorrência e menor sobrevida. Portanto, esse estudo tem como objetivo Investigar a presença e o prognóstico de metástase cervical oculta em pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de língua e/ou assoalho de boca associando à densidade de vasos linfáticos. Avaliamos a densidade vascular linfática (DVL), densidade linfática intratumoral (DLI) e densidade linfática peritumoral (DLP) em relação a presença de metástase cervical e às variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas de pacientes diagnosticados com CCE primários de língua e/ou ADB com ausência de comprometimento para linfonodos clinicamente (cN0), submetidos a cirurgia associada ao esvaziamento cervical e atendidos no INCA entre 2001 e 2003. Os linfonodos pN0 foram submetidos a recortes semi seriados, corados em HE submetidos a reação imuno-histoquímica (IHQ) para o anticorpo anti-pan-citoqueratina AE1AE3 e amostras dos tumores foram coradas em HE e submetidas as classificações histopatológicas da OMS e avaliação histopatológica de risco (AHR), posteriormente submetidas a reação IHQ para o anticorpo anti-podoplanina. Os vasos linfáticos imunopositivos foram contados em cinco campos microscópicos (200x) em áreas *hot spot* nas regiões intratumoral e peritumoral. As médias da DVL, DLI e DLP, foram obtidas de forma separada e utilizadas como *cut off* dividindo os tumores com alta e baixa densidade linfática. Foi realizada análise descritiva das variáveis e a sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) foram calculadas pela análise de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste log-rank. Dentre os 80 pacientes estudados, 25 (31,2%) foram diagnosticados pN+ pela rotina histopatológica do INCA e 9 (11,3%) por recortes semi-seriados e reação IHQ pelo anticorpo anti-pan-citoqueratina AE1AE3, aumentando a frequência de metástase oculta. Os grupos pN0 = 46 e pN+ = 34 apresentaram diferença significativa na frequência para radioterapia adjuvante ($p=0,001$), segundo tumor primário ($p=0,03$) e pior padrão de invasão (PPI) ($p=0,003$). DLI apresentou diferença significativa na frequência para gradação histopatológica da OMS ($p=0,012$) e a DLP para cT e cEstadio ($p=0,026$) e pT ($p=0,034$). Nesse estudo, o CCE de língua/ADB apresenta metástases ocultas com alta frequência. A alta DVL, DLI e DLP não se apresentaram como variáveis significativas para metástase cervical e pior sobrevida.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas. Metástase Linfática. Citoqueratina. Imuno-Histoquímica. Linfangiogênese. Vasos linfáticos.

OCCULT CERVICAL METASTASIS INVESTIGATION IN PATIENTS
WITH TONGUE AND FLOOR OF MOUTH SQUAMOUS CELL CARCINOMA ASSOCIATED
LYMPHATIC VESSEL DENSITY

ABSTRACT

Tese

Marcos Antonio Nunes Costa Silami

Cervical lymph nodes metastasis occurrence has been highlighted as the main factor of both worse prognosis and survival for oral squamous carcinoma cell (SCC). Tongue/floor of the mouth (FOM) SCC has increased occult metastasis (20-30%) frequency, its identification is fundamental for therapeutic management. Metastasis is a complex process between tumor cells and its microenvironment stimulating lymphangiogenesis through endothelial growth factors, thus leading to malignant cells extravasation to cervical lymph nodes. Specific markers for lymphatic endothelium as podoplanin allow assessment of lymphatic vessel density, when increased, has been associated with metastasis, recurrence and poor survival. Therefore, this study aims to investigate occult cervical metastasis presence and prognosis in patients diagnosed with tongue and FOM SCC associated with lymphatic vessel density. We examined lymphatic vessel density (LVD), intratumoral lymphatic density (ILD) and peritumoral lymphatic density (PLD) relation to cervical metastasis as well as sociodemographic and clinical-pathologic variables in clinically node-negative (cN0) disease patients diagnosed with primary tongue/FOM SCC who followed up in INCA between 2001 and 2003 as well as underwent surgery with neck dissection and had. pN0 lymph nodes were submitted to semi-serial cuts, stained in HE and performed an immunohistochemical reaction (IHC) for the anti-pan-cytokeratin AE1/AE3 antibody and samples obtained from tumors were evaluated according to WHO and AHR histopathologic classifications using HE sections and were subsequently immunohistochemically (IHC) stained for anti-podoplanin antibody. Then, immunopositive lymphatic vessels in intra- and peritumoral hotspot areas were counted in five 200x magnification fields. Mean LVD, ILD and PLD were obtained separately and used as cutoff to divide tumors with high or low lymphatic density. Descriptive analysis was performed and global and disease-free survival (GS and DFS, respectively) rates were calculated by Kaplan-Meier analysis and compared using log-rank test. Eighty patients studied, 25% (31.2%) were diagnosed as pN+ by INCA's histopathological routine and 9 (11.3%) by semi-serial sections and anti-pan-cytokeratin AE1/AE3 antibody IHC stained, increasing occult metastasis frequency. pN0 (n=46) and pN+ (n=34) groups showed a significant difference frequency to adjuvant radiotherapy (p=0.001), second primary tumor (p=0.03) and worse pattern of invasion (WPOI) (p=0.003). ILD showed a significant difference frequency to WHO histopathological classification (p=0.012) and PLD to cT and c-Stage (p=0.026) and pT (p=0.034). In this study, tongue/FOM SCC has a high occult metastasis frequency. The high LVD, ILD and PLD did not present significant variables for cervical metastasis and poor survival.

Key words: Squamous cell carcinoma. Lymphatic Metastasis. Cytokeratin. Immunohistochemistry. Lymphangiogenesis. Lymphatic Vessel.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVA	10
1.2 HIPÓTESES	11
2 OBJETIVOS	12
2.1 GERAL	12
2.2 ESPECÍFICOS	12
3 MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	13
3.2 POPULAÇÃO DE ESTUDO	13
3.2.1 Critérios de inclusão	14
3.2.2 Critérios de exclusão	14
3.2.3 Registro dos dados sociodemográficos e clinicopatológicos	15
3.2.4 Seleção e preparo do material de estudo	16
3.2.5 Técnica imuno-histoquímica	17
3.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS	20
3.3.1 Descrição da população de estudo	20
3.3.2 Avaliação histopatológica do tumor	20
3.3.3 Gradação histopatológica da OMS	20
3.3.4 Avaliação histopatológica de risco (AHR)	22
3.3.5 Análise histopatológica dos linfonodos cervicais	26
3.4 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	27
3.4.1 Pan-citoqueratina AE1/AE3	27
3.4.2 Podoplanina (D2-40)	27
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
3.5.1 Associação das variáveis	29
3.5.2 Análise de sobrevida	29
4 RESULTADOS	30
4.1 PERFIL DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	30
4.2 ANÁLISE DOS LINFONODOS CERVICAIS	32
4.2.1 Caracterização geral dos linfonodos isolados	32
4.2.2 Protocolo de recortes semi-seriados	32
4.3 DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS	46
4.4 DADOS CLINICOPATOLÓGICOS	48

4.5 DADOS DE SEGUIMENTO.....	50
4.6 DADOS DAS GRADAÇÕES HISTOPATOLÓGICOS.....	51
4.7 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PODOPLANINA.....	54
4.7.1 Densidade linfática intratumoral.....	54
4.7.2 Densidade linfática peritumoral.....	59
4.7.3 Densidade vascular linfática.....	64
4.8 ANÁLISE DE SOBREVIDA.....	67
4.8.1 Metástase cervical.....	68
4.8.1.1 Sobrevida global.....	68
4.8.1.2 Sobrevida livre de doença.....	69
4.8.2 Densidade vascular linfática.....	70
4.8.2.1 Sobrevida global.....	70
4.8.2.2 Sobrevida livre de doença.....	71
4.8.3 Densidade linfática intratumoral.....	72
4.8.3.1 Sobrevida global.....	72
4.8.3.2 Sobrevida livre de doença.....	73
4.8.4 Densidade linfática peritumoral.....	74
4.8.4.1 Sobrevida global.....	74
4.8.4.2 Sobrevida livre de doença.....	75
5 DISCUSSÃO	76
6 CONCLUSÕES.....	85
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
8 ANEXOS	96
8.1 FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	96
8.2 APOIO FINANCEIRO – APQ1 FAPERJ.....	97
8.3 FICHA DE REGISTRO.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1	Dados sociodemográficos, clinicopatológicos e de acompanhamento coletados da população de estudo	15
Tabela 3.2	Protocolo de recortes semi-seriados	17
Tabela 3.3	Padronização final dos anticorpos	18
Tabela 3.4	Classificação histopatológica recomendada pela OMS, 2017	21
Tabela 3.5	Avaliação Histopatológica de Risco (AHR) proposta por Brandwein-Gensler <i>et al.</i> (2005)	22
Tabela 4.1	Características sociodemográficas e clinicopatológicas dos pacientes	31
Tabela 4.2	Perfil dos pacientes com linfonodos positivos para o anticorpo pan-CK AE1/AE3	44
Tabela 4.3	Caracterização anatômica das metástases ocultas	45
Tabela 4.4	Acurácia dos métodos de detecção de metástase oculta	46
Tabela 4.5	Análise descritiva e estatística dos dados sociodemográficos	47
Tabela 4.6	Análise descritiva e estatística dos dados clinicopatológicos	49
Tabela 4.7	Análise descritiva e estatística do acompanhamento dos pacientes e distribuição dos casos de recidiva e segundo tumor primário	50
Tabela 4.8	Análise das gradações histopatológicas da Organização Mundial de Saúde e Avaliação Histopatológica de Risco	52
Tabela 4.9	Distribuição da densidade linfática intratumoral em relação as variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas	57
Tabela 4.10	Distribuição da densidade linfática intratumoral em relação aos dados de seguimento e as gradações histopatológicas	58
Tabela 4.11	Distribuição da densidade linfática peritumoral em relação as variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas.....	62
Tabela 4.12	Distribuição da densidade linfática peritumoral em relação aos dados de seguimento e as gradações histopatológicas	63
Tabela 4.13	Distribuição da densidade linfática tumoral em relação as variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas	65
Tabela 4.14	Distribuição da densidade linfática vascular em relação aos dados de seguimento e as gradações histopatológicas	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1	VEGF e quimiocinas envolvidas no processo metastático.....	7
Figura 3.1	Material e métodos. Gradação histopatológica da OMS.....	21
Figura 3.2	Material e métodos. Padrão de invasão tumoral.....	24
Figura 3.3	Material e métodos. Infiltrado linfocitário e invasão perineural.....	25
Figura 4.1	Seleção da população de estudo.....	33
Figura 4.2	Caso 1. Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ.....	35
Figura 4.3	Caso 2. Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ.....	36
Figura 4.4	Caso 3. Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ.....	37
Figura 4.5	Caso 4. Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ.....	38
Figura 4.6	Caso 5. Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ.....	39
Figura 4.7	Caso 6. Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ.....	40
Figura 4.8	Caso 7. Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ.....	41
Figura 4.9	Caso 8. Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ.....	42
Figura 4.10	Caso 9. Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ.....	43
Figura 4.11	Resultados. Gradação histopatológica da OMS.....	52
Figura 4.12	Resultados. Padrão de invasão tumoral.....	53
Figura 4.13	Resultados. Invasão perineural.....	53
Figura 4.14	Resultados. Infiltrado linfocitário.....	54
Figura 4.15	Densidade linfática tumoral. Vasos linfáticos intratumorais.....	55
Figura 4.16	Densidade linfática tumoral. Vasos linfáticos peritumorais.....	60

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1	Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global média dos pacientes.....	67
Gráfico 4.2	Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença média dos pacientes.....	67
Gráfico 4.3	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global. Variável metástase cervical.....	68
Gráfico 4.4	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença. Variável metástase cervical.....	69
Gráfico 4.5	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global. Variável densidade vascular linfática.....	70
Gráfico 4.6	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença. Variável densidade vascular linfática.....	71
Gráfico 4.7	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global. Variável densidade linfática intratumoral.....	72
Gráfico 4.8	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença. Variável densidade linfática intratumoral	73
Gráfico 4.9	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global. Variável densidade linfática peritumoral.....	74
Gráfico 4.10	Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença. Variável densidade linfática peritumoral.	75

LISTA DE ABREVIATURAS

AHR	Análise Histopatológica de Risco
APQ1	Auxílio à Pesquisa
BLS	Biópsia de linfonodo sentinela
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CCEO	Carcinoma de Células Escamosas Oral
CC19	Chemokine (C-C motif) ligand 19
CCL21	Chemokine (C-C motif) ligand 21
CCR7	Chemokine (C-C motif) receptor 7
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cT	Extensão clínica do tumor primário
cTNM	Estadiamento Clínico
cN	Ausência ou presença e a extensão clínica de metástase em linfonodos regionais
cN0	Ausência clínica de metástase em linfonodos regionais
cN+	Presença clínica de metástase em linfonodos regionais
DAB	Diaminobenzidina
DIPAT	Divisão da Patologia
DLI	Densidade linfática intratumoral
DLP	Densidade linfática peritumoral
DVL	Densidade vascular linfática
FAPERJ	Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro
HE	Hematoxilina e eosina
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IC	Intervalo de confiança
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
IL	Infiltrado linfocitário
IP	Invasão perineural
OMS	Organização Mundial de Saúde
pan-CK AE1AE3	pan-Citoqueratina AE1AE3
PET	Tomografia por emissão de pósitrons

pN	Ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais confirmada microscopicamente
pN0	Ausência de metástase em linfonodos regionais confirmada microscopicamente
pN+	Presença de metástase em linfonodos regionais confirmada microscopicamente
PPI	Pior padrão de invasão
pT	A extensão do tumor primário confirmado microscopicamente
pTNM	Estadiamento Patológico
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
TNM	Sistema de Estadiamento de Neoplasias Malignas “ <i>tumor-node-metastasis</i> ”
UERJ	Universidade do Estado do Rio de Janeiro
UICC	União Internacional de Combate ao Câncer
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-C	Fator de crescimento endotelial vascular-C

1 INTRODUÇÃO

Globalmente, o câncer oral apresenta-se como o sexto tipo mais comum de câncer (WARNAKULASURIYA, 2009). Nesta localização, o tipo histológico predominante é o carcinoma de células escamosas (CCE), sendo responsável por mais de 90% das neoplasias malignas diagnosticadas na boca (WONG *et al.*, 1996; NOLLET *et al.*, 1999; SCULLY & BAGAN, 2009; WARNAKULASURIYA, 2009; NEVILLE *et al.*, 2016).

A mais recente estimativa de incidência de câncer, apontou para o Brasil, no ano de 2018, 14.700 novos casos, sendo 11.200 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 3.500 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 10,86 casos novos a cada 100 mil homens e 3,28 a cada 100 mil mulheres, sendo o 5º mais comum entre os homens e o 12º entre as mulheres (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A localização mais comum para o carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é a língua, neste sítio as lesões possuem alta frequência de metástase regional, pior prognóstico e baixas taxas de sobrevida (PIMENTA-AMARAL *et al.*, 2004; VARTANIAN *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2006; BELLO *et al.*, 2010).

Há muitos anos, o sistema de estadiamento clínico de tumores (cTNM) tem sido o padrão de classificação adotado para caracterizar os tumores. As informações obtidas pelos exames clínicos e de imagem são utilizadas para estabelecer o estágio clínico (cEstadio), propor a terapia mais adequada e estimar a sobrevida dos pacientes. Caso o paciente seja submetido à ressecção cirúrgica, determina-se o estágio patológico (pTNM) através do exame histopatológico do tumor e/ou dos linfonodos regionais, auxiliando na seleção da terapia adjuvante pós-operatória e na estimativa do prognóstico. O estadiamento, baseado no sistema TNM, tem como objetivo delinear a extensão anatômica da doença através da combinação de seus componentes: T - extensão local ou tamanho do tumor primário; N - disseminação regional para linfonodos; M - presença ou ausência de metástase à distância. Após definir as categorias T, N e M, elas podem ser agrupadas em estádios. O carcinoma *in situ* é categorizado como estágio 0; casos com metástase à distância, estágio IV (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

Entretanto, para a metástase tumoral, o cTNM não permite o prognóstico preciso, porque os tumores atribuídos ao mesmo estágio podem ter diferentes graus de agressividade (PATEL & SHAH, 2005). Dessa forma, permanece a busca por outros fatores prognósticos fidedignos para CCEO que possam ajudar a identificar os diferentes grupos de risco (BETTENDORF *et al.*, 2004).

Caso o paciente seja submetido à ressecção cirúrgica, determina-se o estágio patológico (pTNM) pelo exame histopatológico do tumor e dos linfonodos regionais, auxiliando na seleção da terapia adjuvante pós-operatória e na estimativa do prognóstico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; HONORATO *et al.*, 2009; BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2010).

A metástase em linfonodos cervicais revela-se como o principal fator prognóstico para o CCEO. (WOOLGAR, 1999; HOLLENBEAK *et al.*, 2001; FERLITO *et al.*, 2002; KOWALSKI & SANABRIA, 2007; SANO & MYERS, 2007; DAS & SKOBE, 2008; LIU *et al.*, 2011; NATAJARAN & EISENBERG, 2011). O paciente que em sua avaliação inicial é diagnosticado como cN+, a taxa de sobrevida em 5 anos pode diminuir para menos de 20% (DIAS *et al.*, 2001; ORD, 2012).

O tratamento adequado para tumores com estadiamento inicial (I e II) do CCEO continua a ser uma questão controversa. O controle do tumor primário geralmente é conseguido com ressecção cirúrgica com margem de pelo menos 1,0cm e/ou radioterapia, a recorrência em linfonodos cervicais freqüentemente resulta em insucesso no controle da doença. Vários estudos têm demonstrado uma incidência substancial (25% a 43%) de doença oculta no pescoço, especialmente no estágio II, sua presença foi associada com uma diminuição significativa da sobrevida (KLIGERMAN *et al.*, 1994; ORD, 2012). Em casos de linfonodos cervicais diagnosticados clinicamente ou por exame de imagem como positivos (cN+) é realizado o esvaziamento cervical radical. No tratamento cirúrgico de tumores iniciais (estádios I e II) localizados em língua e em lesões infiltrativas de assoalho de boca (as mais comuns), deve-se associar o esvaziamento cervical eletivo supra-omoióideo (níveis I, II e III) em virtude do alto índice de metástase cervical oculta podendo variar em torno de 20% até 30% (PIMENTA-AMARAL *et al.*, 2004; CAMPANA & MEYERS, 2006; KOWALSKI & SANABRIA, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Alguns autores reforçam que a melhor abordagem de tratamento para esse grupo de pacientes permanece controversa (BYERS *et al.*, 1998; KOWALSKI &

SANABRIA, 2007). Recomendar o tratamento eletivo do pescoço em estágio I do CCE de língua e assoalho de boca permanece em aberto. Tanto o esvaziamento eletivo quanto a política do "observar e aguardar" têm seus defensores entre os cirurgiões de cabeça e pescoço de diferentes centros em todo o mundo (DIAS *et al.*, 2001). Diante disso, a literatura busca identificar fatores clínico patológicos associados ao alto risco de metástases nos linfonodos que possam ser úteis para a seleção adequada do grupo de pacientes que se beneficiarão do esvaziamento cervical eletivo do pescoço, permitindo que os pacientes de baixo risco sejam poupados de cirurgia sem necessidade e de suas possíveis sequelas.

Em estudo recente, SCHILLING *et al.* (2017), fizeram uma revisão sobre a utilização de biópsia em linfonodos sentinela (BLS) em paciente com tumores de cabeça e pescoço. É estabelecido na literatura que a BLS é amplamente utilizada no rastreamento de metástase regional em pacientes com tumores de mama (LYMAN *et al.* 2005), porém em tumores de cabeça e pescoço, até o presente momento, essa ferramenta não é utilizada em todo o mundo. Existem poucos centros de tratamento de câncer que utilizam a BLS em sua rotina, e isso é explicado, porque estudos prospectivos que validem o real benefício da BLS em comparação ao esvaziamento cervical eletivo ainda não foram realizados.

A literatura destaca a espessura do tumor como uma variável importante de comportamento biológico tumoral, diferentes estudos encontraram associações significativas em amostras de CCE de língua iniciais. VISHAK & ROHAN, (2014) estudou somente CCE de língua, classificados como T1 e concluiu que esses tumores são associados com alta incidência de metástase nos linfonodos cervicais e o esvaziamento cervical eletivo deve ser considerado em todos os pacientes com tumores com mais de 3mm de espessura. Em estudo avaliando tumores de língua T1-T2, HAKEEM *et al.* (2016) recomendaram o esvaziamento cervical seletivo profilático principalmente em tumores com espessura maior que 5mm, invasão linfovascular e invasão perineural. GANLY *et al.* (2013), encontraram em análise múltipla que a espessura do tumor foi a única variável isoladamente a indicar de recorrência regional, mostrando significância estatística na sobrevida livre de doença quando comparou tumores menores a 4mm com maiores ou igual a 4mm.

BAJWA *et al.* (2011) reportaram em seu estudo, pela comparação do tratamento de 87 pacientes com CCEO associado ao esvaziamento cervical seletivo dos níveis I-III e dos níveis I-IV que o esvaziamento cervical dos níveis I, II e III é

efetivo no tratamento do pescoço cN0 e deve ser associado a radioterapia em casos de linfonodos comprometidos e extravasamento capsular.

Embora tenha se obtido um avanço nas técnicas cirúrgicas, em abordagens multidisciplinares de tratamento e novas drogas antineoplásicas tenham surgido, a sobrevida dos pacientes acometidos pelo câncer de boca apresentou apenas discreta melhora (DEL-SORDO *et al.*, 2010) ou em nada melhorou (BEAVON, 2000) com os pacientes ainda sucumbindo à doença metastática (MBURU *et al.*, 2006).

A avaliação dos linfonodos torna-se necessária para estadiamento do tumor, determinação do prognóstico e para o planejamento de estratégias terapêuticas (TRAPPEN & PEPPER, 2002).

É de amplo conhecimento que a identificação de metástases regionais, no momento do diagnóstico, é um fator determinante para o tratamento e prognóstico desses pacientes (KOWALSKI & MEDINA, 1998; KOWALSKI & SANABRIA, 2007). Mesmo com a padronização dos exames clínicos e com os avanços nos exames complementares por imagem, muitas vezes as metástases linfonodais são de difícil detecção (WARBURTON *et al.*, 2007; TAKES *et al.*, 2008).

Como fruto de sua sensibilidade limitada, a histopatologia de rotina subestima a prevalência de micrometástases em linfonodos. Micrometástases ocultas presentes no momento do diagnóstico primário são muitas vezes não identificadas por meio dos métodos convencionais. A realização de recortes semi-seriados corados em hematoxilina e eosina (HE) e a imuno-histoquímica (IHQ) foram sugeridas para aumentar a taxa de detecção de micrometástases em linfonodos histologicamente livres de tumor com uso de anticorpos, por exemplo as citoqueratinas (WOOLGAR, 1999; TRAPPEN & PEPPER, 2002).

Assim, a controvérsia surge quanto à possibilidade de tratamento suplementar (esvaziamento cervical ou irradiação), que deve ser oferecido após a detecção de micrometástases (ATULA *et al.*, 2009).

A presença de células tumorais ocultas metastáticas, clinicamente indetectáveis pode explicar porque a recidiva é freqüente neste grupo de CCEO de alto risco. Embora nem todas as micrometástases se estabeleçam em tumor, há provas convincentes de que a presença de micrometástases tem significado clínico (TRAPPEN & PEPPER, 2002). GANLY *et al.* (2013) verificaram em seu estudo que sete de 52 (14%) pacientes submetidos a esvaziamento cervical regional a presença

de metástase não foi diagnosticada pela análise histopatológica convencional, somente após investigação através de recortes semi-seriados do material emblocado. Dois desses pacientes desenvolveram recorrência regional.

DHAWAN *et al.* (2016), em amostra com 10 pacientes de CCEO, investigou a presença de metástase oculta, por meio de recortes semi-seriados dos linfonodos esvaziados. Do total de linfonodos avaliados, 2,25% apresentaram micrometástases e correspondeu a 33,3% dos pacientes estudados. Os autores concluíram que os recortes semi-seriados devem ser preferidos em relação aos métodos convencionais, pois resultam em estadiamento mais fiel, evitando assim a morbidade de tratamento desnecessário.

Em 69 pacientes com CCE de cabeça e pescoço, KWON *et al.*, (2004), investigaram 1710 linfonodos esvaziados por meio de recortes semi-seriados e reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-pan-citoqueratina AE1/AE3 (pan-CK AE1/AE3) e diagnosticaram metástase oculta em 13 (18,8%) dos pacientes avaliados. Em revisão retrospectiva das lâminas em HE correspondentes ao linfonodos avaliados na rotina histopatológica, foi detectada presença de metástase em 4 dos 13 pacientes.

De acordo com alguns autores, a investigação e a detecção de fatores preditivos e biomarcadores tumorais que possam prever as metástases, especialmente as metástases ocultas regionais, torna-se fundamental para aumentar as taxas de sobrevida e melhorar o prognóstico dos pacientes, principalmente diagnosticados com doença em estádios iniciais (MUNOZ-GUERRA *et al.*, 2004; PIMENTA AMARAL *et al.*, 2004). Essa busca representa um grande desafio, para promover melhores tratamentos com o uso de terapias direcionadas (CIRLIGERIU *et al.*, 2014).

Nos últimos anos, tem sido discutido que as células tumorais não só tiram proveito dos fatores tróficos produzidos pelas células inflamatórias, como também podem usar as moléculas de adesão, quimiocinas e receptores para ajudar na migração e “homing” durante o processo de metástase. Evidências sugerem que os mecanismos utilizados para “homing” de leucócitos podem ser apropriados para a migração de células tumorais através da corrente sanguínea e de vasos linfáticos (COUSSENS & WERB, 2002). As células tumorais não migram aleatoriamente. Uma explicação para este fenômeno é que essa migração específica de células tumorais pode ser determinada pela expressão de receptores de quimiocinas e pelas

quimiocinas expressas nos órgãos-alvo (ROSSI & ZLOTNIK, 2000), da mesma forma que acontece no processo regulatório do tráfego dos linfócitos (WILEY *et al.*, 2001).

Antigamente, os vasos linfáticos eram considerados participantes passivos no processo de migração de células na metástase tumoral e que as células tumorais eram drenadas para os vasos linfáticos sem a participação deles (DAS & SKOBE, 2008). Contudo, com a descoberta de vários marcadores moleculares-chave específicos para os vasos linfáticos e com aumento da disponibilidade de sistemas experimentais *in vitro* e *in vivo* para o estudo da biologia linfática, verificou-se que sua participação é muito mais complexa, com papel ativo na disseminação metastática do tumor (DAS & SKOBE, 2008).

Além dos estudos sobre as quimiocinas e sua participação no processo metastático, a influência das moléculas associadas a linfangiogênese tumoral tem sido cada vez mais discutida (DAS & SKOBE, 2008).

Na maioria dos tumores sólidos, a disseminação das células metastáticas ocorre por vasos linfáticos. Acredita-se que esse processo de metástase seja diretamente influenciado pelo fenômeno de formação de novos vasos linfáticos associados ao tumor, denominada de linfangiogênese tumoral (DAS & SKOBE, 2008).

A linfangiogênese induzida por tumores é mediada por fatores de crescimento linfangiogênico que são produzidos e secretados pelas próprias células tumorais, células estromais, macrófagos infiltrantes do tumor ou ativadas plaquetas (CHRISTIASSEN & DETMAR, 2011). A **Figura 1.1** mostra o quanto complexo é o processo de metástase das células tumorais.

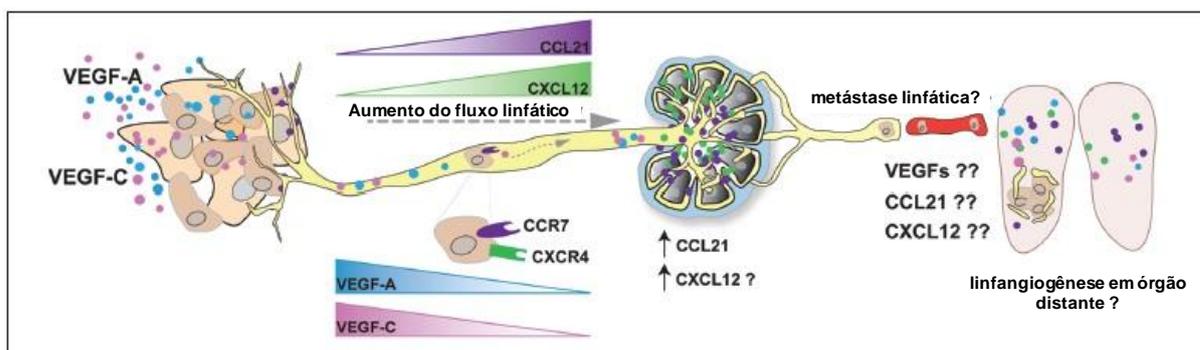


Figura 1.1: VEGF e quimiocinas envolvidas no processo de metástase. As quimiocinas medeiam a metástase via vasos linfáticos. As células malignas expressam receptores de quimiocinas, como CCR7 e CXCR4. Gradientes quimiotáticos e seus respectivos ligantes de quimiocinas (CCL19 / 21 e CXCL12), estabelecidos por células endoteliais linfáticas associadas ao tumor e linfonodos, guiam ativamente as células metastáticas positivas ao receptor de quimiocinas inicialmente em vasos linfáticos e depois para os linfonodos sentinelas de drenagem. O VEGF-C e o aumento do fluxo linfático observado dentro dos vasos linfáticos associados ao tumor podem atuar para aumentar a expressão das quimiocinas e assim aumentar ainda mais a metástase. As quimiocinas também podem guiar as células metastáticas para os órgãos distantes e tecidos que são locais preferenciais para exibir as metástases em níveis elevados de CXCL12. (Adaptado: CHRISTIASSEN & DETMAR, 2011).

Os capilares linfáticos são constituídos por uma fina parede de células endoteliais e não possuem membrana basal contínua e pericitos. Essas características diferem dos capilares sanguíneos, dessa forma as células epiteliais malignas têm maior facilidade de transpor os capilares linfáticos, ter acesso a circulação linfática e conseqüentemente aos linfonodos regionais, favorecendo assim o processo metastático por esta via (PEPPER *et al.*, 2003; SUNDAR & GANESAN, 2007).

A influência da linfangiogênese no processo da biologia tumoral e o favorecimento de metástases parece estar associada aos vasos linfáticos mais periféricos ao tumor por apresentarem maior calibre e permeabilidade contrastando com vasos linfáticos intratumorais que se mostram mais comprimidos e com funcionalidade diminuída (PADERA *et al.*, 2002; KYZAS *et al.*, 2005)

A busca por biomarcadores de comportamento biológico tumoral, tendo sido uma constante entre estudos, que desejam identificar tumores mais agressivos e com maior potencial de metástase para linfonodos regionais.

A mensuração da presença de vasos linfáticos no microambiente tumoral e da densidade vascular linfática, necessita de um marcador específico que a torne mais

precisa. O marcador mais utilizado é a podoplanina, que consiste em uma glicoproteína transmembrana (WICKI & CHRISTOFORI, 2007) .

A podoplanina é uma pequena glicoproteína de membrana e pertence as proteínas do tipo mucina. Pode ser encontrada na superfície de muitos tipos de células normais provenientes de várias camadas germinativas. Está presente exclusivamente no endotélio de vasos linfáticos e não é encontrada em vasos sanguíneos, também é encontrada em pneumócitos tipo I e podócitos glomerulares. O aumento dos níveis de podoplanina ou sua neoexpressão tem sido encontradas em vários tipos de carcinomas humanos, mas é especialmente comum em carcinomas de células escamosas, localizados em cérvix uterino, laringe, cavidade oral, pele e pulmão (MARGARITescu *et al.*, 2010).

A podoplanina é conhecida como marcador de células endoteliais linfáticas, sua expressão tem sido relatada em vários tipos de câncer, incluindo carcinoma de células escamosas de boca. A podoplanina está envolvida no processo da tumorigênese e na progressão do câncer na cabeça e no pescoço e sua expressão não se restringe ao endotélio vascular linfático (MARGARITescu *et al.*, 2010).

ABDUL-AZIZ *et al.* (2017), avaliaram a densidade linfática vascular e a morfometria dos vasos linfáticos usando o anticorpo anti-podoplanina (D2-40). Seus resultados mostraram que em mucosa normal, os vasos linfáticos foram restritos ao tecido conjuntivo subepitelial. Em CCEO sem comprometimento de linfonodos, os vasos linfáticos eram mais numerosos e maior em tamanho quando comparados aos observados na mucosa normal e foram detectados superficialmente no tecido conjuntivo subepitelial e profundo entre os ninhos de células epiteliais malignas. Vasos linfáticos subepiteliais e aqueles localizados na periferia da lesão eram dilatados, enquanto os vasos linfáticos intratumorais (entre os ninhos de células epiteliais malignas) foram comprimidos entre as ilhas epiteliais invasivas. No CCEO com comprometimento de linfonodos, os vasos linfáticos eram mais amplos e dilatados (lúmen maior) do que os casos de mucosa normal e CCEO sem comprometimento de linfonodos. Eles foram detectados superficialmente no tecido conjuntivo subepitelial, entre as ilhas de células epiteliais malignas e profundamente entre fibras musculares. Entretanto, alguns vasos linfáticos foram comprimidos pelas ilhas de células epiteliais malignas, sendo difícil visualizar o lúmen.

A alta densidade de vasos linfáticos tem sido associada a metástases regionais (SEDIVY *et al.*, 2003; MIYAHARA *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2008; CHUNG

et al., 2010), risco aumentado de recorrência loco-regional, incluindo nos estádios iniciais (I e II) e uma menor sobrevida para os pacientes (MUNOZ-GUERRA *et al.*, 2004; MIYAHARA *et al.*, 2007; WICKI & CHRISTOFORI, 2007).

Estudos mostraram que a quantificação por meio da densidade de vasos linfáticos é uma ferramenta importante na associação com moléculas de linfangiogênese para estimar o valor preditivo em metástases ocultas em CCEO (MIYAHARA *et al.*, 2007, WARBURTON *et al.*, 2007; FAUSTINO *et al.*, 2008)

SEDIVY *et al.*, 2003, estudaram 28 pacientes com CCEO, de diferentes localizações e encontraram associação significativa entre a densidade vascular linfática e a ocorrência de metástases, não especificando se os vasos linfáticos eram intratumorais ou peritumorais. Concluíram ainda, que a densidade vascular linfática foi significativamente mais alta nos tumores quando comparadas as margens saudias, sugerindo uma importante participação da linfangiogênese no processo metastático.

MIYAHARA *et al.* (2007), em estudo semelhante, avaliaram CCEO sem especificar as localizações do tumor e se a densidade linfática tumoral avaliada foi intratumoral ou peritumoral, porém com uma população de estudo maior, 110 casos, e concluiu que alta densidade linfática vascular associou-se significativamente com o comprometimento de linfonodos e menor sobrevida livre de doença.

Em estudo, de 31 CCEO de diferentes localizações, LONGATTO-FILHO *et al.* (2007), avaliaram a densidade linfática intratumoral e peritumoral e não encontraram diferenças estatísticas entre elas, entretanto pacientes que apresentaram tumores com alta densidade linfática peritumoral apresentaram menor sobrevida.

Ainda é controverso, se as células epiteliais malignas promovem o extravasamento do tumor por expansão e invasão de vasos linfáticos peritumorais pré-existentes (PADERA *et al.*, 2002; KYZAS *et al.*, 2005) ou por indução e invasão de vasos linfáticos recém formados dentro dos tumores (DAS & SKOBE, 2008).

Em 2008, ZHAO *et al.*, estudaram em uma população de estudo de 86 CCEO, a densidade linfática intratumoral e peritumoral, e apesar de verificar uma maior densidade linfática peritumoral, apenas a alta densidade linfática intratumoral mostrou associação significativa com maior invasão de vasos linfáticos, recidiva tumoral e menores taxas de sobrevida global e livre de doença. Ambas as densidades foram significativas para metástase linfonodal.

Em 62 pacientes com CCE exclusivamente de língua, CHUNG *et al.*, (2010), verificaram que invasão perineural e a invasão linfovascular foram significativamente associadas com metástase regional. A metástase regional foi significativamente maior em pacientes com alta densidade intratumoral. Por análise múltipla, a densidade linfática intratumoral foi a única variável significativamente associada com a metástase regional. A densidade linfática peritumoral não mostrou associação com metástases regionais. Os autores concluíram que a densidade linfática intratumoral mostrou uma forte associação com as metástases em pacientes com CCE de língua.

MUNÓZ-GUERRA *et al.* (2004), avaliaram 61 CCE de língua e assoalho de boca, em estadiamento inicial, encontraram relação significativa entre a densidade linfática intratumoral e a presença de recidiva loco-regional e em análise múltipla a densidade linfática intratumoral foi a única variável independente significativa para menor sobrevida livre de doença.

Diante do exposto, a presença de metástase cervical oculta e a expressão da podoplanina como ferramenta para a densidade de vasos linfáticos intratumorais e peritumorais, são variáveis importantes a serem estudadas no carcinoma de células escamosas de língua e assoalho de boca.

.

1.1 JUSTIFICATIVA

O CCEO é uma neoplasia maligna considerada uma problema de saúde pública. Mesmo com avanço em técnicas cirúrgicas, em abordagens multidisciplinares de tratamento e novas drogas antineoplásicas tenham surgido, a sobrevida dos pacientes acometidos pelo câncer de boca não apresentou melhora significativa.

A metástase cervical é considerada o principal fator de pior prognóstico que implica em baixas taxas de sobrevida.

CCE de língua e assoalho de boca são os mais incidentes e com maior propensão para metástase cervical mesmo em estadiamentos iniciais, sendo importante o estudo com perfil de amostra homogêneo, utilizando localizações específicas. Não obstante, esses tumores de língua e assoalho de boca apresentam alta frequência de metástase oculta e sua identificação é fundamental para o correto planejamento terapêutico.

Além da investigação de comprometimento dos linfonodos cervicais, é necessário ampliar o conhecimento dos mecanismos e moléculas envolvidos no complexo processo de metástase.

O extravasamento de células epiteliais malignas para os linfonodos cervicais, é resultante de interações no microambiente tumoral, que por meio de fatores de crescimento endoteliais vasculares, estimulam a linfangiogênese. Marcadores específicos para endotélio linfático, permitem a identificação da densidade de vasos linfáticos, que tem sido associado a piores desfechos para os pacientes.

É fundamental a busca de marcadores prognósticos que possam melhor prever o comportamento de um tumor individualmente ou de um grupo de pacientes e auxiliar a definir a escolha do esvaziamento cervical, melhorando o tratamento e a sobrevida desses pacientes.

1.2 HIPÓTESES

Diante do exposto, as seguintes hipóteses foram formuladas:

- 1) Os recortes semi-seriados dos linfonodos em associação à reação imuno-histoquímica da pan-CK AE1/AE3 eleva a frequência de detecção de metástase linfonodal, especialmente de micrometástases.
- 2) A maior densidade de vasos linfáticos em CCE primários em língua e assoalho de boca está diretamente associada com metástases em linfonodos cervicais e pior sobrevida dos pacientes.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Investigar a presença e o prognóstico de metástase cervical oculta em pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de língua e/ou assoalho de boca associando à densidade de vasos linfáticos.

2.2 ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar a presença de células epiteliais malignas nos linfonodos cervicais diagnosticados livres de neoplasia;

- 2) Avaliar a associação da densidade linfática intratumoral, densidade linfática peritumoral e densidade vascular linfática com os dados sociodemográficos e clinicopatológicos dos pacientes;

- 3) Analisar a sobrevida global e livre de doença das variáveis metástase cervical, densidade linfática intratumoral, densidade linfática peritumoral e densidade vascular linfática, na população de estudo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (INCA) sob o número de registro na plataforma Brasil CAAE (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética) 10017313.6.0000.5274 (**Anexo I**) e teve como fonte financiadora a Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro sob o número de processo E-26/110.955/2013. O fomento foi outorgado à pesquisadora Dra. Vania Glória Silami Lopes, que teve participação no início do estudo como coorientadora da dissertação de Mestrado (**Anexo II**).

3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Esse estudo é observacional e retrospectivo que utilizou material incluído em parafina referente às peças cirúrgicas oriundas de pacientes com carcinomas de células escamosas de língua e/ou assoalho de boca primários e os respectivos linfonodos cervicais, diagnosticados no período entre 1º de janeiro de 2001 e 31 de dezembro de 2003 no Hospital de Câncer I (HCI) do INCA.

3.2. POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população de estudo foi coletada em múltiplas etapas. Na primeira etapa, realizada no banco de dados informatizado da Divisão de Patologia (DIPAT) do INCA, foi realizada a identificação dos pacientes registrados com CCEO no período de 01 de janeiro de 2001 a 31 de dezembro de 2003.

Na segunda etapa foram aplicados os seguintes critérios de inclusão e exclusão:

3.2.1. Critérios de inclusão

1. Pacientes com diagnóstico anatomopatológico de CCEO primários, realizado entre 1º de janeiro de 2001 e 31 de dezembro de 2003;
2. Tumor com localização primária em língua e/ou assoalho de boca;
3. Pacientes classificados com linfonodos sem comprometimento clinicamente (cN0)
4. Pacientes submetidos à ressecção cirúrgica como tratamento inicial quer seja seguida ou não de radioterapia ou quimioterapia adjuvante;
5. Pacientes nos quais a cirurgia do tumor primário tenha sido realizada em associação com esvaziamento cervical;
6. Material emblocado em parafina com qualidade e quantidade suficientes para a realização da análise imuno-histoquímica, tanto do tumor quanto dos linfonodos cervicais;
7. Margens cirúrgicas livres de neoplasia ou displasia epitelial severa.

3.2.2 Critérios de exclusão

1. Pacientes com CCE localizados em lábio e orofaringe (incluindo base de língua), área retromolar, gengiva superior, gengiva inferior, mucosa jugal ou palato duro;
2. Pacientes com dados clinicopatológicos indefinidos ou ausentes;
3. Ausência de laudos histopatológicos tanto da lesão primária em boca quanto dos linfonodos cervicais;
4. Tumores classificados como carcinoma *in situ*.
5. Pacientes jovens, com idade ≤ 40 anos.

3.2.3 Registro dos dados sociodemográficos e clinicopatológicos

Os dados sociodemográficos, clinicopatológicos e de acompanhamento da população selecionada foram coletados dos prontuários e armazenados na ficha de registro previamente confeccionada (**ANEXO III**). Dos prontuários de cada um dos pacientes foram compiladas as informações dos CCE de língua e/ou assoalho demonstradas na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1: Dados sociodemográficos, clinicopatológicos e de acompanhamento coletados da população de estudo.

INFORMAÇÕES COLETADAS		
Dados do paciente	Sexo Cor Escolaridade Tabagismo Etilismo	Data de entrada Data de nascimento Data da biópsia Data da confirmação do diagnóstico pelo INCA
Informações sobre a doença	Localização Outros tumores	TNM clínico Estadiamento clínico
Informações sobre o tratamento	Tratamento inicial Tratamento adjuvante	Data do tratamento inicial Data do término do tratamento
Informações sobre a cirurgia	Esvaziamento cervical Margens livres	TNM patológico Estadiamento patológico
Dados do acompanhamento	Progressão da doença Recidiva Tipo de recidiva Segundo tumor primário Óbito	Data sem evidência de doença Data da recidiva Data da última consulta Data do segundo tumor primário Data do óbito
Informações histopatológicas	Gradação da OMS da biópsia Gradação da OMS da cirurgia	Espessura do tumor Invasão perineural

3.2.4 Seleção e preparo do material de estudo

A partir da análise de todas as lâminas disponíveis de cada caso, foram selecionados os blocos mais representativos do tumor para análise morfológica detalhada e para o estudo imuno-histoquímico. Os seguintes critérios foram adotados: inclusão adequada da peça cirúrgica; quantidade de material presente no bloco de parafina; material exibindo histopatologia característica – sem grande quantidade de hemorragia, necrose ou excesso de ceratinização; boa qualidade e preservação do material.

Dos blocos de parafina do tumor primário e dos linfonodos cervicais selecionados na DIPAT/INCA, foram obtidos cortes histológicos de 4µm de espessura. Uma lâmina de cada caso foi corada com a técnica de HE, na DIPAT do INCA, e as lâminas tratadas com silano foram utilizadas para a técnica IHQ. As lâminas foram distribuídas conforme protocolo explicado abaixo.

Dos blocos do tumor foram obtidas duas lâminas: a primeira para coloração em HE e a segunda preparada com silano para IHQ.

Nos linfonodos cervicais o processamento ocorreu de forma distinta. O grupo de pacientes diagnosticados como pN0 após a avaliação histopatológica de rotina em hematoxilina e eosina, foram submetidos a cortes semi-seriados com intervalo de 150 µm entre os cortes selecionados, com objetivo de investigar a presença de metástases e micrometástases ocultas. Esse protocolo de investigação de micrometástases através de cortes semi-seriados utilizando avaliação morfológica em HE e pela IHQ com anticorpo anti-pan-CK AE1/AE3 é descrito na literatura por vários autores (ROSS *et al.*, 2004; ATULA *et al.*, 2009). Nas lâminas de 1 a 4 foram feitas em ordem: a primeira lâmina para coloração em HE e as demais com silano para IHQ, sendo duas extras, de forma similar foram realizadas as lâminas de 5 a 7. **(Tabela 3.2).**

Tabela 3.2. Protocolo de recortes semi-seriados.

	pNO	pN+
TUMOR	1ª Lâmina: HE 2ª Lâmina: IHQ (Podoplanina)	1ª Lâmina : HE 2ª Lâmina : IHQ (Podoplanina)
LINFONODOS	1ª Lâmina : HE 2ª Lâmina : IHQ (CK) 3ª Lâmina : Extra 4ª Lâmina : Extra	
150 µm		5ª Lâmina : HE 6ª Lâmina : IHQ (CK) 7ª Lâmina : Extra

3.2.5 Técnica imuno-histoquímica

As reações IHQ foram realizadas no Laboratório de Toxicologia e Oncologia Molecular do Departamento de Bioquímica do Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE), da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ) – Rio de Janeiro/RJ e no Laboratório de Suporte a Pesquisa e Diagnóstico Molecular na Divisão de Patologia do INCA (DIPAT).

Todas as lâminas histológicas utilizadas foram previamente tratadas com 3-aminopropil-trietoxi-silano (Sigma, EUA) e os blocos de parafina de todos os casos foram cortados na espessura de 4 µm.

As lâminas tratadas com silano contendo cortes histológicos de cada caso foram submetidas à IHQ utilizando os anticorpos anti-pan-citoqueratina AE1/AE3 (diluição 1:400) e anti-podoplanina-D2-40 (1:500) (**Tabela 3.3**). Esses protocolos foram estabelecidos a partir de testes de padronização desenvolvidos. Como controle positivo para o anticorpo anti-pan-citoqueratina AE1/AE3 utilizou-se CCEO e para o anticorpo anti-podoplanina (D2-40), utilizou-se linfangioma. Como controle

negativo foi feita a omissão do anticorpo primário, com o objetivo de assegurar a sensibilidade e especificidade da técnica.

Tabela 3.3. Padronização final dos anticorpos.

Anticorpo primário	Clone	Fornecedor	Diluição	Recuperação Antigênica (banho Maria)	Anticorpo secundário	Revelação
Anti-citoqueratina	AE1AE3	DAKO	1:400	Citrato pH 6	MACH 4	DAB
Anti-podoplanina	D2-40	DAKO	1:500	Citrato pH 6	MACH 4	DAB

A pan-CK AE1AE3 foi usada somente nos casos de linfonodos cervicais do grupo de paciente pN0, nos níveis I, II e III por serem a primeira estação de drenagem linfática do pescoço e por apresentarem alta frequência de metástases ocultas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; KOWALSKI & SANABRIA, 2007). Seu uso tinha como objetivo identificar possíveis micrometástases não observadas nas avaliações morfológicas em HE e reclassificar possíveis casos inicialmente diagnosticados como pN0 em pN+. O anticorpo anti-podoplanina (D2-40) foram utilizados nas lâminas correspondentes ao tumor primário de todos os casos selecionados para o estudo.

As lâminas histológicas foram colocadas em estufa a 60° C por 10 minutos, imersas em xilol a 60° C por 10 minutos e seguidas por quatro banhos consecutivos de cinco minutos cada em xilol para completar a desparafinização. Após isso, as lâminas foram hidratadas em banhos de álcool absoluto (dois banhos de cinco minutos cada), álcool a 90% (dois banhos de cinco minutos cada) e, em seguida, dois banhos de imersão em água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado utilizando-se peróxido de hidrogênio a 30% pré-análise diluído em 1:10 em água destilada (3%) por 30 minutos, em seguida, dois banhos de imersão em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas em tampão citrato pH 6,0 (Target Retrieval solution, DAKO Corporation, Carpinteria, EUA) em banho-maria a 96°C por 30 minutos, após o qual as lâminas resfriaram em temperatura ambiente por 20 minutos, foram lavadas em água destilada, posteriormente colocadas em tampão TBS-tween (TRIS + NaCl + tween 20) pH 7,4-

7,6. Após a recuperação antigênica, as lâminas foram delimitadas com caneta específica (DAKO Cytomation pen; DAKO Corporation, Carpinteria, EUA) e as ligações inespecíficas foram inibidas com incubação das lâminas na solução de albumina sérica bovina (BSA, Sigma, EUA) e leite desnatado por 15 minutos. Após o tempo, a solução foi escorrida e então as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 4°C por 18h com o anticorpo primário diluído em solução diluidora (Antibody diluent, DAKO Corporation, Carpinteria, EUA), sendo armazenadas na geladeira em período *overnight*.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas em dois banhos consecutivos de 5 minutos cada de tampão TBS-t. O anticorpo secundário foi adicionado (MACH4 Mouse Probe, Biocare Medical, Concord, EUA), durante 20 minutos e após lavagem com TBS-t em dois banhos de cinco minutos cada, os cortes foram incubados com o HRP Polymer (MACH4, Biocare Medical, Concord, EUA) por mais 30 minutos. Em seguida foram realizadas duas lavagens com TBS-t por cinco minutos cada e as reações foram evidenciadas com solução de tetracloreto de 3,3' diaminobenzidina (DAB, Dako, Carpinteria, EUA) contendo uma gota de DAB para 1 mL do tampão diluente do kit por 5 minutos. Os cortes foram lavados em água destilada e contra-corados com Hematoxilina de Harris por 1 minuto e 45 segundos. Seguiram-se duas lavagens com água destilada, água destilada com amônio e novamente água destilada, para eliminar os excessos do corante. Em seguida, realizou-se a desidratação com trocas de três banhos de álcool 90% por um minuto, três banhos de álcool a 99% por um minuto, diafanização com xilol com seis banhos de um minuto cada e montagem das lâminas com lamínulas e Entellan (Merck Chemicals, Darmstadt, Alemanha).

3.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS

3.3.1 Descrição da população de estudo

A descrição dos dados demográficos, clínicos, histopatológicos e de acompanhamento foi feita através de proporções, médias e medidas de variabilidade, conforme a natureza das variáveis.

3.3.2 Avaliação histopatológica do tumor

As lâminas contendo os cortes histológicos dos tumores primários dos casos selecionados e corados em HE foram reavaliadas ao microscópico óptico de luz (Nikon Labophot 2, Tóquio, Japão) primeiramente para confirmação diagnóstica e posteriormente para classificação quanto a gradação histopatológica recomendada pela OMS (1997 e 2005 – **Tabela 3.4**) e Avaliação Histopatológica de Risco proposta por BRANDWEIN-GENSLER *et al.* (2005) (**Tabela 3.5**), por dois avaliadores separadamente, e em caso de dúvida ou impasse, um terceiro observador foi consultado segundo as características histopatológicas propostas por cada sistema de classificação.

A aplicação das duas classificações possibilitou a análise de quatro características morfológicas principais: a diferenciação celular, o padrão de invasão tumoral, o infiltrado linfocitário e a presença de invasão perineural.

3.3.3 Gradação histopatológica da OMS

O sistema para gradação histopatológica proposto pela OMS utiliza o critério da diferenciação celular e avalia através da observação de parâmetros como a ceratinização das células, a quantidade de mitoses presente, o pleomorfismo nuclear e a arquitetura tecidual, determinando que os tumores sejam divididos em três grupos - bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados. Os tumores bem diferenciados são aqueles em que a arquitetura tecidual se

assemelha a um padrão normal de epitélio escamoso, já os moderadamente diferenciados apresentam certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e pouca ceratinização, e os tumores pouco diferenciados caracterizaram-se pelo predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, bem como mínima ceratinização (EL-NAGGAR *et al.*, 2017) (**Figura 3.1**). Quando mais de um padrão de diferenciação foi encontrado em uma única amostra, o pior grau foi considerado conforme recomendação da OMS. Este sistema de gradação histopatológica está apresentado na **Tabela 3.4**.

Tabela 3.4 . Classificação histopatológica recomendada pela OMS, 2017.

Classificação OMS	
Parâmetros	Características Histopatológicas
Bem diferenciados	Arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso
Moderadamente diferenciados	Certo grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica Pouca ceratinização
Pouco diferenciados	Predomínio de células imaturas Numerosas mitoses típicas e atípicas Mínima ceratinização

Fonte:El-Naggar *et al.*, WHO Classification of Head and Neck Tumours, 4th edition. Lyon: IARC, 2017.

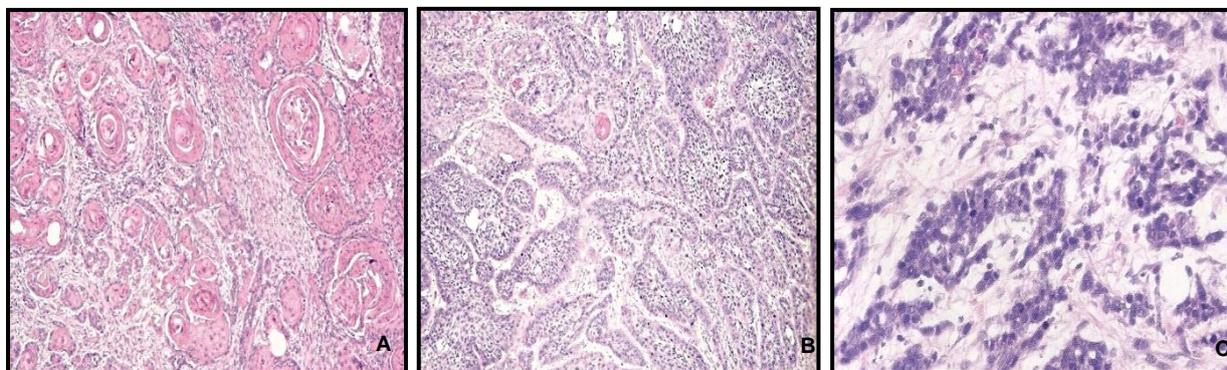


Figura 3.1: Gradação histopatológica da OMS. **A** Bem diferenciado; **B** Moderadamente diferenciado; **C** Pouco diferenciado (El-Naggar *et al.*, 2017).

3.3.4 Avaliação histopatológica de risco (AHR)

A AHR proposta por BRANDWEIN-GENSLER *et al.* (2005) avalia, em todas as lâminas representativas de cada tumor, três características histopatológicas: a invasão perineural, o infiltrado linfocitário e o pior padrão de invasão tumoral presente na amostra, atribuindo a cada uma delas um valor. Conforme a soma das pontuações, os pacientes são divididos em três grupos – (baixo, intermediário e alto) risco para recidivas e sobrevida.

Tabela 3.5. Avaliação Histopatológica de Risco (AHR) proposta por Brandwein-Gensler *et al.* (2005).

AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DE RISCO (AHR)			
Variável Histopatológica	Valores atribuídos		
	0	1	3
Pior padrão de invasão	Padrão 1,2 ou 3	4	5
Infiltrado linfocitário	Contínuo e denso	Grandes agregados	Pouco ou nenhum
Invasão perineural	Nenhum	Pequenos nervos	Grandes nervos
Pontuação de risco (soma dos pontos)	Risco de recorrência local	Probabilidade de sobrevida total	Indicação para radioterapia adjuvante
0	Baixo	Boa	Não
1 ou 2	Intermediário	Intermediária	Não
3 a 9	Alto	Pobre	Sempre

O padrão de invasão, definido pelas características infiltrativas do tumor, foi analisado na interface entre o epitélio tumoral e o tecido conjuntivo do hospedeiro, conforme descrito por BRYNE *et al.* (1992) e adaptado por BRANDWEIN-GENSLER *et al.* (2005), recebendo mais um grau, o quinto (grau 5), obedecendo aos seguintes critérios: Grau 1 – bordas infiltrativas expansivas, bem delineadas; Grau 2 – invasão através de cordões sólidos, bandas ou feixes em forma de dedos ou ilhas tumorais grandes separadas; Grau 3 – células infiltrando em pequenos grupos ou cordões, contendo mais do que 15 células; Grau 4 – crescimento ou invasão difusa com dissociação celular acentuada, com células disseminadas em pequenos grupos celulares (menos do que 15 células) e/ou células soltas ou cordões de células tumorais contendo apenas uma célula, independentemente do tamanho da ilha tumoral; Grau 5 – padrão de invasão altamente disperso, definido por satélites tumorais de qualquer tamanho com distância de 1 mm ou mais do tecido normal interposto na interface tumor/hospedeiro. Os padrões 1, 2 ou 3 recebem zero ponto na avaliação histopatológica de risco, enquanto o padrão 4 recebe um ponto e o padrão cinco, 3 pontos (**Figura 3.2**).

O infiltrado linfocitário na interface tumor-hospedeiro foi quantificado como uma variável de três níveis. O padrão 1 foi assinalado quando o tecido linfóide estivesse presente de forma contínua e densa. O padrão 2 quando focos de infiltrado linfóide denso estivessem presentes na interface, mas de forma descontínua, sendo que a presença de qualquer foco inflamatório qualifica o tumor nesse nível. O padrão 3 significa resposta limitada, sem formar focos linfóides ou ausência de resposta linfóide. (**Figura 3.3**).

A invasão perineural foi definida como o carcinoma acompanhando especificamente o traçado do nervo ou carcinoma dentro do nervo, sendo classificada como envolvendo grandes nervos (diâmetro maior ou igual a 1 mm) ou pequenos nervos (diâmetro menor do que 1 mm) (**Figura 3.3**). Quando o tumor não estava acometendo a bainha do nervo, não foi considerado como invasão perineural.

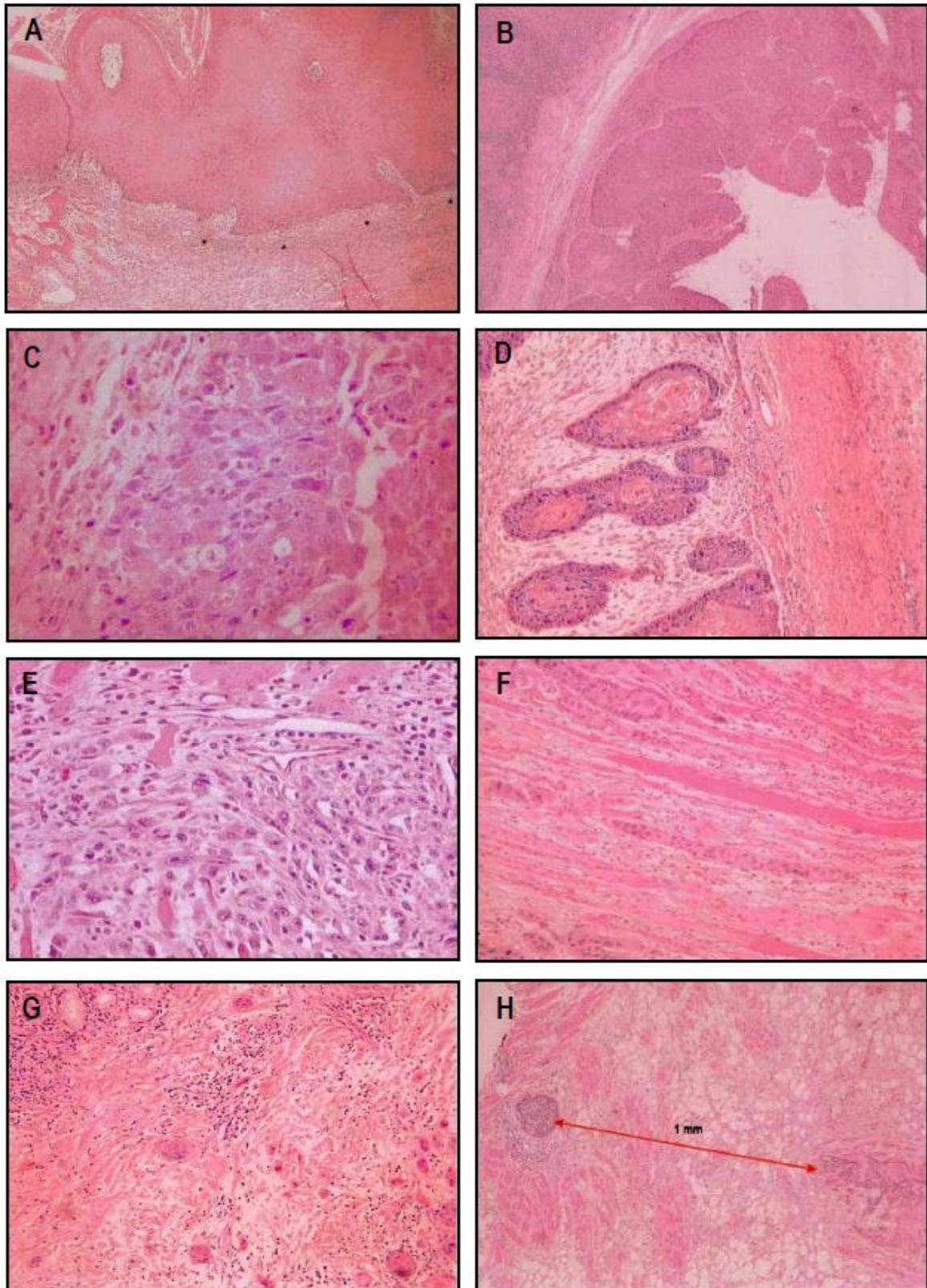


Figura 3.2. Padrões de invasão tumoral. **A** – padrão 1: frente ampla de invasão. **B** – padrão 2: padrão “semelhante a dedos”. **C** – padrão 2: pleomorfismo nuclear, apesar do padrão de invasão inócua. **D** – padrão 3: ilhas na periferia tumoral com mais de 15 células. **E** – padrão 4: cordões de células tumorais infiltrando o tecido conjuntivo. **F** – padrão 4: invasão em células únicas. **G** – padrão 4 – pequenas ilhas com menos de 15 células. **H** – padrão 5 – ilha(s) tumoral (is) com mais de 1 mm de tecido sadio em todo seu redor. (Fonte: BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2005).

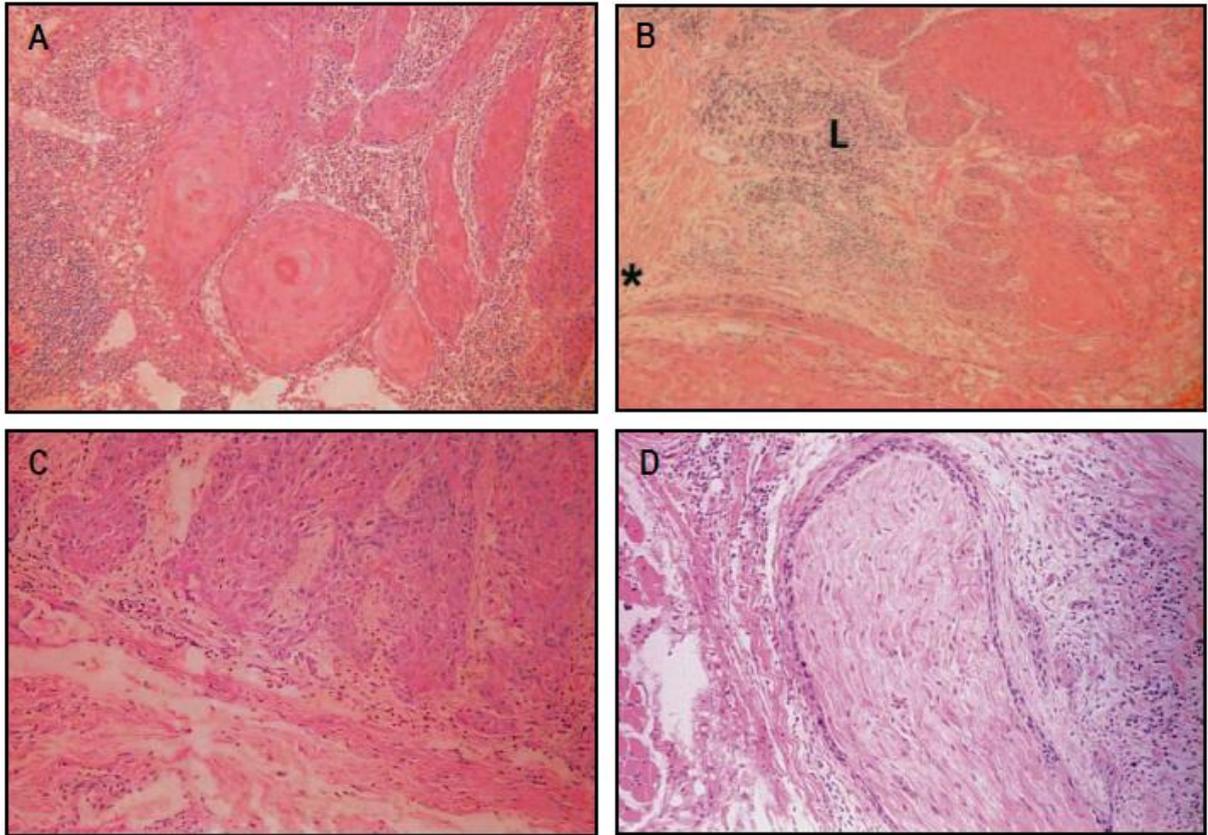


Figura 3.3: Infiltrado linfocitário e invasão perineural. **A** – padrão 1: tecido linfóide contínuo e denso na interface. **B**- padrão 2: agregados de infiltrado linfóide presente na interface (L), mas o infiltrado se mostrava descontínuo (*). **C** – padrão 3: resposta linfocitária limitada, sem a formação de agregados linfóides. **D** - Invasão perineural de um nervo grande (maior do que 1 mm). (Fonte: BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2005).

3.3.5 Análise histopatológica dos linfonodos cervicais

Todos os linfonodos provenientes do esvaziamento cervical também foram reavaliados histopatologicamente quanto a infiltração de células epiteliais malignas.

A partir dos dados fornecidos pelos prontuários relacionados ao acometimento de linfonodos (pN), a avaliação histopatológica de rotina realizada pela DIPAT e da reavaliação histopatológica em HE realizada pelo presente estudo, quanto à presença ou não de metástases, realizou-se uma primeira divisão da população do estudo:

- Pacientes com CCE em língua e/ou assoalho de boca sem metástases em linfonodos cervicais;
- Pacientes com CCE em língua e/ou assoalho de boca com metástases em linfonodos cervicais diagnosticados pela reavaliação histopatológica através dos recortes semi-seriados corados em HE;

3.4 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

3.4.1 Pan-citoqueratina AE1/AE3

Os linfonodos foram avaliados quanto a positividade ou não para pan-CK AE1/AE3 de células epiteliais que caracterizassem presença de metástases ou micrometástases nos tecidos. A classificação Union for International Cancer Control (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004) define micrometástase como um depósito de tumor que está entre 0,2mm e 2,0mm, sendo macrometástase depósitos de células epiteliais malignas maiores que 2,0mm. Após avaliação imuno-histoquímica foi realizada a divisão final dos grupos:

- Pacientes com CCE em língua e/ou assoalho de boca sem metástases em linfonodos cervicais (pN0)
- Pacientes com CCE em língua e/ou assoalho de boca com metástases em linfonodos cervicais (pN+)

3.4.2 Podoplanina (D2-40)

A avaliação do anticorpo anti-podoplanina foi realizada por meio da densidade linfática de área *hot spot* (maior quantidade de vasos imunomarcados). Foram selecionadas cinco áreas de maior quantidade de vasos linfáticos intratumorais e cinco áreas de maior quantidade de vasos linfáticos peritumorais, esses campos foram capturados com a objetiva de 20x. A contagem dos vasos linfáticos imunomarcados nos campos previamente capturados, foi realizada em análise independente por três observadores.

A soma dos vasos linfáticos intratumorais e peritumorais dividida pela área do campo (1,84 mm²) foi considerada, para estabelecer a densidade linfática. Em casos de discrepância entre as análises, casos em que dois observadores encontraram o

mesmo valor, esse dado prevaleceu, contudo quando houve discrepância entre os 3 observadores o caso foi reavaliado para estabelecimento de um consenso.

Foi analisada a densidade linfática tumoral, a densidade linfática intratumoral e a densidade linfática peritumoral correlacionando-as com os dados sociodemográficos, clinicopatológicos e com as informações de sobrevida global e sobrevida livre de doença.

Fórmula base utilizada:

OBJETIVA DE 20x

$$\frac{IT1 + IT2 + IT3 + IT4 + IT5}{A1 + A2 + A3 + A4 + A5}$$

OBJETIVA DE 20x

$$\frac{PT1 + PT2 + PT3 + PT4 + PT5}{A1 + A2 + A3 + A4 + A5}$$

$$\frac{15 + 15 + 12 + 11 + 11}{5 \times 0,367} = \frac{64}{1.84 \text{ mm}^2} = \mathbf{34.8 \text{ vasos/mm}^2}$$

Legenda: IT (Intratumoral); PT (Peritumoral) e A (Área)

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os registros das informações clínicas e microscópicas dos pacientes com CCE de língua e/ou assoalho foram armazenados em um banco de dados elaborado em planilha do Microsoft Excel. A análise estatística utilizou o software STATA (Stata Statistical Software), versão 12.0.

3.5.1 Associação das variáveis

Para avaliar a diferença entre as frequências das variáveis clínicas e microscópicas realizou-se o teste exato de Fisher ou o teste do qui-quadrado, com nível de significância igual ou menor que 0,05.

3.5.2 Análise de sobrevida

Para o estudo da sobrevida foram utilizadas as análises de Kaplan-Meier e o teste logrank para comparação das curvas. Foram considerados como *endpoints* para as sobrevidas global, a data de óbito, sendo o tempo de seguimento considerado a partir da data do diagnóstico histopatológico até o evento de interesse e para a sobrevida livre de doença, o evento de interesse foi o surgimento de um novo evento da doença, podendo ser um segundo tumor primário ou uma recidiva. O tempo livre de doença foi considerado a partir da data do tratamento cirúrgico até o surgimento do novo evento.

Os casos em que os eventos de interesse não ocorreram até a data da última consulta foram classificados como “censurados”.

Devido ao pequeno número de pacientes incluído no estudo, não foi realizada análise pelo modelo de Cox.

4 RESULTADOS

4.1 PERFIL DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

Foram coletados os dados sóciodemográficos e clinicopatológicos dos prontuários de 80 pacientes dos anos de 2001, 2002 e 2003 e observou-se que homens (77,5%), brancos (60%), com idade entre 40 e 60 anos (68,8%) foram os mais frequentes. A idade média foi de 59 anos (41-92 anos). Predominaram pacientes analfabetos/com primeiro grau incompleto (65%), tabagistas ou ex-tabagistas (83,7%) e etilistas ou ex-etilistas (82,5%) com tumores exclusivos de língua (67,5%), todos com margens cirúrgicas livres em estadiamento clínico inicial (78,8%) e estadiamento patológico avançado (55%). A maioria dos pacientes não realizou tratamento adjuvante (67,5%) e 45 dos 80 pacientes (56,3%) não havia ido a óbito até o encerramento da coleta de dados (**Tabela 4.1**).

A partir dos laudos histopatológicos relacionados ao acometimento de linfonodos (pN) e da reavaliação histopatológica em HE de todos os linfonodos quanto à presença ou não de metástases cervicais, a população de estudo foi inicialmente dividida da seguinte forma: Grupo pN0 (55 pacientes) e Grupo pN+ (25 pacientes).

Tabela 4.1: Características sociodemográficas e clinicopatológicas dos pacientes (n=80).

Variável	Categoria	(n=80)	
		n	(%)
Sexo	<i>Masculino</i>	62	78%
	<i>Feminino</i>	18	23%
Idade	<i>45 - 60 anos</i>	55	69%
	<i>> 60 anos</i>	25	31%
Cor de pele	<i>Branco</i>	48	60%
	<i>Pardo</i>	22	28%
	<i>Preto</i>	9	11%
	<i>Missing</i>	1	1%
Grau de Escolaridade	<i>Analfabeto/1ºGrau Incompleto</i>	52	65%
	<i>1ºGrau Completo - Superior Completo</i>	27	34%
	<i>Missing</i>	1	1%
Antecedentes Familiares	<i>Sim</i>	15	19%
	<i>Não</i>	63	79%
	<i>Missing</i>	2	2%
Etilismo	<i>Sim / Ex-</i>	66	83%
	<i>Não</i>	12	15%
	<i>Missing</i>	2	2%
Tabagismo	<i>Sim / Ex-</i>	67	84%
	<i>Não</i>	12	15%
	<i>Missing</i>	1	1%
Localização	<i>Língua</i>	54	68%
	<i>Assoalho</i>	17	21%
	<i>Língua/Assoalho</i>	9	11%
cT	<i>T1 - T2</i>	63	79%
	<i>T3 - T4</i>	17	21%
cEstadio	<i>I - II</i>	63	79%
	<i>III - IV</i>	17	21%
pT	<i>T1 - T2</i>	61	76%
	<i>T3 - T4</i>	19	24%
pN	<i>N0</i>	46	58%
	<i>N+</i>	34	42%
pEstádio	<i>I - II</i>	36	45%
	<i>III - IV</i>	44	55%
Radioterapia Adjuvante	<i>Sim</i>	26	32%
	<i>Não</i>	54	68%
Óbito	<i>Não</i>	45	56%
	<i>Sim</i>	35	44%

Cor de pele – 1 caso sem informação; Grau de escolaridade - 1 caso sem informação; Antecedentes - 2 casos sem informação; Etilismo - 2 casos sem informação; Tabagismo - 1 caso sem informação.

4.2 ANÁLISE DOS LINFONODOS CERVICAIS

4.2.1 Caracterização geral dos linfonodos isolados

Todos os 80 pacientes foram submetidos a tratamento primário de ressecção cirúrgica do tumor com esvaziamento cervical. Foram levantadas as informações relacionadas aos linfonodos somente dos níveis I, II e III utilizados no estudo. Foi isolado um total de 2003 linfonodos cervicais dos níveis I a III. O número de linfonodos por paciente variou entre seis e 55 linfonodos, com média de 25 linfonodos por paciente.

4.2.2 Protocolo de recortes semi-seriados

O protocolo de recortes semi-seriados utilizado para investigação de metástases e micrometástases não diagnosticadas pela avaliação histopatológica de rotina do INCA foi aplicado, em blocos de parafina que continham os linfonodos isolados no esvaziamento cervical supra-omo-hioideo (níveis I, II e III) correspondente aos pacientes do grupo inicialmente classificado como SM.

Ao exame histopatológico de rotina do INCA (HE) dos tumores e dos linfonodos cervicais da população do estudo (80 pacientes), 25 (31,3%) foram diagnosticadas como pN+ e 55 (68,7%) como pN0.

Um total de 1383 linfonodos cervicais foram processadas a partir dos 55 casos classificados como pN0 (média de 25 linfonodos cervicais por paciente). Eles foram retirados dos níveis I, II e III do pescoço.

Dentre os pacientes avaliados, nove dos 55 (16,4%), apresentaram doença metastática nos linfonodos cervicais, seis casos de metástase e três casos de micrometástases.

Na primeira avaliação, realizada somente nos recortes em HE, foram encontradas metástases em sete casos. Desses sete casos, apenas um era micrometástase. Os outros dois casos, em que não foi identificada a presença de células epiteliais malignas no HE, somente foram diagnosticados com a utilização da

reação IHQ para o anticorpo anti-pan-CK AE1/AE3 caracterizando casos de micrometástase.

Após essa etapa foi realizada a divisão final dos grupos, os pacientes que apresentaram pan-CK AE1/AE3 positivas foram transferidos para o grupo pN+, dessa forma obtivemos os seguintes grupos finais: (**Figura 4.1**).

- pN0 – 46 pacientes
- pN+ – 34 pacientes

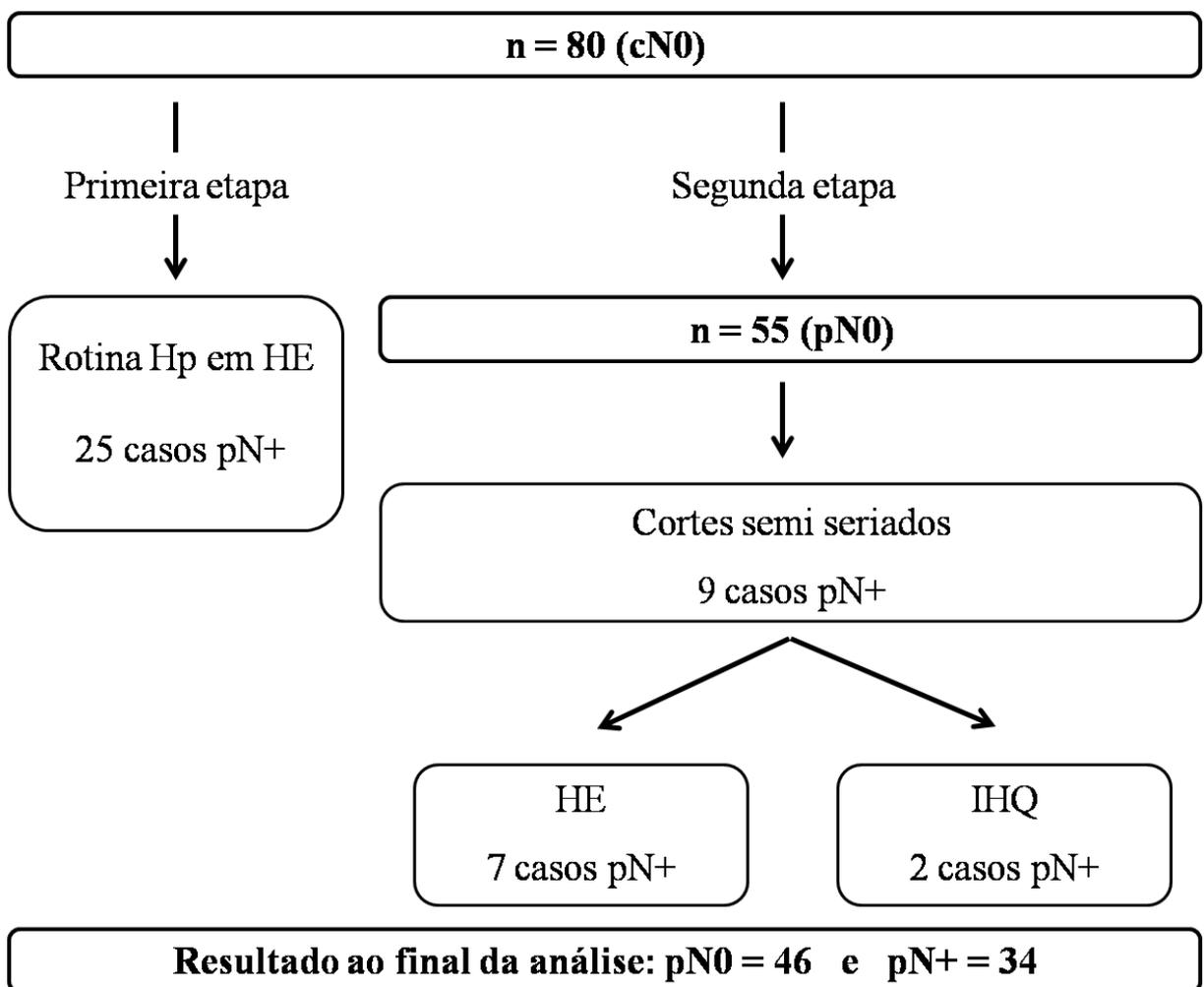


Figura 4.1: Seleção da população de estudo.

Todas as metástases se localizavam em proximidade à cápsula. Os três casos de micrometástases foram identificados somente no primeiro recorte, enquanto que os outros sete casos foram identificados tanto no primeiro quanto no segundo recorte. Em dois desses casos a metástase também foi visualizada no HE de rotina do INCA. Seguem as fotomicrografias do HE e da IHQ para o anticorpo anti-pan-CK AE1/AE3 dos nove casos (**Figura 4.2 a Figura 4.10**).

CASO 1

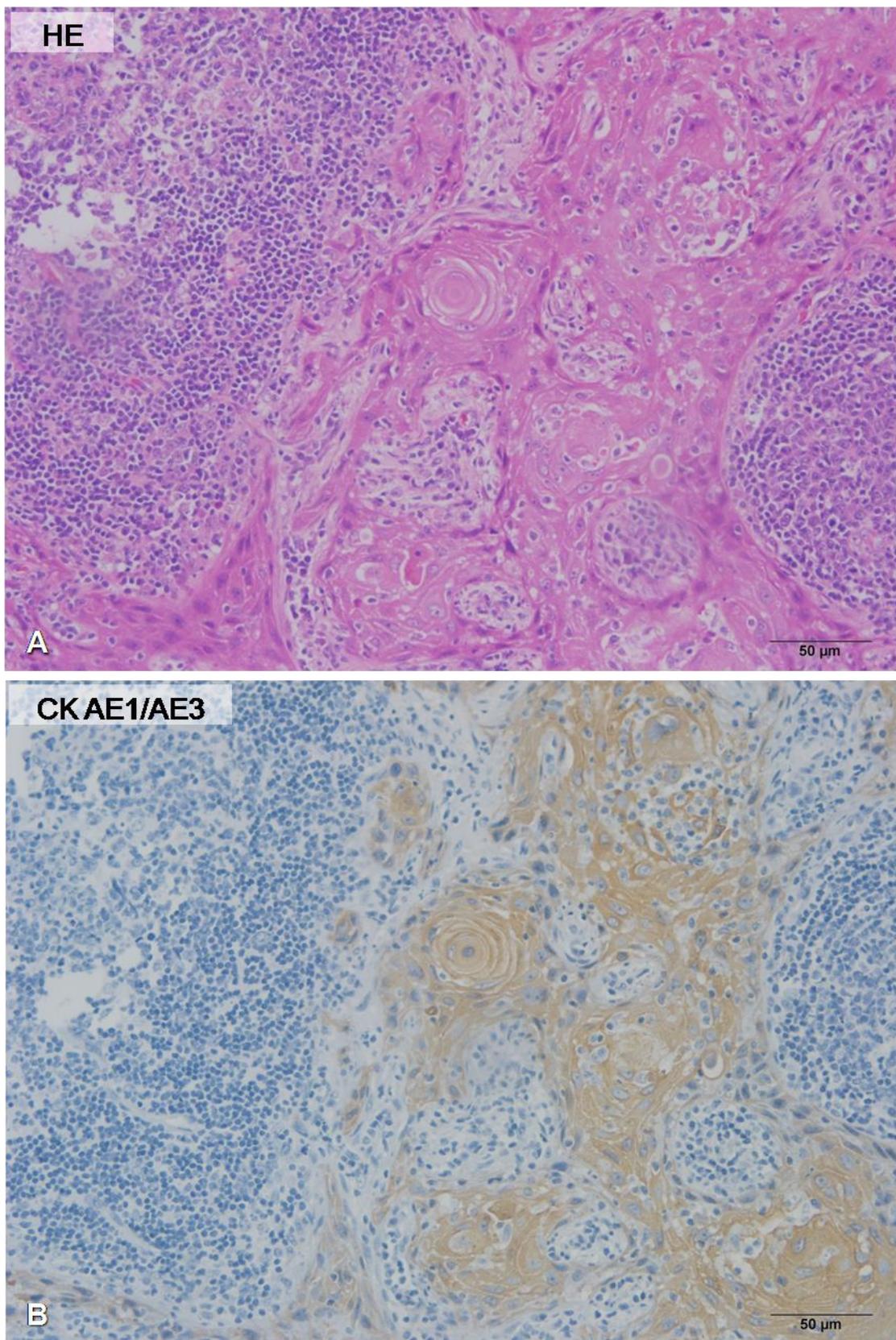


Figura 4.2: Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ. **A e B** – Caso 1. Macrometástase visualizada em HE e em IHQ.

CASO 2

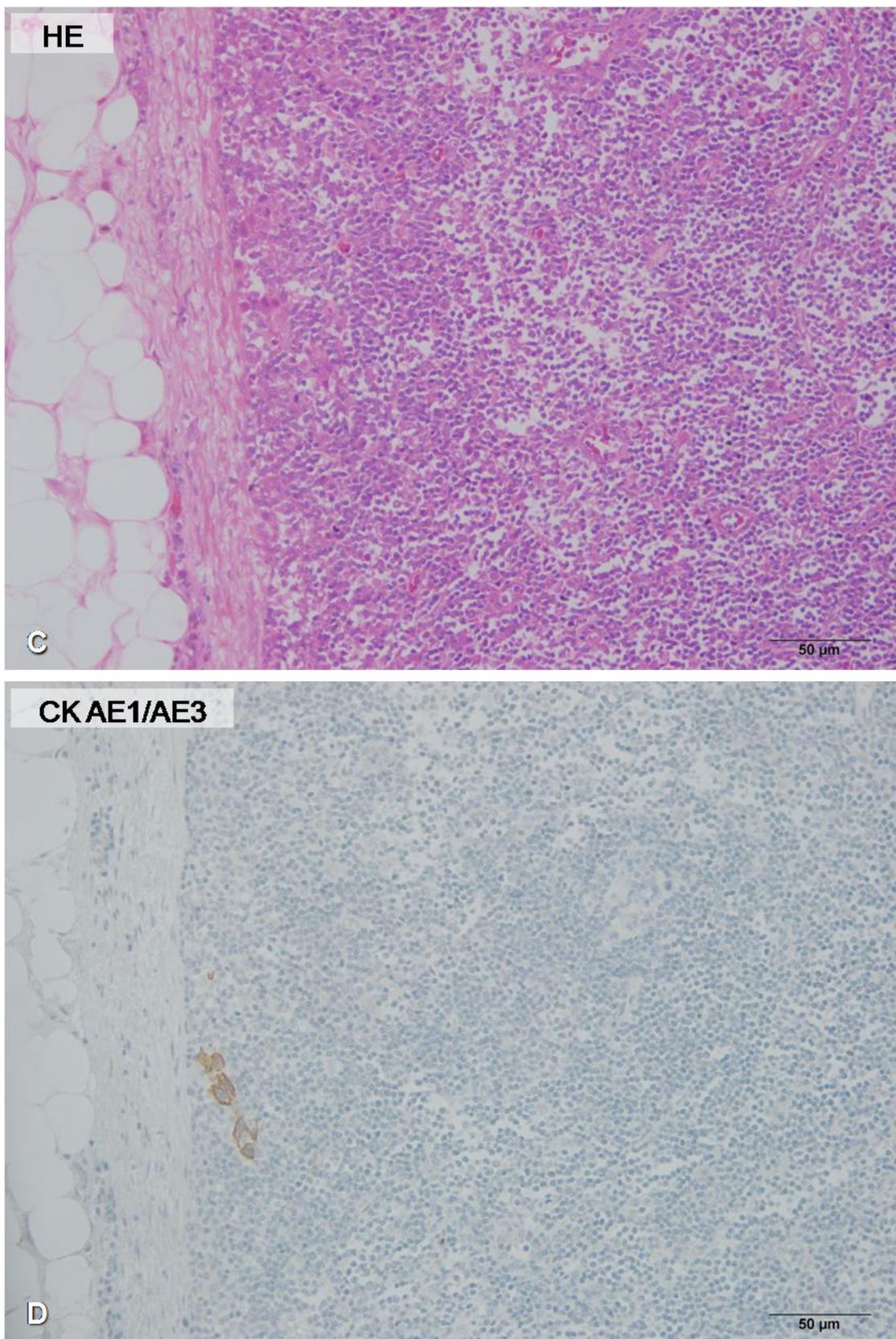


Figura 4.3: Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ. **C e D** – Caso 2. Micrometástase localizada próximo à cápsula fibrosa, visualizada somente em IHQ.

CASO 3

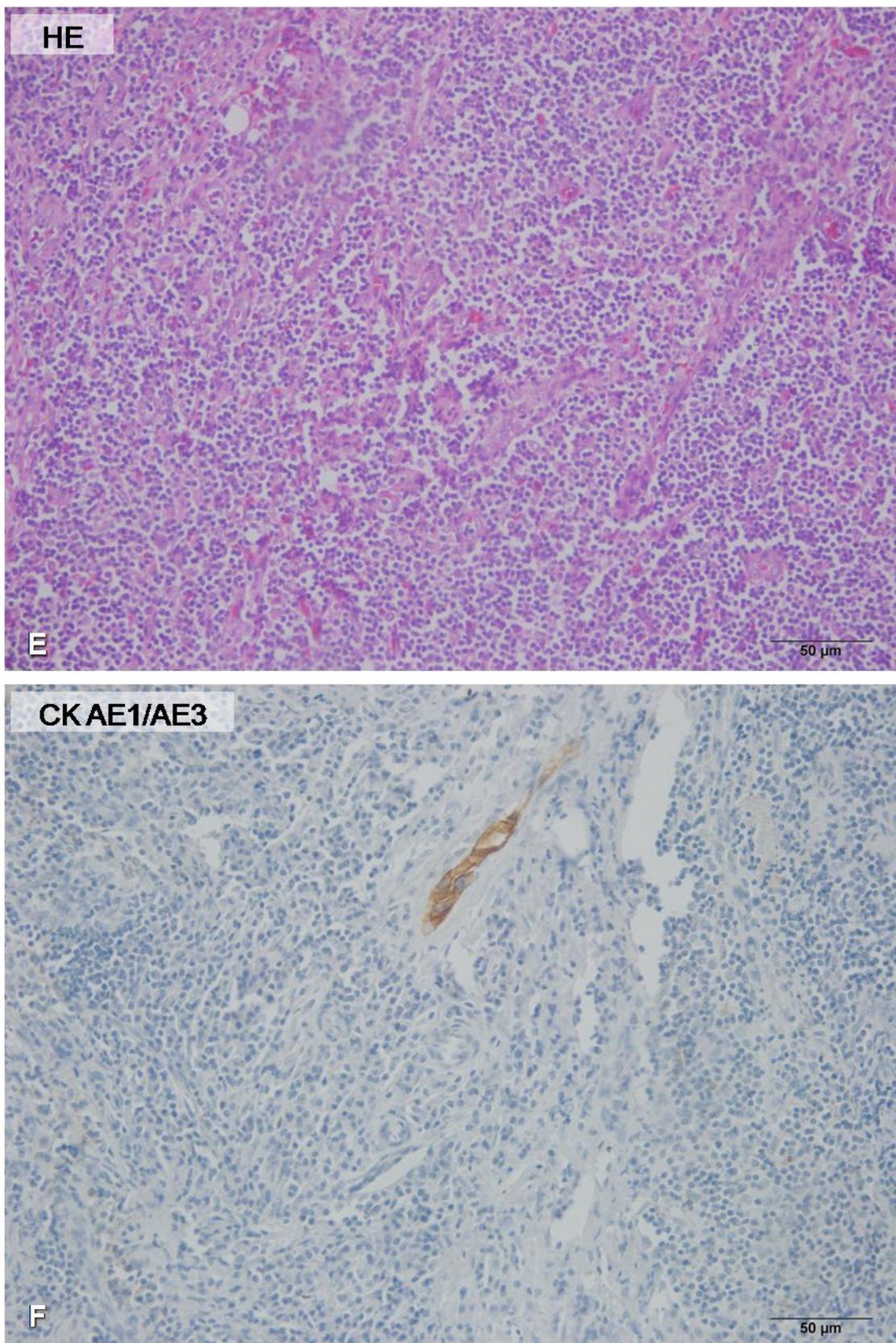


Figura 4.4: Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ. **E e F** – Caso 3. Micrometástase visualizada somente em IHQ.

CASO 4

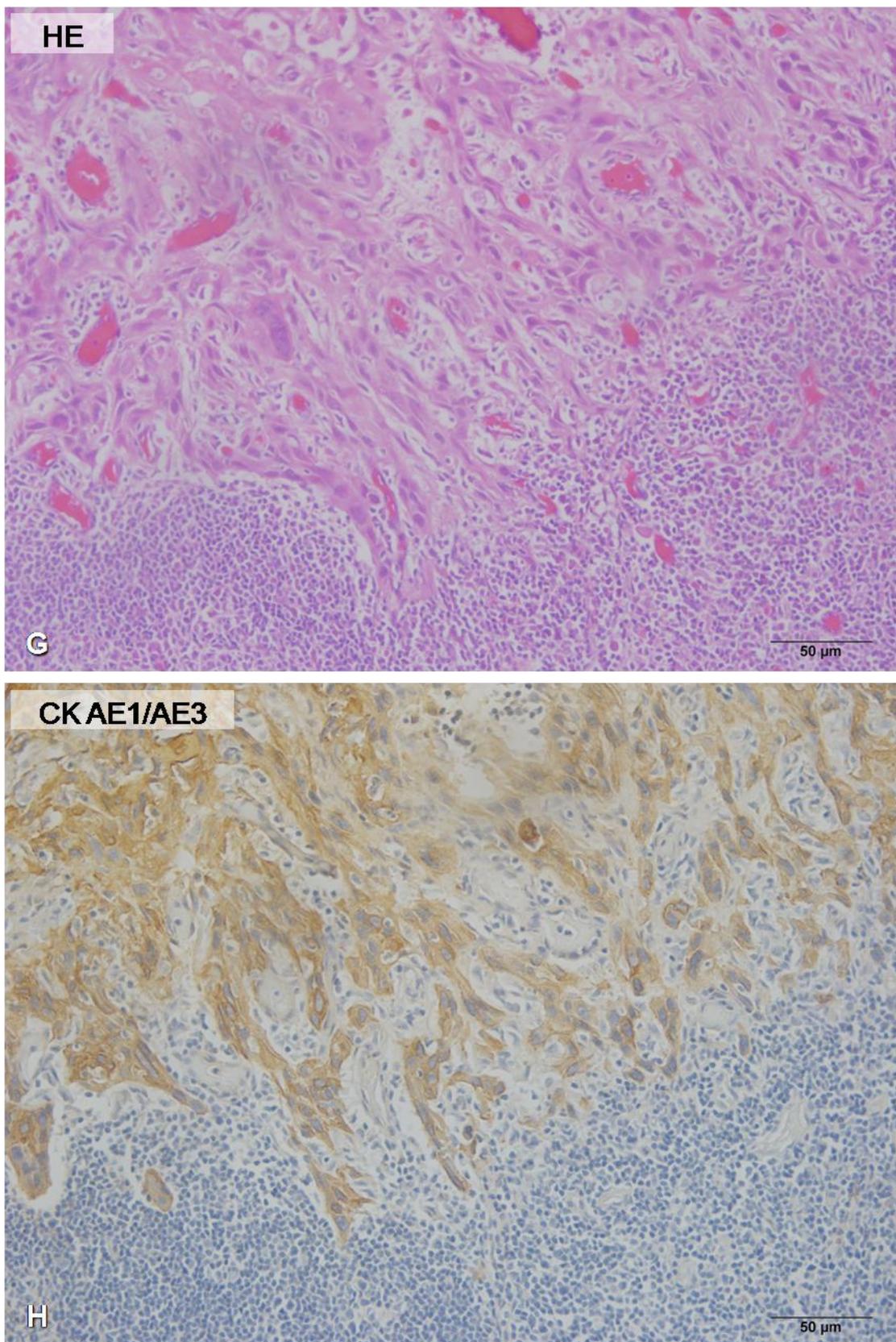


Figura 4.5: Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ. **G e H** – Caso 4. Macrometástase visualizada em HE e em IHQ.

CASO 5

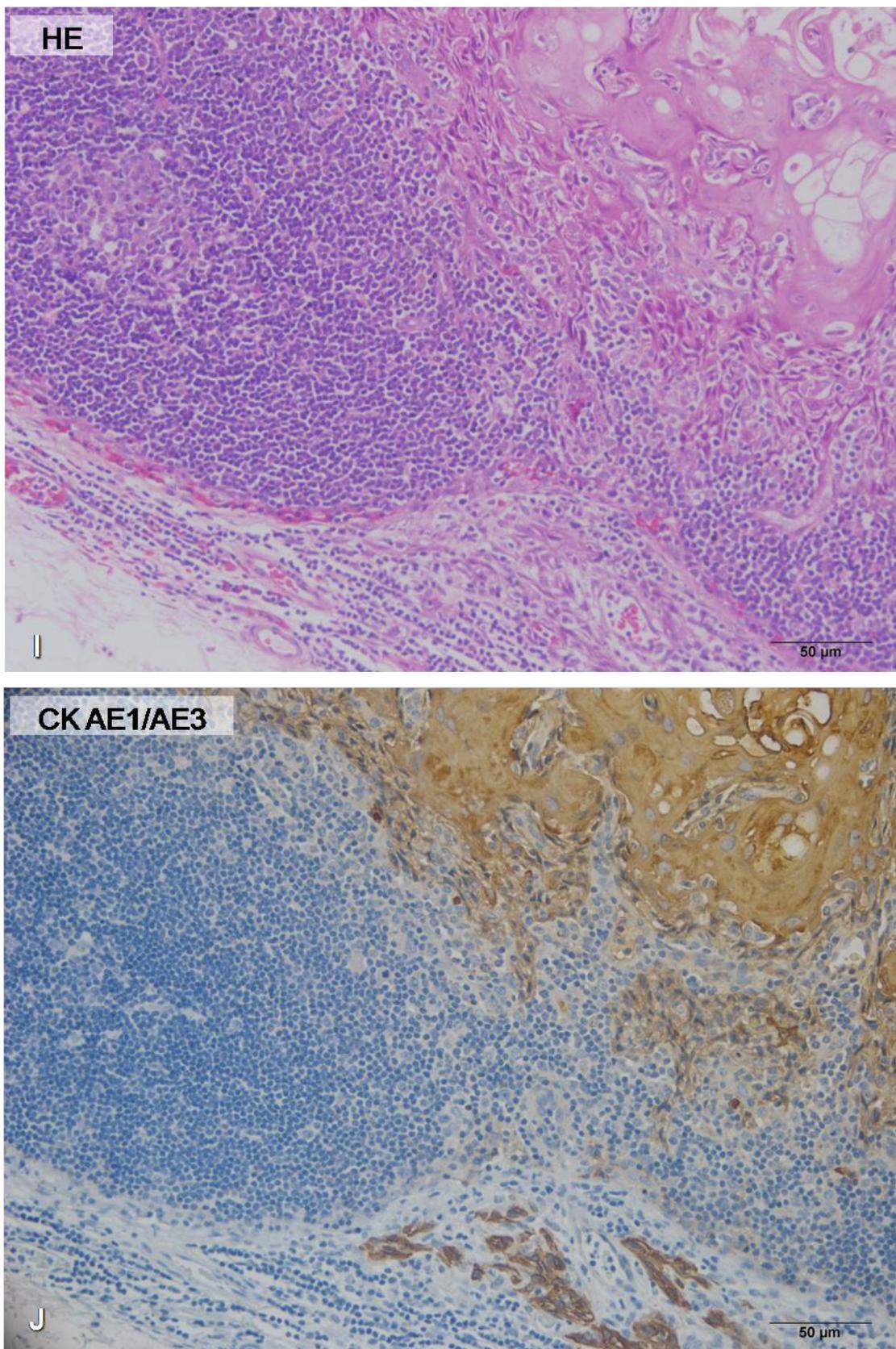


Figura 4.6: Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ. **I e J** – Caso 5. Macrometástase se estendendo para região capsular, visualizada em HE e IHQ.

CASO 6

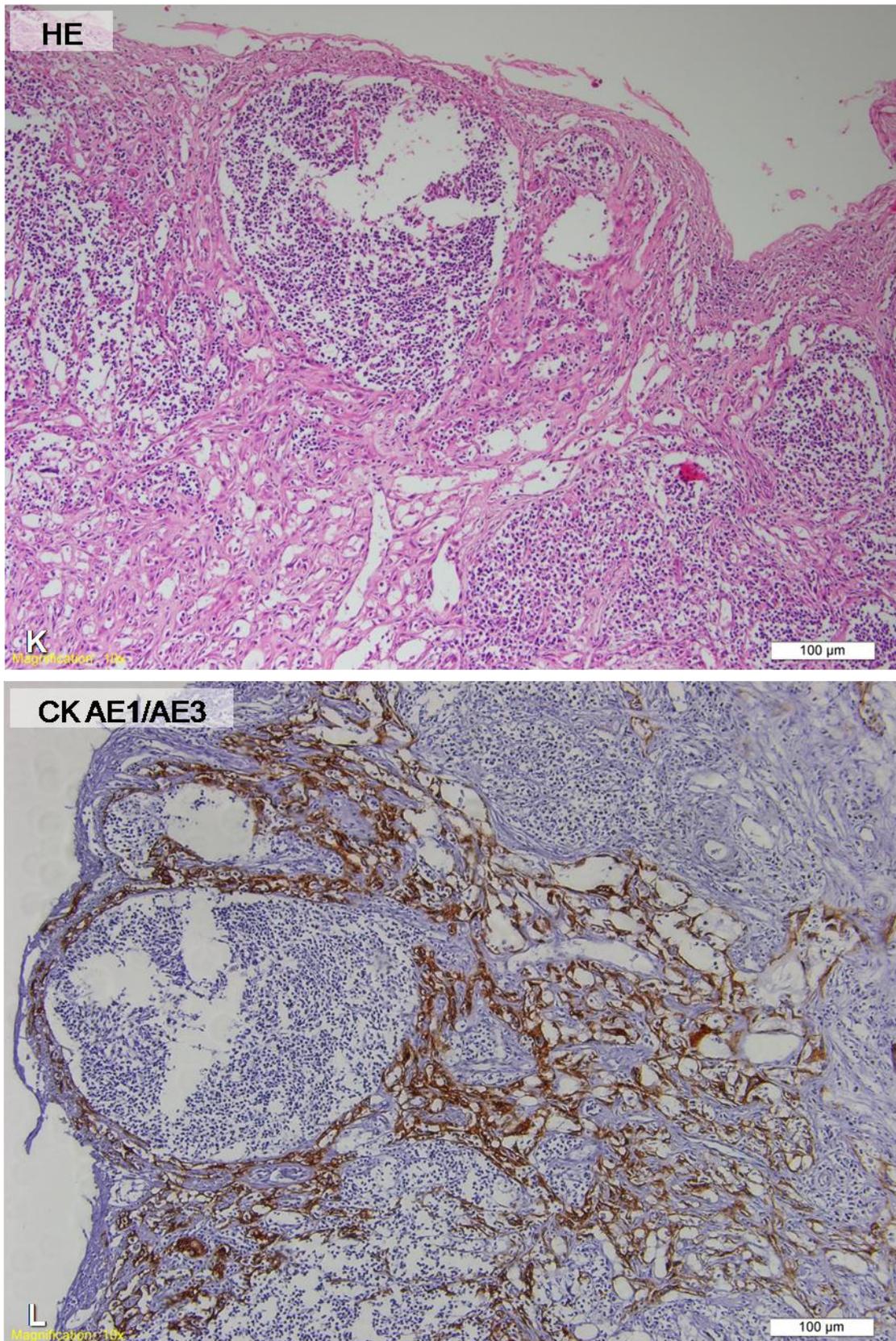


Figura 4.7: Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ. **K e L** – Caso 6. Macrometástase se estendendo para região capsular e envolvendo agregado linfóide, visualizada em HE e IHQ.

CASO 7

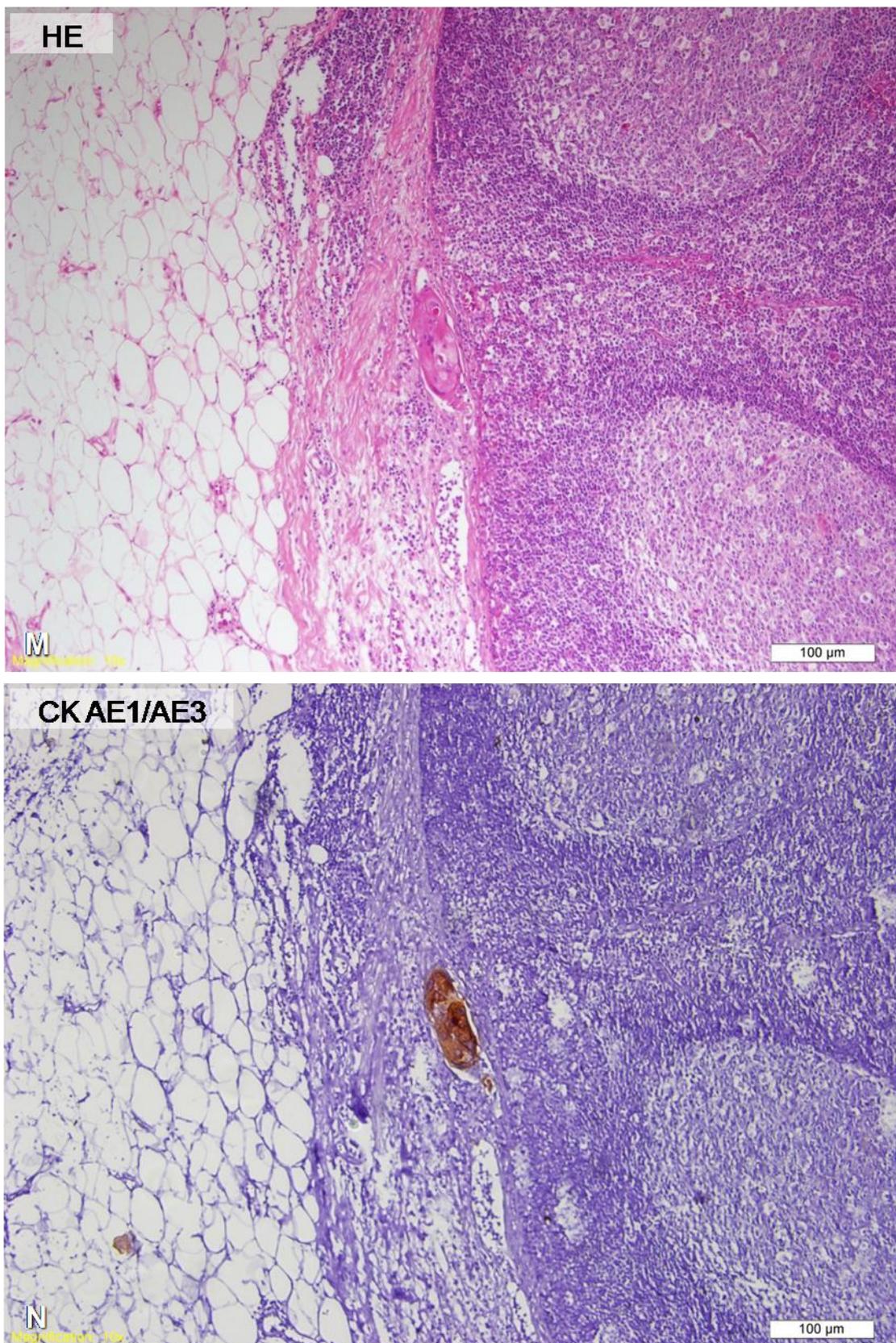


Figura 4.8: Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ. **M e N** – Caso 7. Micrometástase localizada próximo à cápsula fibrosa, visualizada em HE e em IHQ.

CASO 8

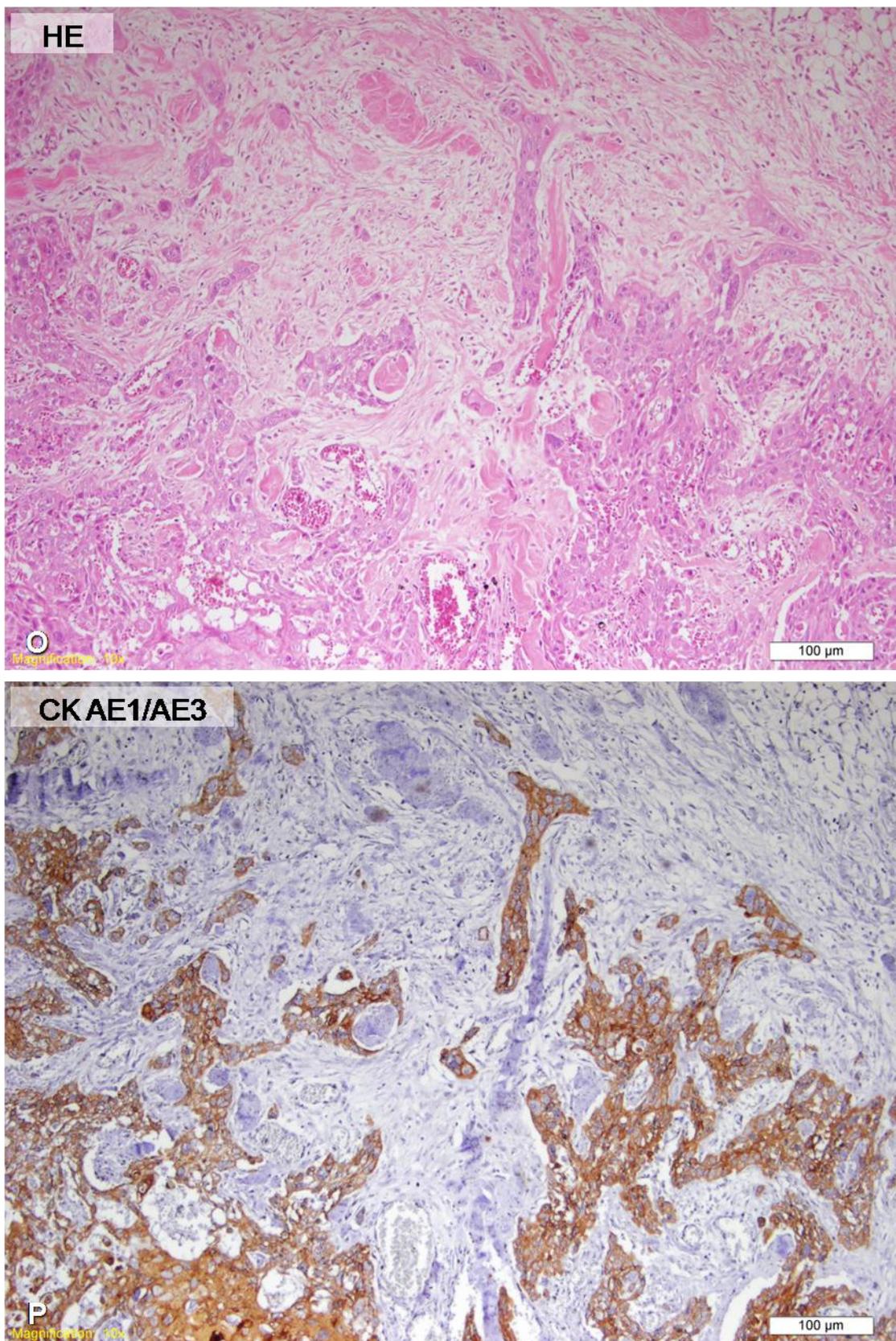


Figura 4.9: Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ. **O e P** – Caso 8. Macrometástase visualizada em HE e em IHQ.

CASO 9

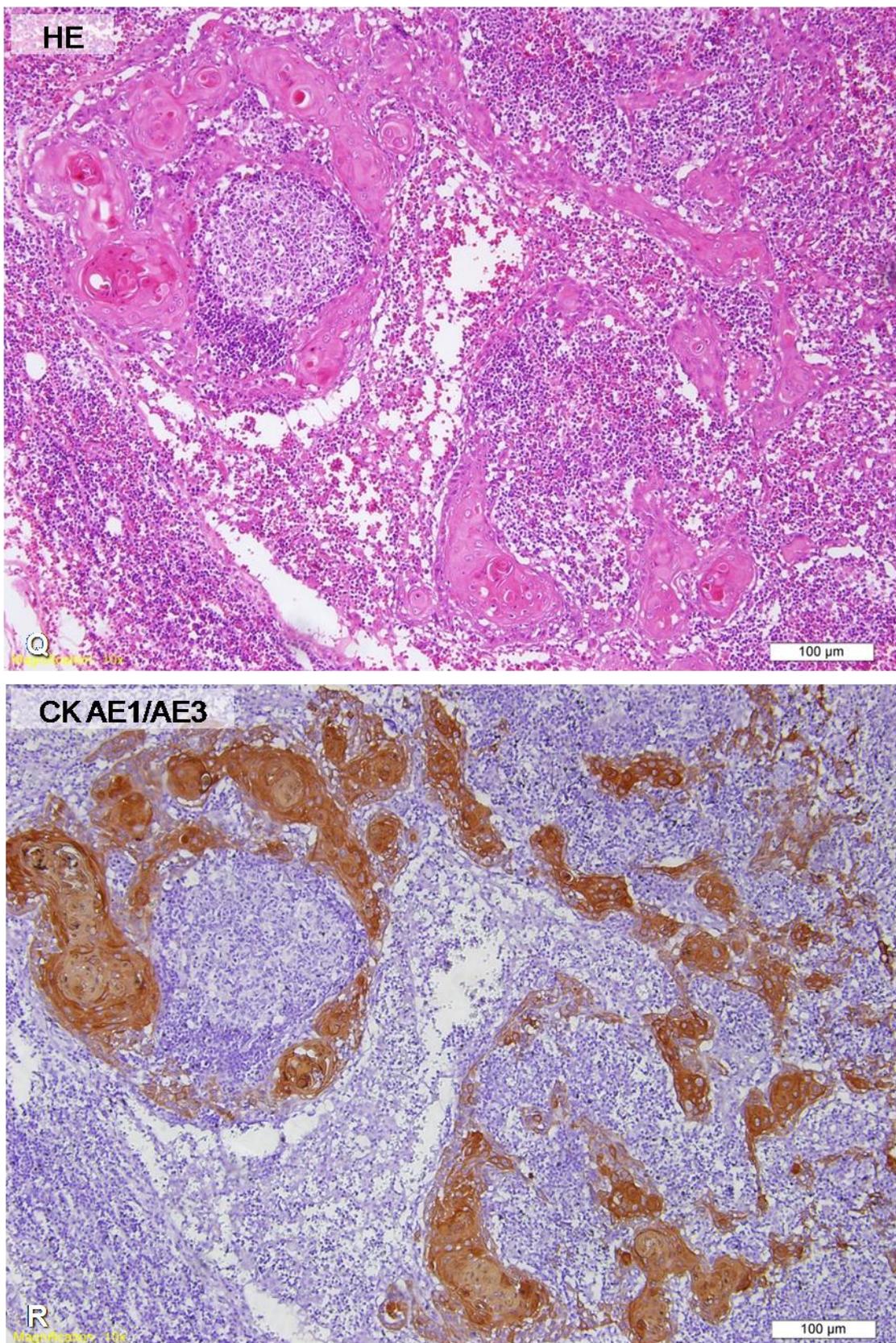


Figura 4.10: Comparação da detecção de metástase linfonodal em HE e IHQ. **Q e R** – Caso 9. Macrometástase envolvendo agregado linfóide, visualizada em HE e IHQ.

A **Tabela 4.2** mostra o perfil desses pacientes com linfonodos positivos para tumor observado nos recortes em HE e para o anticorpo anti-pan-CK AE1AE3 e a **Tabela 4.3** mostra a caracterização anatômica das metástases e micrometástases desses pacientes.

Tabela 4.2: Perfil dos pacientes com linfonodos positivos para o anticorpo anti-pan-CK AE1AE3.

	SEXO	IDADE	LOCAL	ESTADIO CLÍNICO	ESTADIO PATOLÓGICO	TERAPIA ADJUVANTE	RECIDIVA	LOCAL DA RECIDIVA	ÓBITO
1	F	87	Língua	I	II	Não	x	x	Sim
2	M	50	Assoalho de boca	I	II	Não	Regional	Nível I	Sim
3	F	64	Língua	II	II	Não	Regional	Nível II	Sim
4	M	54	Língua	II	II	Radioterapia	x	x	Não
5	F	50	Língua	II	II	Não	x	x	Não
6	M	44	Língua	III	III	Radioterapia	Regional	Nível não especificado	Sim
7	M	53	Língua	II	III	Radioterapia	Local	Assoalho de boca	Sim
8	M	48	Língua	III	III	Radioterapia	Local	Língua	Sim
9	M	65	Língua	II	II	Não	x	x	Não

F - Feminino M - Masculino x. ausência de recidiva

Tabela 4.3: Caracterização anatômica das metástases ocultas

	METÁSTASE	NÍVEL
1	Macrometástase	Nível II
2	Micrometástase	Nível III
3	Micrometástase	Nível I
4	Macrometástase	Nível III
5	Macrometástase	Nível II
6	Macrometástase	Nível III
7	Micrometástase	Nível I
8	Macrometástase	Níveis I,II,II *
9	Macrometástase	Nível I e Nível III

* Não especificado exatamente qual o nível acometido

Após a avaliação dos cortes semi-seriados, foram observados sete casos que apresentavam metástases ocultas diagnosticados nas secções em HE, aumentando para 32 (40%) o número de pacientes pN+. Após a avaliação da etapa IHQ foram identificados mais dois casos de micrometástases. Nove (16,4%) dos 55 pacientes estadiados como pN0 pela análise histopatológica de rotina em HE eram casos falso-negativos sendo posteriormente diagnosticados como pN+ após os cortes semi-seriados.

Assim, o total de casos de metástase cervical oculta desde a avaliação clínica inicial (cN0) chegou a 34 pacientes (42,5%) na população estudada. O protocolo de cortes semi-seriados com HE e IHQ para análise de células tumorais nos linfonodos cervicais, aumentou a taxa de detecção de metástases ocultas em **11,3%** (**Tabela 4.4**).

Tabela 4.4: Métodos de detecção de metástase oculta.

	Linfonodos negativos	Linfonodos positivos	Total
Rotina Histopatológica em HE	55 (68,8%)	25 (31,2%)	80 (100%)
Cortes Semi-seriados			
<i>Hematoxilina e eosina (HE)</i>	48 (60%)	32 (40%)	80 (100%)
<i>Imuno-histoquímica</i>	46 (57,5%)	34 (42,5%)	80 (100%)

4.3 DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS

A análise dos grupos revelou na distribuição do sexo feminino com a maioria das mulheres não apresentando metástase, foram 11 pacientes (61%) no grupo pN0 e 7 pacientes (39%) no grupo pN+, já no sexo masculino essa proporção foi mais próxima com predomínio de homens no grupo pN0 (57%), houve predomínio do sexo masculino em ambos os grupos. Houve similaridade entre os grupos, quanto à faixa etária (pacientes entre 45 e 60 anos), cor de pele branca, sem antecedentes de câncer na família. A maioria dos pacientes de ambos os grupos foi composta por tabagistas/ex-tabagistas (pN0 = 60%; pN+ = 40%) e etilistas/ex-etilistas (pN0 = 58%; pN+ = 42%). Do total de pacientes estudados, 37 (46,3%), sendo 20 (25%) pacientes do grupo pN0 e 17 (21,3%) pacientes do grupo pN+ fumavam e bebiam concomitantemente e apenas quatro (5%) do grupo pN0 e cinco (6,3%) do grupo pN+ não possuíam nenhum desses fatores de risco. A informação etilismo estava ausente em um caso. A maioria dos pacientes apresentaram baixo grau de escolaridade, distribuídos de forma similar entre os grupos pN0 e pN+, com relação aos pacientes que apresentavam escolaridade igual ou superior a 1o grau completo, a maioria 17 (63%) não apresentou metástase. Nenhuma das variáveis mostrou significância estatística (**Tabela 4.5**).

Tabela 4.5: Análise descritiva e estatística dos dados sociodemográficos

Parâmetros sociodemográficos		pN0 (n=46)		pN+ (n=34)		P
		n	(%)	n	(%)	
Sexo	<i>Masculino (n=62)</i>	35	57%	27	43%	0,725
	<i>Feminino (n=18)</i>	11	61%	7	39%	
Idade	<i>45 - 60 anos (n=55)</i>	30	55%	25	45%	0,428
	<i>> 60 anos (n=25)</i>	16	64%	9	36%	
Cor de pele	<i>Branco (n=48)</i>	27	56%	21	44%	0,361
	<i>Pardo (n=22)</i>	11	50%	11	50%	
	<i>Preto (n=9)</i>	7	78%	2	22%	
Grau de Escolaridade	<i>Analfabeto/1ºGrau Incompleto (n=52)</i>	28	54%	24	46%	0,438
	<i>1ºGrau completo/Superior Completo (n=27)</i>	17	63%	10	37%	
Antecedentes Familiares	<i>Sim (n=15)</i>	9	60%	6	40%	0,840
	<i>Não (n=63)</i>	36	57%	27	43%	
Etilismo	<i>Sim / Ex- (n=66)</i>	38	58%	28	42%	0,606
	<i>Não (n=12)</i>	6	50%	6	50%	
Tabagismo	<i>Sim / Ex- (n=67)</i>	40	60%	27	40%	0,530
	<i>Não (n=12)</i>	6	50%	6	50%	

4.4 DADOS CLINICOPATOLÓGICOS

Inicialmente, no momento da avaliação e do diagnóstico clínico, a maioria dos pacientes de ambos os grupos apresentou tumores localizados em língua, com distribuição similar entre os grupos pN0 (28 pacientes - 52%) e pN+ (26 pacientes - 48%). Apenas nove (11,3%) pacientes apresentaram tumores que envolviam as duas localizações anatômicas, língua e assoalho de boca. Como o estudo utiliza como critério de inclusão pacientes cN0, a distribuição dos pacientes no cT e cEstadio foram idênticas, sendo o tamanho do tumor o responsável direto pela definição do estadiamento. Houve um predomínio de tumores classificados em estádios clínicos iniciais (I e II), com pequena predileção pelo grupo pN0 (37 pacientes - 59%), mesmo que sem significância estatística. Na população estudada não teve nenhum caso T4, nem estadiamento clínico IV. Essa característica de distribuição se manteve no pT, tendo um discreto aumento de dois casos 17 para 19 tumores classificados como avançados (**Tabela 4.6**).

O estadiamento patológico apresentou mais casos classificados como avançados em relação ao estadiamento clínico. Todos os pacientes incluídos no estudo (n=80) foram classificados como cN0. No estadiamento patológico, 25 pacientes durante avaliação em HE de rotina da DIPAT e os outros nove durante protocolo de investigação de metástase pelo anticorpo anti-pan-CK AE1/AE3 foram diagnosticados pN+. Essa informação nos permite concluir que 34 pacientes (77%) dos casos classificados como estadiamento patológico avançado, apresentavam metástase oculta, sendo nove (26,5%) desses 34, diagnosticados pelos recortes em HE e pela pan-CK AE1/AE3. Como o estadiamento patológico contempla a informação do comprometimento de linfonodos e essa foi justamente a variável utilizada para separação dos grupos, o valor de $p = 0$ já era esperado. (**Tabela 4.6**). Não houve detecção de metástases à distância. No grupo pN+, quatro (11,7%) pacientes apresentaram metástase com extravasamento capsular, sendo três casos diagnosticados pela rotina do INCA e um caso diagnosticado após os recortes semi-seriados.

A espessura média dos tumores foram de 1,0 cm, sendo esta medida utilizada como *cutoff*. Tumores que apresentavam espessura inferior a 1,0 cm foram predominantes no grupo pN0 (66%), já tumores com espessura \geq que 1,0 apresentaram distribuição similar entre os grupos (**Tabela 4.6**).

A radioterapia adjuvante foi mais utilizada no grupo pN+, (18 - 69%), quando comparada ao grupo pN0 (8 - 31%). Os pacientes que não foram submetidos a radioterapia adjuvante, a maioria correspondia ao grupo pN0 (38 - 70%). Essa distribuição de frequência se apresentou estatisticamente significativa ($p = 0,001$) (Tabela 4.6).

Tabela 4.6: Análise descritiva e estatística dos dados clinicopatológicos

Parâmetros clinicopatológicos	pN0 (n=46)		pN+ (n=34)		p	
	n	(%)	n	(%)		
Localização	<i>Língua (n=54)</i>	28	52%	26	48%	0,332
	<i>Assoalho (n=17)</i>	12	71%	5	29%	
	<i>Língua/Assoalho (n=9)</i>	6	67%	3	33%	
cT	<i>T1 - T2 (n=63)</i>	37	59%	26	41%	0,668
	<i>T3 - T4 (n=17)</i>	9	53%	8	47%	
cEstadio	<i>I - II (n=63)</i>	37	59%	26	41%	0,668
	<i>III - IV (n=17)</i>	9	53%	8	47%	
pT	<i>T1 - T2 (n=61)</i>	36	59%	25	41%	0,623
	<i>T3 - T4 (n=19)</i>	10	53%	9	47%	
Espessura	<i>até 1,0 (n=38)</i>	25	66%	13	34%	0,137
	<i>> 1,0 cm (n=35)</i>	17	49%	18	51%	
Radioterapia adjuvante	<i>Sim (n=26)</i>	8	31%	18	69%	0,001
	<i>Não (n=54)</i>	38	70%	16	30%	

4.5 DADOS DE SEGUIMENTO

O tempo médio de seguimento dos pacientes após o tratamento cirúrgico foi de 58 (0,1–148,3) meses, sendo 60,6 (0,1–148,3) e 54,4 (5,6-141,4) meses nos grupos pN0 e pN+, respectivamente. Houve maior registro de recidiva no grupo pN0 (11 casos - 61%) quando comparado ao grupo pN+ (sete - 39%). Desses 18 casos de recidiva, sete foram recidivas locais e 11 recidivas regionais. Houve 13 casos de segundo tumor primário, 11 casos (85%) no grupo pN0 e apenas dois casos (15%) no grupo pN+, Essa frequência apresentou associação estatisticamente significativa ($p = 0,031$).

Do total de pacientes que evoluíram para óbito, 17 (49%) eram do grupo pN0 e 18 (51%) do grupo pN+ (**Tabela 4.7**), o óbito foi registrado e ocorreu entre 9 e 125 meses no grupo pN0 e 1 e 148 meses no grupo pN+.

Tabela 4.7: Análise descritiva e estatística do acompanhamento dos pacientes e distribuição dos casos de recidiva e segundo tumor primário.

Dados de seguimento		pN0 (n=46)		pN+ (n=34)		p
		N	(%)	N	(%)	
Recidiva	<i>Não (n=62)</i>	35	57%	27	44%	0,725
	<i>Sim (n=18)</i>	11	61%	7	39%	
STP	<i>Não (n=67)</i>	35	52%	32	48%	0,031
	<i>Sim (n=13)</i>	11	85%	2	15%	
Óbito	<i>Não (n=45)</i>	29	64%	16	36%	0,154
	<i>Sim (n=35)</i>	17	49%	18	51%	

STP - Segundo tumor primário

4.6 DADOS DAS GRADAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS

Dos casos estudados em ambos os grupos, a maioria (59 - 73,8%) foi graduada como moderadamente diferenciado, após aplicação da Classificação da OMS (**Figura 4.11**).

De acordo com os critérios da AHR, foram avaliados o pior padrão de invasão (**Figura 4.12**), a invasão perineural (**Figura 4.1**) e o infiltrado linfocitário (**Figura 4.14**), primeiro individualmente e depois agrupados na classificação. Na análise individual desses critérios histopatológicos, observou-se que o padrão de invasão tumoral dos tipos 2 e 3 praticamente se limitaram ao grupo pN0, enquanto que o padrão tipo 4 se distribuiu de forma similar entre os grupos, correspondendo a quase totalidade dos tumores do grupo pN+, essa distribuição de frequência apresentou associação estatisticamente significativa ($p = 0,003$). Não foram observados os padrões 1 e 5. O tipo 2, intermediário de infiltrado linfocitário foi o mais prevalente e juntamente com o padrão 1, contínuo e denso, ocorreu na grande maioria 72 (90%) dos casos. Houve invasão perineural em 23 (62%) e 14 (38%) casos dos grupos pN0 e pN+, respectivamente. A avaliação final da AHR considerou que o grupo pN0 houve maior frequência de baixo risco em 86% dos casos, o risco intermediário e o alto risco para o desenvolvimento de recidiva local, pobre sobrevida total e indicação de radioterapia apresentaram distribuição similar entre os grupos pN0 e pN+ (**Tabela 4.8**).

Tabela 4.8: Análise das gradações histopatológicas da Organização Mundial de Saúde e Avaliação Histopatológica de Risco.

Parâmetros histológicos	pN0 (n=46)		pN+ (n=34)		P	
	n	(%)	n	(%)		
Gradação/OMS	<i>Bem Diferenciado (n=11)</i>	8	73%	3	27%	0,515
	<i>Moderadamente Diferenciado (n=59)</i>	32	54%	27	46%	
	<i>Pouco Diferenciado (n=10)</i>	6	60%	4	40%	
Pior padrão de invasão	<i>2 (n=4)</i>	4	100%	0	0%	0,003
	<i>3 (n=13)</i>	12	92%	1	8%	
	<i>4 (n=63)</i>	30	48%	33	52%	
Infiltrado linfocitário	<i>1; 2 (n=72)</i>	42	58%	30	42%	0,651
	<i>3 (n=8)</i>	4	50%	4	50%	
Invasão perineural	<i>0 (n=43)</i>	23	53%	20	47%	0,434
	<i>1; 2 (n=37)</i>	23	62%	14	38%	
AHR	<i>Baixo Risco (n=7)</i>	6	86%	1	14%	0,267
	<i>Risco Intermediário (n=47)</i>	25	53%	22	47%	
	<i>Alto Risco (n=26)</i>	15	58%	11	43%	

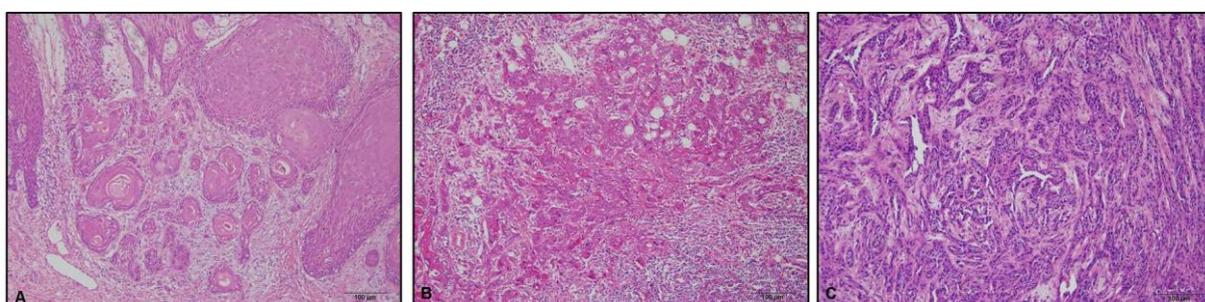


Figura 4.11: Gradação histopatológica da OMS. **A** Bem diferenciado; **B** Moderadamente diferenciado; **C** Pouco diferenciado.

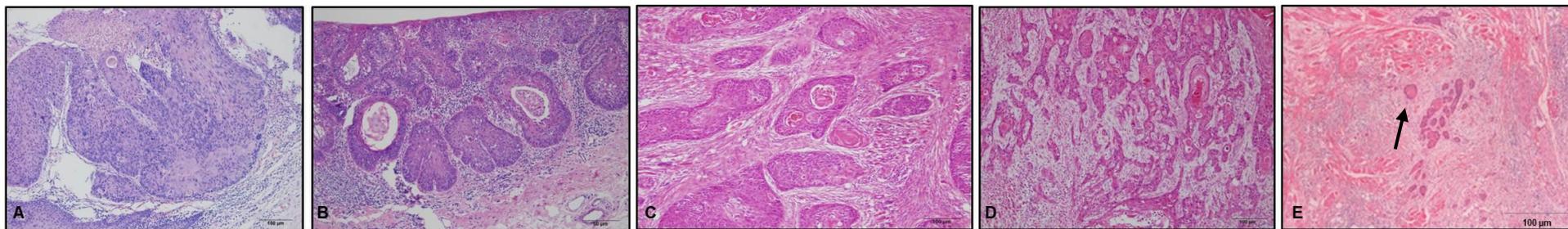


Figura 4.12: Padrão de invasão tumoral. **A** Padrão 1: frente ampla de invasão; **B** Padrão 2: padrão “semelhante a dedos”; **C** Padrão 3: ilhas na periferia tumoral com mais de 15 células; **D** Padrão 4: pequenas ilhas com menos de 15 células; **E** Padrão 5: ilha tumoral com mais de 1 mm de tecido sadio em todo seu redor.

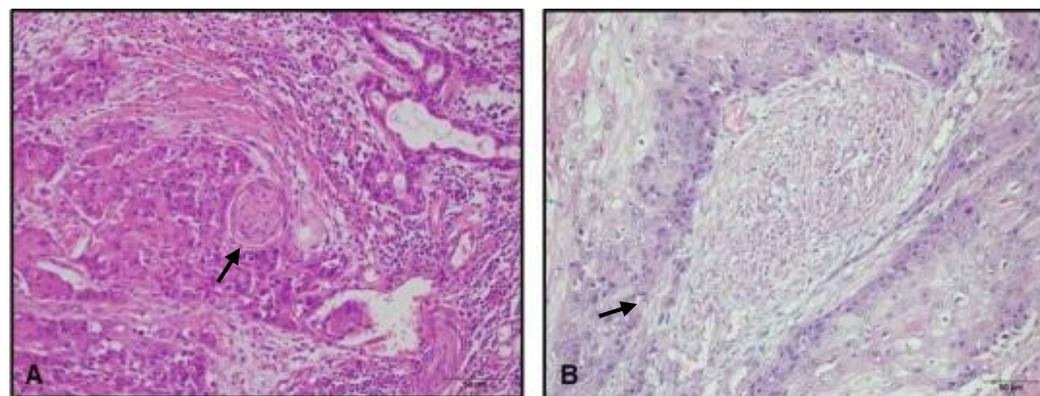


Figura 4.13: Invasão perineural. **A** Invasão de pequenos nervos; **B** Invasão de grandes nervos.

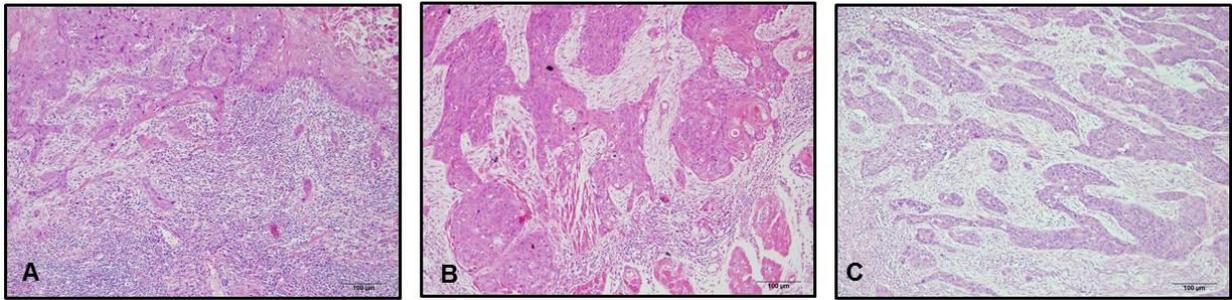


Figura 4.14: Infiltrado linfocitário. **A** Padrão 1: rima densa e contínua em toda a interface tumor-hospedeiro; **B** Padrão 2: há pelo menos um agregado linfocitário. Observam-se áreas tumorais com e sem a presença de infiltrado linfocitário; **C** Padrão 3: pouco ou nenhum infiltrado. Não são observados agregados linfocitários.

4.7 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA PODOPLANINA (D2-40)

4.7.1 Densidade Linfática Intratumoral

A média aritmética da densidade linfática intratumoral avaliada por *hot spot* de todos os espécimes tumorais avaliados foi de 19,18 vasos linfáticos/mm². Para serem analisados, os tumores foram divididos e classificados em baixa densidade linfática intratumoral (<19,18 vasos linfáticos/mm²) e alta densidade linfática intratumoral (\geq 19,18 vasos linfáticos/mm²) (**Figura 4.15**).

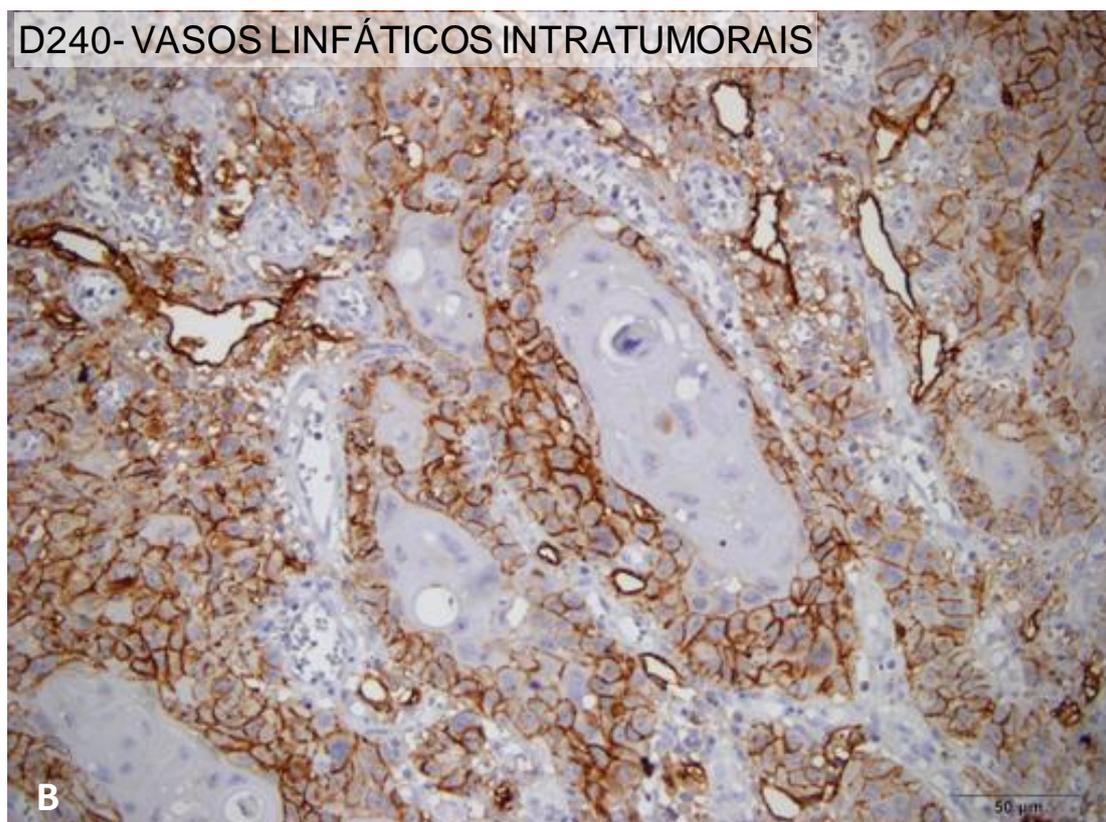
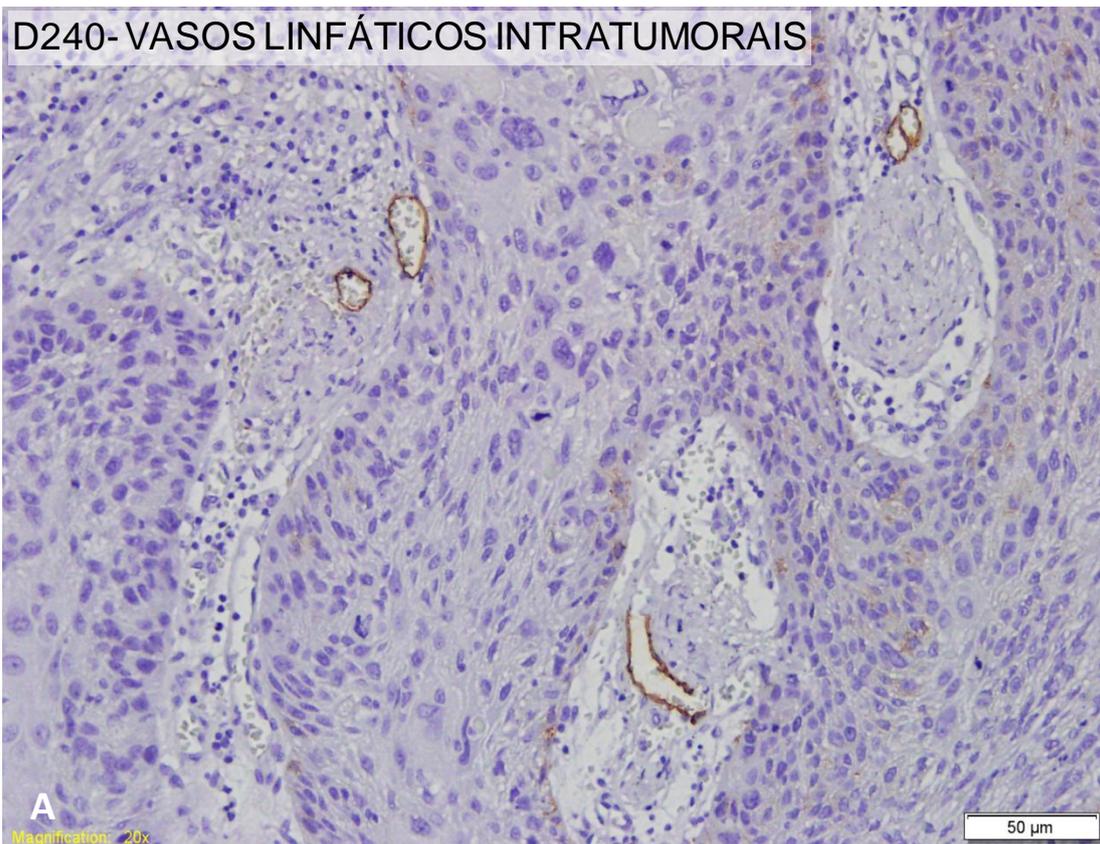


Figura 4.15: Densidade linfática tumoral. **A e B** – Identificação dos vasos linfáticos intratumorais.

A densidade linfática intratumoral não apresentou diferença de frequência estatisticamente significativa com relação aos dados sóciodemográficos, clinicopatológicos (**Tabela 4.9**) e de seguimento. Foi observada diferença estatística significativa da gradação OMS e DLI ($p = 0,012$) (**Tabela 4.10**).

A metástase linfonodal não mostrou diferença de frequência estatisticamente significativa com a densidade linfática intratumoral. Entretanto, em sua maioria, pacientes pN0 apresentaram uma baixa densidade linfática intratumoral (**Tabela 4.9**).

Tabela 4.9: Distribuição da densidade linfática intratumoral em relação as variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas.

Densidade Linfática Intratumoral		BAIXA DLI (n=47)		ALTA DLI (n=33)		P
		N	(%)	n	(%)	
Sexo	Masculino (n=62)	37	60%	33	40%	0,754
	Feminino (n=18)	10	56%	8	44%	
Idade	45 - 60 anos (n=55)	35	64%	20	36%	0,188
	> 60 anos (n=25)	12	48%	13	52%	
Cor de pele	Branco (n=48)	24	50%	24	50%	0,098
	Pardo (n=22)	16	73%	6	27%	
	Preto (n=9)	7	78%	2	22%	
Grau de Escolaridade	Analfabeto/1ºGrau Incompleto (n=52)	29	56%	23	44%	0,539
	1ºGrau completo - Superior Completo (n=27)	17	63%	10	37%	
Antecedentes Familiares	Sim (n=15)	8	53%	7	47%	0,621
	Não (n=63)	38	60%	25	40%	
Etilismo	Sim / Ex- (n=66)	39	59%	27	41%	0,708
	Não (n=12)	7	58%	5	42%	
Tabagismo	Sim / Ex- (n=67)	39	58%	28	42%	0,583
	Não (n=12)	8	67%	4	33%	
Localização	Língua (n=54)	31	57%	23	43%	0,872
	Assoalho (n=17)	10	59%	7	41%	
	Língua/Assoalho (n=9)	6	67%	3	33%	
cT	T1 - T2 (n=63)	34	54%	29	46%	0,094
	T3 - T4 (n=17)	13	76%	4	24%	
cEstadio	I - II (n=63)	34	54%	29	46%	0,094
	III - IV (n=17)	29	76%	4	24%	
pT	T1 - T2 (n=61)	35	57%	26	43%	0,665
	T3 - T4 (n=19)	12	63%	7	37%	
pEstadio	I - II (n=36)	22	61%	14	39%	0,698
	III - IV (n=44)	25	57%	19	43%	
Espessura	até 1,0 (n=38)	19	50%	19	50%	0,175
	> 1,0 cm (n=35)	23	66%	12	34%	
Radioterapia adjuvante	Sim (n=26)	18	69%	8	31%	0,186
	Não (n=54)	29	54%	25	46%	

Tabela 4.10: Distribuição da densidade linfática intratumoral em relação aos dados de seguimento e as gradações histopatológicas.

Densidade Linfática Intratumoral		BAIXA DLI (n=47)		ALTA DLI (n=33)		P
		n	(%)	n	(%)	
Recidiva	<i>Não (n=62)</i>	35	56%	27	44%	0,438
	<i>Sim (n=18)</i>	12	67%	6	33%	
STP	<i>Não (n=67)</i>	38	57%	29	43%	0,402
	<i>Sim (n=13)</i>	9	69%	4	31%	
Óbito	<i>Não (n=45)</i>	24	53%	21	47%	0,264
	<i>Sim (n=35)</i>	23	66%	12	34%	
Gradação/OMS	<i>Bem Diferenciado (n=11)</i>	2	18%	9	82%	0,012
	<i>Moderadamente Diferenciado (n=59)</i>	38	64%	21	36%	
	<i>Pouco Diferenciado (n=10)</i>	7	70%	3	30%	
Pior padrão de invasão	<i>2 (n=4)</i>	2	50%	2	50%	0,852
	<i>3 (n=13)</i>	7	54%	6	46%	
	<i>4 (n=63)</i>	38	60%	25	40%	
Infiltrado linfocitário	<i>1; 2 (n=72)</i>	44	61%	28	39%	0,198
	<i>3 (n=8)</i>	3	38%	5	63%	
Invasão perineural	<i>0 (n=43)</i>	27	63%	16	37%	0,429
	<i>1; 2 (n=37)</i>	20	54%	17	46%	
AHR	<i>Baixo Risco (n=7)</i>	6	86%	1	14%	0,303
	<i>Risco Intermediário (n=47)</i>	27	57%	20	43%	
	<i>Alto Risco (n=26)</i>	14	54%	12	46%	

4.7.2 Densidade Linfática Peritumoral

A média aritmética da densidade linfática peritumoral avaliada por *hot spot* de todos os espécimes tumorais avaliados foi de 20,71 vasos linfáticos/mm². Para serem analisados, os tumores foram divididos e classificados em baixa densidade linfática peritumoral (<20,71 vasos linfáticos/mm²) e alta densidade linfática peritumoral (≥20,71 vasos linfáticos/mm²) (**Figura 4.16**) .

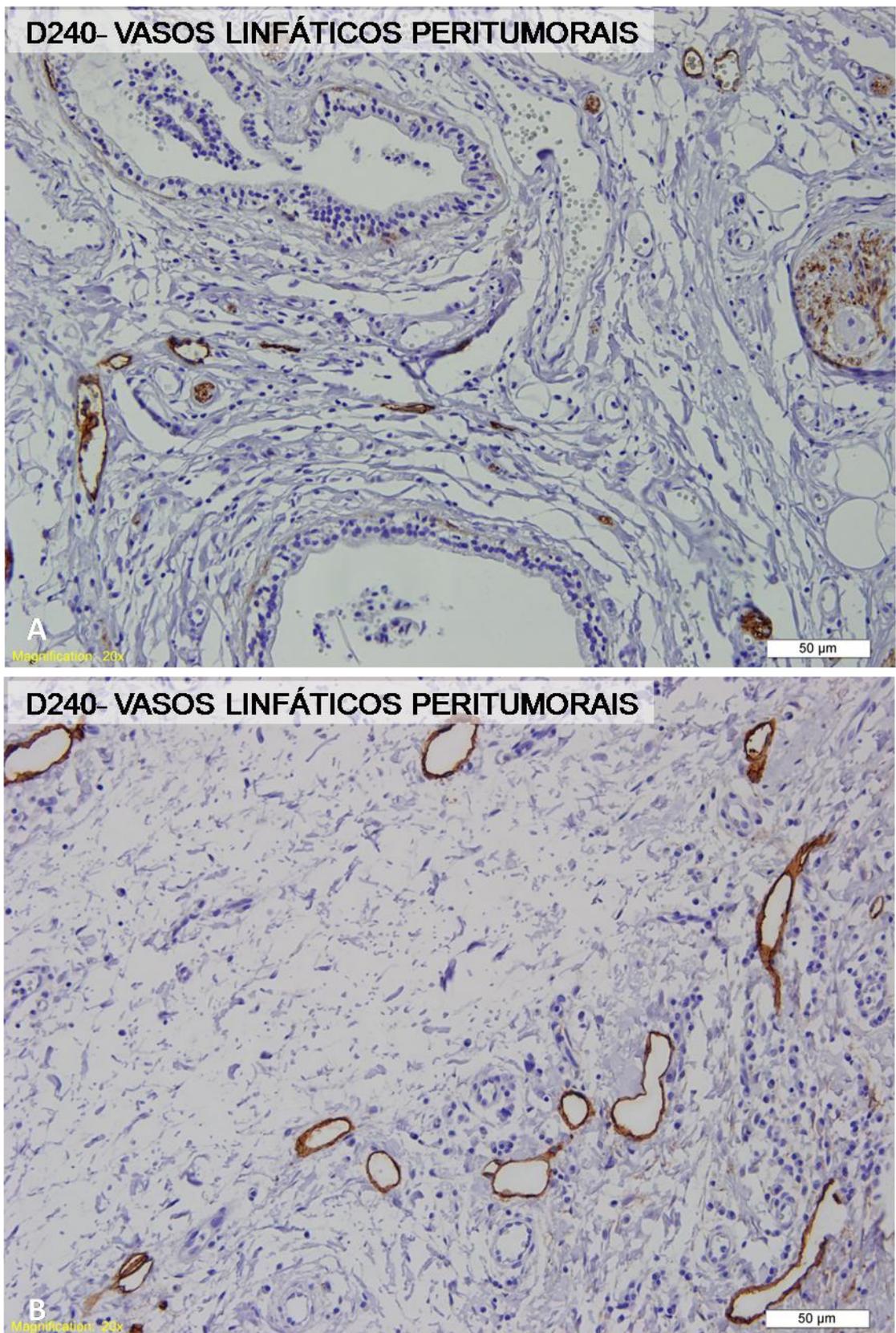


Figura 4.16: Densidade linfática tumoral. **A e B** – Identificação dos vasos linfáticos peritumorais.

A densidade linfática peritumoral apresentou diferença na frequência estatisticamente significativa para cT ($p = 0,026$), cEstadio ($p = 0,026$) e pT ($p = 0,034$) (**Tabela 4.11**). As demais variáveis sócio-demográficas, clinicopatológicas, de seguimento e as gradações histopatológicas não apresentaram diferença na frequência significativa (**Tabela 4.11 e 4.12**).

A metástase linfonodal não mostrou diferença na frequência estatisticamente significativa com a densidade linfática peritumoral. Entretanto, em sua maioria, pacientes pN0 apresentaram uma baixa densidade linfática peritumoral e pacientes pN+ apresentaram alta densidade linfática peritumoral (**Tabela 4.11**).

Tabela 4.11: Distribuição da densidade linfática peritumoral em relação as variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas.

Densidade Linfática Peritumoral		BAIXA DLP (n=42)		ALTA DLP (n=38)		P
		n	(%)	n	(%)	
Sexo	Masculino (n=62)	35	56%	27	44%	0,189
	Feminino (n=18)	7	39%	11	61%	
Idade	45 - 60 anos (n=55)	31	56%	24	44%	0,305
	> 60 anos (n=25)	11	44%	14	56%	
Cor de pele	Branco (n=48)	25	52%	23	48%	0,970
	Pardo (n=22)	12	55%	10	45%	
	Preto (n=9)	5	56%	4	44%	
Grau de Escolaridade	Analfabeto/1º Grau Incompleto (n=52)	25	48%	27	52%	0,345
	1º Grau completo - Superior Completo (n=27)	16	59%	11	41%	
Antecedentes Familiares	Sim (n=15)	9	60%	6	40%	0,521
	Não (n=63)	32	51%	31	49%	
Etilismo	Sim / Ex- (n=66)	37	56%	29	44%	0,223
	Não (n=12)	4	33%	8	67%	
Tabagismo	Sim / Ex- (n=67)	36	54%	31	46%	0,441
	Não (n=12)	5	42%	7	58%	
Localização	Língua (n=54)	25	46%	29	54%	0,060
	Assoalho (n=17)	9	53%	8	47%	
	Língua/Assoalho (n=9)	8	89%	1	11%	
cT	T1 - T2 (n=63)	29	46%	34	54%	0,026
	T3 - T4 (n=17)	13	76%	4	24%	
cEstadio	I - II (n=63)	29	46%	34	54%	0,026
	III - IV (n=17)	13	76%	4	24%	
pT	T1 - T2 (n=61)	28	46%	33	54%	0,034
	T3 - T4 (n=19)	14	74%	5	26%	
pEstadio	I - II (n=36)	18	50%	18	50%	0,685
	III - IV (n=44)	24	55%	20	45%	
Espessura	até 1,0 (n=38)	16	42%	22	58%	0,127
	> 1,0 cm (n=35)	21	60%	14	40%	
Radioterapia adjuvante	Sim (n=26)	14	54%	12	46%	0,867
	Não (n=54)	28	52%	26	48%	

Tabela 4.12: Distribuição da densidade linfática peritumoral em relação aos dados de seguimento e as gradações histopatológicas.

Densidade Linfática Peritumoral		BAIXA DLP (n=42)		ALTA DLP (n=38)		p
		n	(%)	n	(%)	
Recidiva	<i>Não (n=62)</i>	31	50%	31	50%	0,406
	<i>Sim (n=18)</i>	11	61%	7	39%	
STP	<i>Não (n=67)</i>	37	55%	30	45%	0,268
	<i>Sim (n=13)</i>	5	38%	8	62%	
Óbito	<i>Não (n=45)</i>	26	58%	19	42%	0,284
	<i>Sim (n=35)</i>	16	46%	19	54%	
Gradação/OMS	<i>Bem Diferenciado (n=11)</i>	5	45%	6	55%	0,854
	<i>Moderadamente Diferenciado (n=59)</i>	32	54%	27	46%	
	<i>Pouco Diferenciado (n=10)</i>	5	50%	5	50%	
Pior padrão de invasão	<i>2 (n=4)</i>	1	25%	3	75%	0,436
	<i>3 (n=13)</i>	6	46%	7	54%	
Infiltrado linfocitário	<i>4 (n=63)</i>	35	56%	28	44%	0,370
	<i>1; 2 (n=72)</i>	39	54%	33	46%	
Invasão perineural	<i>3 (n=8)</i>	3	38%	5	63%	0,849
	<i>0 (n=43)</i>	23	53%	20	47%	
AHR	<i>1; 2 (n=37)</i>	19	51%	18	49%	0,565
	<i>Baixo Risco (n=7)</i>	3	43%	4	57%	
	<i>Risco Intermediário (n=47)</i>	27	57%	20	43%	
	<i>Alto Risco (n=26)</i>	12	46%	14	54%	

4.7.3 Densidade Vascular Linfática

A densidade vascular linfática apresentou diferença na frequência estatisticamente significativa com a espessura do tumor ($p=0,014$). A sua distribuição comparativa com as demais variáveis sociodemográficas, clinicopatológicas, de seguimento e as gradações histopatológicas não apresentaram diferença na frequência significativas (**Tabela 4.13 e 4.14**).

Tabela 4.13: Distribuição da densidade linfática tumoral em relação as variáveis sociodemográficas e clinicopatológicas.

Densidade Vascular Linfática		BAIXA DVL (n=40)		ALTA DVL (n=40)		p
		n	(%)	n	(%)	
Sexo	Masculino (n=62)	34	55%	28	45%	0,108
	Feminino (n=18)	6	33%	12	67%	
Idade	45 - 60 anos (n=55)	29	53	26	47	0,469
	> 60 anos (n=25)	11	44%	14	56%	
Cor de pele	Branco (n=48)	24	50%	24	50%	0,869
	Pardo (n=22)	12	55%	10	45%	
Grau de Escolaridade	Preto (n=9)	4	44%	5	56%	0,205
	Analfabeto/1º Grau Incompleto (n=52)	23	44%	29	56%	
Antecedentes Familiares	1º Grau completo - Superior Completo (n=27)	16	59%	11	41%	0,774
	Sim (n=15)	8	53%	7	47%	
Etilismo	Não (n=63)	31	49%	32	51%	0,104
	Sim / Ex- (n=66)	36	55%	30	45%	
Tabagismo	Não (n=12)	3	25%	9	75%	0,962
	Sim / Ex- (n=67)	34	51%	33	49%	
Localização	Sim / Ex- (n=67)	6	50%	6	50%	0,508
	Língua (n=54)	25	46%	29	54%	
	Assoalho (n=17)	9	53%	8	47%	
cT	Língua/Assoalho (n=9)	6	67%	3	33%	0,056
	T1 - T2 (n=63)	28	44%	35	56%	
cEstadio	T3 - T4 (n=17)	12	71%	5	29%	0,056
	I - II (n=63)	28	44%	35	56%	
pT	III - IV (n=17)	12	71%	5	29%	0,189
	T1 - T2 (n=61)	28	46%	33	54%	
pEstadio	T3 - T4 (n=19)	12	63%	7	37%	1,000
	I - II (n=36)	18	50%	18	50%	
Espessura	III - IV (n=44)	22	50%	22	50%	0,014
	até 1,0 (n=38)	13	34%	25	66%	
Radioterapia adjuvante	> 1,0 cm (n=35)	22	63%	13	37%	0,633
	Sim (n=26)	14	54%	12	46%	
	Não (n=54)	26	48%	28	52%	

Tabela 4.14: Distribuição da densidade linfática vascular em relação aos dados de seguimento e as gradações histopatológicas.

Densidade Vascular Linfática		BAIXA DVL (n=40)		ALTA DVL (n=40)		p
		n	(%)	n	(%)	
Recidiva	<i>Não (n=62)</i>	29	47%	33	53%	0,284
	<i>Sim (n=18)</i>	11	61%	7	39%	
STP	<i>Não (n=67)</i>	35	52%	32	48%	0,363
	<i>Sim (n=13)</i>	5	38%	8	62%	
Óbito	<i>Não (n=45)</i>	23	51%	22	49%	0,822
	<i>Sim (n=35)</i>	17	49%	18	51%	
Gradação/OMS	<i>Bem Diferenciado (n=11)</i>	2	18%	9	82%	0,071
	<i>Moderadamente Diferenciado (n=59)</i>	33	56%	26	44%	
	<i>Pouco Diferenciado (n=10)</i>	5	50%	5	50%	
Pior padrão de invasão	<i>2 (n=4)</i>	0	0%	4	100%	0,121
	<i>3 (n=13)</i>	7	54%	6	46%	
	<i>4 (n=63)</i>	33	52%	30	48%	
Infiltrado linfocitário	<i>1; 2 (n=72)</i>	37	51%	35	49%	0,456
	<i>3 (n=8)</i>	3	38%	5	63%	
Invasão perineural	<i>0 (n=43)</i>	22	51%	21	49%	0,823
	<i>1; 2 (n=37)</i>	18	49%	19	51%	
AHR	<i>Baixo Risco (n=7)</i>	3	43%	4	57%	0,783
	<i>Risco Intermediário (n=47)</i>	25	53%	22	47%	
	<i>Alto Risco (n=26)</i>	12	46%	14	54%	

4.8 ANÁLISE DE SOBREVIDA

A sobrevida global média da população de estudo foi de 87,78 (IC 74,65-100,92) meses (**Gráfico 4.1**) e a sobrevida livre de doença média foi de 110 (IC 96,07-123,93) meses (**Gráfico 4.2**).

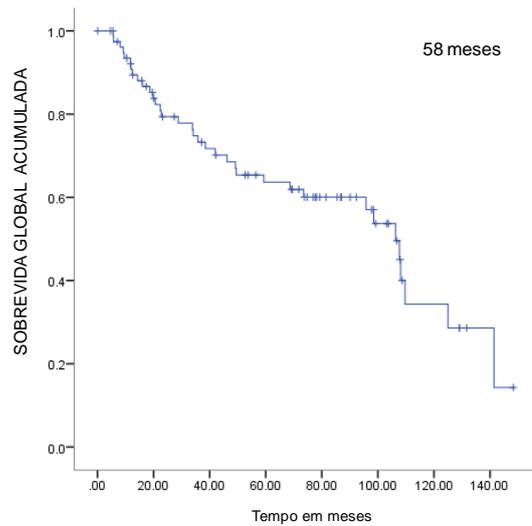


Gráfico 4.1: Curva de Kaplan-Meier para sobrevida global média dos pacientes.

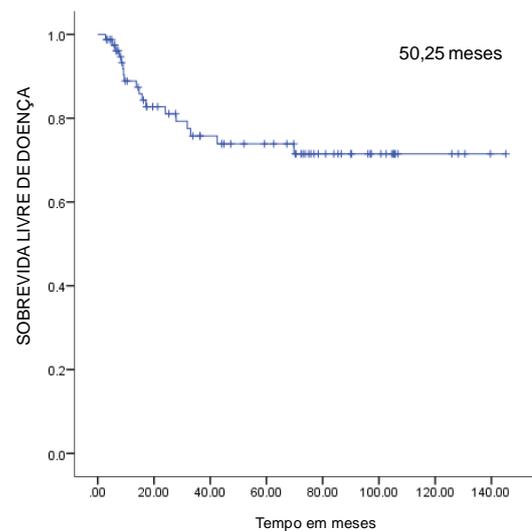


Gráfico 4.2: Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença média dos pacientes.

4.8.1 Metástase Cervical

4.8.1.1 Sobrevida global

A sobrevida global visualizada nos grupos pN0 e pN+ foi de 96,13 (IC 80,05-112,20) meses e 79,42 meses (IC 58,36-100,48), respectivamente. A diferença de sobrevida global entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p = 0,161$) (**Gráfico 4.3**).

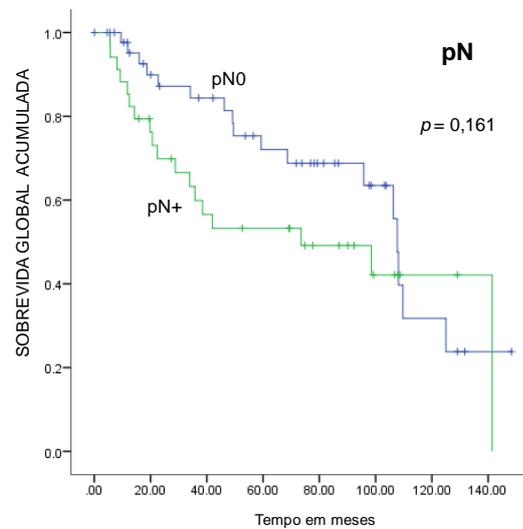


Gráfico 4.3: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global. Variável metástase cervical.

4.8.1.2 Sobrevida livre de doença

A sobrevida livre de doença visualizada nos grupos pN0 e pN+ foi de 109 (IC 90,86-127,14) meses e 107,94 (IC 87,53-128,35) meses, respectivamente. A diferença de sobrevida global entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p = 0,850$) (**Gráfico 4.4**).

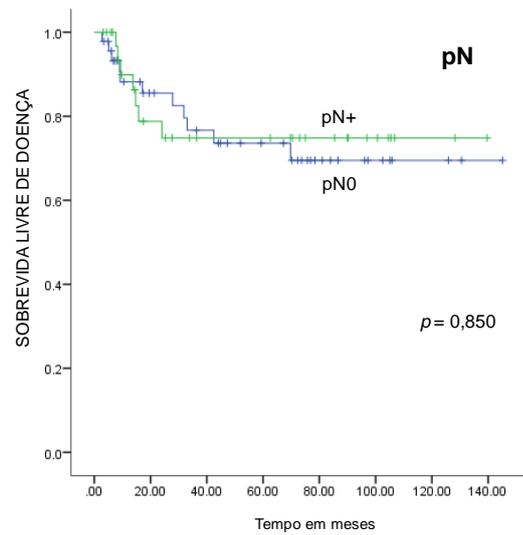


Gráfico 4.4: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença. Variável metástase cervical.

4.8.2 Densidade Vascular Linfática

4.8.2.1 Sobrevida global

A sobrevida global visualizada nos grupos baixa e alta DVL foi de 88,92 (IC 69,30-108,53) meses e 85,80 meses (IC 68,36-103,25), respectivamente. A diferença de sobrevida global entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p = 0,833$) (**Gráfico 4.5**).

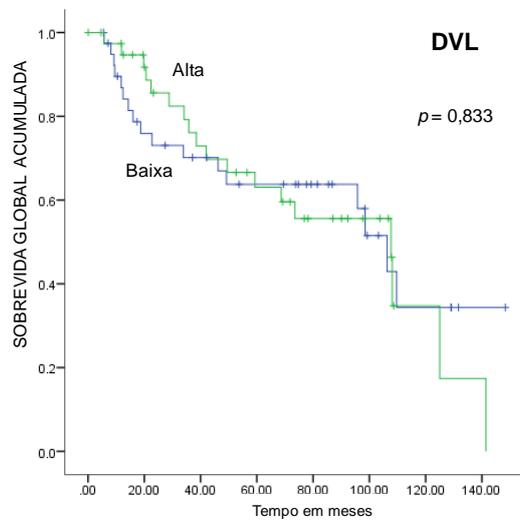


Gráfico 4.5: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global. Variável densidade vascular linfática .

4.8.2.2 Sobrevida livre de doença

A sobrevida livre de doença visualizada nos grupos baixa e alta DVL foi de 103,77 (IC 83,48-124,06) meses e 112,4 (IC 94,52-130,28) meses, respectivamente. A diferença de sobrevida livre de doença entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p = 0,355$) (Gráfico 4.6).

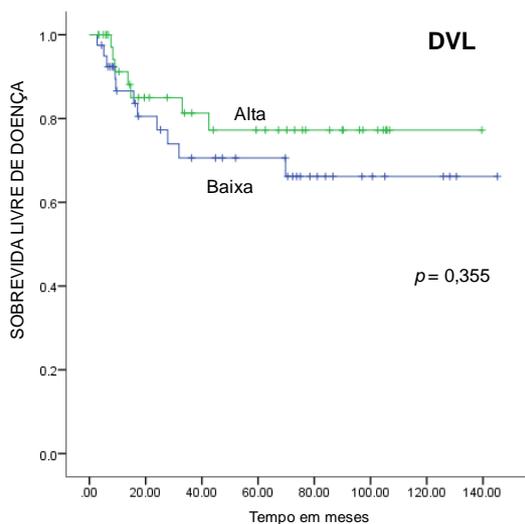


Gráfico 4.6: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença. Variável densidade vascular linfática.

4.8.3 Densidade Linfática Intratumoral

4.8.3.1 Sobrevida global

A sobrevida global visualizada nos grupos baixa e alta DLI foi de 86,29 (IC 69,49-103,08) meses e 86,11 (67,73-104,48) meses, respectivamente. A diferença de sobrevida global entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p = 0,806$) (**Gráfico 4.7**).

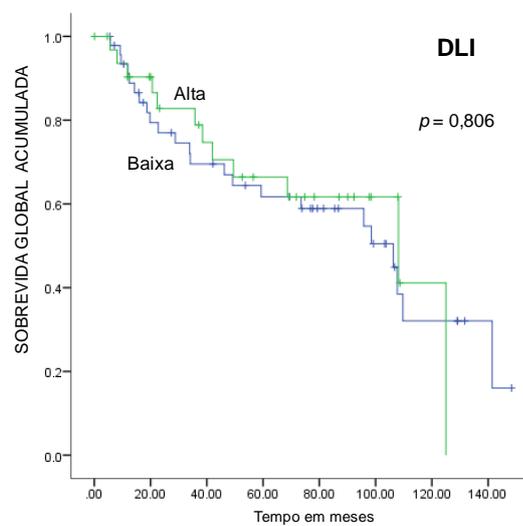


Gráfico 4.7: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global. Variável densidade linfática intratumoral.

4.8.3.2 Sobrevida livre de doença

A sobrevida livre de doença visualizada nos grupos baixa e alta DLI foi de 105,79 (IC 87,06-124,51) meses e 86,74 (IC 72,58-100,89) meses, respectivamente. A diferença de sobrevida livre de doença entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p = 0,502$) (Gráfico 4.8).

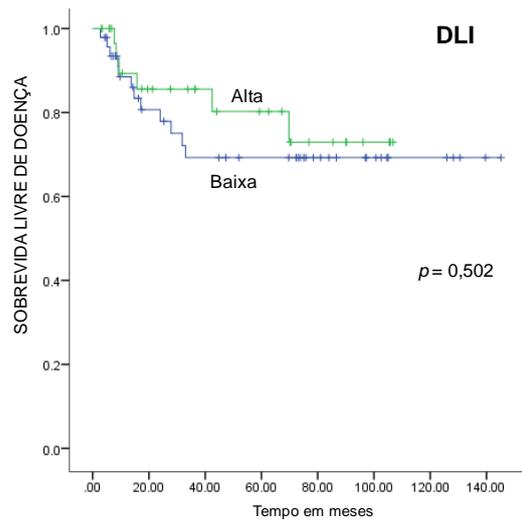


Gráfico 4.8: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença. Variável densidade linfática intratumoral.

4.8.4 Densidade Linfática Peritumoral

4.8.4.1 Sobrevida global

A sobrevida global visualizada nos grupos baixa e alta DLP foi de 90,94 (IC 70,44-111,44) meses e 85,81 (IC 69,41-102,22) meses, respectivamente. A diferença de sobrevida global entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p = 0,827$) (**Gráfico 4.9**).

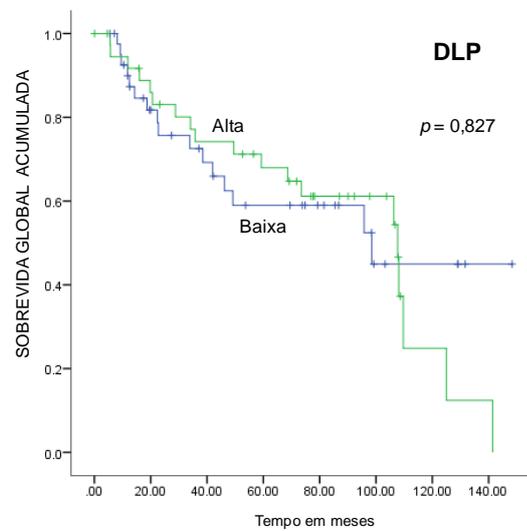


Gráfico 4.9: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida global. Variável densidade linfática peritumoral.

4.8.4.2 Sobrevida livre de doença

A sobrevida livre de doença visualizada nos grupos baixa e alta DLP foi de 102,47 (IC 81,58-123,37) meses e 112,86 (IC 95,27-130,46) meses, respectivamente. A diferença de sobrevida global entre os grupos não foi estatisticamente significativa ($p = 0,316$) (Gráfico 4.10).

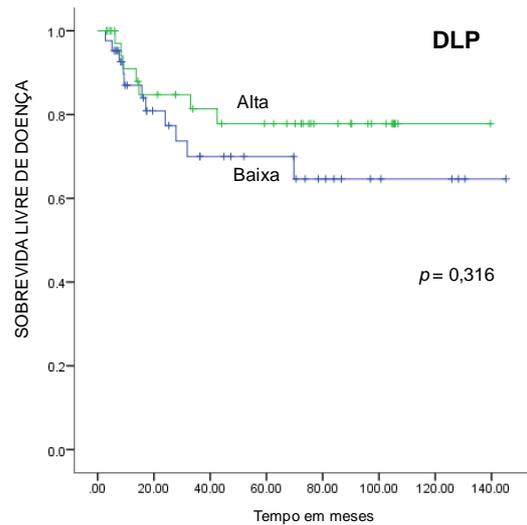


Gráfico 4.10: Curvas de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença. Variável densidade linfática peritumoral.

5 DISCUSSÃO

O perfil dos pacientes acometidos pelo câncer oral é do sexo masculino com idade mais avançada, a partir da 6^a década de vida, cor de pele branca, tabagistas e etilistas (LOFFREDO *et al.*, 2006; BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2010; CAMISASCA *et al.*, 2011; ZYGOGIANNI *et al.*, 2011), nota-se que trabalhos com diferentes propósitos coincidem com o perfil da população selecionada envolvida no presente estudo. Porém, a diferença entre os sexos tem diminuído, especialmente pelo maior número de mulheres tabagistas e é cada vez maior o número de pacientes jovens acometidos por essa neoplasia (GILLISON, 2007; VERED *et al.*, 2010). A proporção homens e mulheres nesse trabalho foi de 3:1, retratando um maior proporção de homens quando comparado ao descrito pela literatura em geral, em torno de 1,5:1 (WARNAKULASURIYA, 2009).

Embora tenha se obtido um avanço nas técnicas cirúrgicas, em abordagens multidisciplinares de tratamento e o surgimento de novas drogas antineoplásicas, a sobrevida dos pacientes acometidos pelo câncer oral apresentou apenas discreta melhora ao longo dos anos (DEL-SORDO *et al.*, 2010) ou em nada melhorou (BEAVON, 2000). As taxas de sobrevida são reduzidas em 50% em pacientes que apresentam metástase cervical, quando em comparadas a pacientes com tumores primários semelhantes sem metástase cervical (SHAH & ANDERSEN, 1995; ROBBINS *et al.*, 2013)

A literatura é vasta em relação aos estudos que pesquisam fatores prognósticos para o CCEO, porém o estadiamento clínico baseado no TNM ainda permanece como padrão-ouro, sendo utilizado para definir o tratamento. No nosso estudo todos os pacientes foram submetidos à cirurgia, assim, o TNM patológico pode ser aplicado, levando em consideração as mensurações realizadas durante a macroscopia para estabelecer o T (tamanho) e a análise histopatológica dos linfonodos cervicais para definir o N (acometimento ou não de linfonodos), caracterizando dessa forma o estadiamento mais fiel do tumor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; MONTERO & PATEL 2015). Em nosso estudo utilizamos o protocolo de recortes semi-seriados nos linfonodos e o uso da reação imuno-histoquímica com o anticorpo anti-pan-CK AE1/AE3, com o objetivo de aprimorar a classificação do estadiamento patológico dos linfonodos (pN). Diversos autores relatam em seus

estudos que os recortes semi-seriados promovem maior acurácia ao estadiamento patológico dos linfonodos (pN) (HAMAKAWA *et al.*, 2000; YOSHIDA *et al.*, 2005; DHAWAN *et al.*, 2016). O presente estudo utilizou como critério de inclusão pacientes classificados como cN0, justamente por isso houve um predomínio de estádios clínicos iniciais I e II (78,8%). Entretanto, esses dados não se confirmaram após a avaliação dos linfonodos cervicais. Influenciado pelo comprometimento de linfonodos cervicais, ocorreu um "upstaging" nos estádios patológicos tardios (III e IV) de 21,2% para 55%. Esses pacientes com tumores de língua e assoalho de boca apresentaram predomínio do estadiamento clínico inicial (I e II) e patológico avançado (III e IV), justamente pela alta taxa de metástases não diagnosticadas clinicamente (42,5%). Em estudo prévio realizado pelos presentes autores, CAMISASCA *et al.* (2011) avaliaram 53 pacientes e também relataram aumento do número de pacientes do cEstadio avançado (43,4%) para o pEstadio (50,9%), entretanto a diferença foi muito menor, pois não utilizaram cN0 como critério de inclusão no estudo.

A presença de metástases em linfonodos cervicais é o mais importante fator prognóstico para o CCEO (WOOLGAR, 1999; HOLLENBEAK *et al.*, 2001; FERLITO *et al.*, 2002; KOWALSKI & SANABRIA, 2007; SANO & MYERS, 2007; DAS & SKOBE, 2008; FARIAS *et al.* 2009; NATAJARAN & EISENBERG, 2011; LIU *et al.*, 2011) sendo uma variável independente para determinar a sobrevida dos pacientes (MYERS, 2010). Para definição estadiamento clínico do tumor, um exame completo com inspeção visual e palpação permitem uma impressão precisa da extensão da doença, a terceira dimensão do tumor, a presença de invasão óssea ou ruptura da pele. Documentação apropriada com desenhos e os registros fotográficos do tumor são úteis no estadiamento e no planejamento terapêutico. A complementação imaginológica é crucial para a avaliação da relação do tumor com o osso adjacente e para avaliar os linfonodos regionais. Tomografia computadorizada é o método de escolha para avaliação óssea e dos linfonodos cervicais, especialmente disseminação nodal extracapsular. A ressonância magnética fornece informações complementares sobre a extensão do tecido mole e invasão perineural (MONTERO & PATEL, 2015)

HOLLENBEAK *et al.* (2001), investigaram os métodos complementares de diagnóstico de metástase linfonodal: tomografia computadorizada e tomografia por emissão de pósitrons (PET), avaliando pacientes com e sem envolvimento de

linfonodos cervicais e encontraram que pacientes pN+ apresentaram menor sobrevida ($p < 0,00001$). De forma semelhante HONORATO *et al.* (2009) em estudo epidemiológico concluíram que a ausência de linfonodos acometidos no momento do diagnóstico, indicaram melhor sobrevida. No presente trabalho essa correlação não foi significativa para sobrevida global nem para sobrevida livre de doença, talvez pelo número reduzido da população de estudo. Cabe ressaltar também, que não foi encontrada a descrição nos prontuários de exames de imagens realizados nessa população de estudo, provavelmente pela indisponibilidade desses exames em rede pública ou ainda não realizados nos anos do estudo. A caracterização dos linfonodos comprometidos foi feita pelo levantamento de dados do INCA e pelo exame histopatológico.

Em linfonodos cervicais com metástases clinicamente evidentes o tratamento do pescoço é obrigatório. O esvaziamento cervical radical ou radical modificado tem sido utilizado como tratamento de escolha (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; SANO & MYERS *et al.*, 2007; KOWALSKI & MEDINA, 2008).

Ao longo das últimas três décadas, o manejo eletivo do pescoço sem evidência clínica ou radiológica de nódulos linfáticos metastáticos (cN0) em pacientes com CCE de língua, tem sido objeto de discussão. (ABU-GHANEM *et al.*, 2016)

Em sua revisão sobre o câncer oral, MYERS (2010), afirmou que o CCEO apresenta propensão para metástase mesmo em estádios iniciais. Tumores em estádios iniciais I e II (cN0) localizados em língua e em lesões infiltrativas de assoalho de boca (as mais comuns), deve-se associar o esvaziamento cervical eletivo supra-omo-hióideo (níveis I, II e III) em virtude do alto índice de metástase cervical oculta, normalmente maior que 20%, podendo variar até 30% (PIMENTA-AMARAL *et al.*, 2004; CAMPANA & MEYERS, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; KOWALSKI & SANABRIA, 2007; MONTERO & PATEL, 2015). Há mais de duas décadas que a literatura relata que pacientes com pescoço negativo clinicamente (cN0) estão em maior risco de metástase nos níveis I a III (SHAH *et al.*, 1990).

Recentemente, ABU-GHANEM *et al.* (2016), realizaram uma revisão sistemática e uma meta-análise com um total de 20 estudos retrospectivos e prospectivos randomizados, em que compararam o esvaziamento cervical eletivo do pescoço com a observação (sem esvaziamento cervical) em 3244 pacientes com

CCE de língua em estágio inicial T1-T2 e cN0. Os achados indicam que o esvaziamento cervical eletivo pode reduzir significativamente a taxa de recorrência regional e melhorar a sobrevida específica da doença em pacientes com CCE de língua estadiados como cT1T2N0.

No presente estudo, do total dos 80 pacientes cN0 estudados, 25 (31,2%) após a cirurgia tiveram o diagnóstico de comprometimento linfonodal pela avaliação histopatológica de rotina e foram reclassificados como pN+. Após análise dos recortes submetidos a pan-CK AE1/AE3, mais nove (11,3%) foram classificados pN+, totalizando 34 (42,5%) pacientes com presença de metástase oculta. O percentual de metástases oculta foi maior do que o descrito na literatura, que varia entre 20 a 30% (HAMAKAWA *et al.*, 2000; PIMENTA-AMARAL *et al.*, 2004; CAMPANA & MEYERS, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; KOWALSKI & SANABRIA, 2007; MONTERO & PATEL, 2015). TAKES, 2004 em sua revisão sobre metástase linfonodal em CCE de cabeça e pescoço, reforça que a avaliação histopatológica de rotina em HE apresenta diagnósticos falsos negativos e que é preciso definir qual o padrão de referência deve ser usado para classificar o pN e isso, pode influenciar nos resultados dos estudos que investigam biomarcadores correlacionados com metástases linfonodais.

Sessenta por cento dos pacientes com CCEO em estágio inicial apresentam pescoço negativo (cN0) (MONTERO & PATEL, 2015). A literatura está em constante busca de técnicas que possam melhorar a investigação do pescoço clinicamente negativo antes do tratamento, identificando as metástases ocultas. Com maior precisão diagnóstica, o esvaziamento cervical seria exclusivamente terapêutico e não eletivo/profilático como é feito em pacientes estadiados como cN0. Se a taxa de metástases ocultas fosse reduzida para menos de 20%, o número de tratamentos eletivos poderia diminuir (TAKES *et al.*, 2008). Dessa forma, as sequelas e as comorbidades provocadas pelo esvaziamento cervical seriam reduzidas.

A literatura relaciona diversos fatores associados a metástase linfonodal: tamanho do tumor, grau histológico, profundidade de invasão, invasão perineural, invasão vascular (MONTERO & PATEL, 2015).

A radioterapia adjuvante é indicada como tratamento complementar em pacientes com alto risco de recidiva locorregional, ou seja, pacientes que exibem fatores preditivos de pior prognóstico (BRENDWEIN-GENSLER *et al.*, 2005). Esta população inclui pacientes com grandes tumores primários (pT3 ou pT4), pescoço

positivo com múltiplos linfonodos, metástases a níveis nodais IV ou V, margens cirúrgicas positivas, invasão linfovascular, invasão perineural e extravasamento capsular (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; MONTERO & PATEL, 2015). No presente trabalho, encontramos uma associação significativa ($p = 0,001$) em que a maioria dos pacientes submetidos a radioterapia adjuvante eram do grupo pN+, quando comparados ao grupo pN0. No grupo pN+, 16 pacientes não realizaram radioterapia adjuvante, sendo cinco dos casos foram inicialmente diagnosticados como pN0 e nos quais foram localizadas micro e macrometástases após recortes em HE e IHQ. Desses cinco pacientes, três evoluíram para óbito. Esses dados reforçam a importância do acometimento de linfonodos como fator prognóstico e a eficácia da radioterapia complementar no controle da doença quando existirem metástases cervicais. Houve dois casos de pacientes com metástase linfonodal extracapsular, dado descrito nos laudos histopatológicos, ambos receberam radioterapia complementar, um desenvolveu recidiva regional e evoluiu a óbito e o outro teve o acompanhamento perdido. SHAW *et al.* (2010) descreveram a importância na identificação desse padrão de metástase porque esta diretamente associado a incidência de recidiva local, metástase à distância e pior sobrevida global. Esses dados são concordantes com o estudo de SUTON *et al.* (2017) que ainda acrescentam que a disseminação extracapsular é uma característica freqüente em linfonodos cN0 e pode ser mais comum em linfonodos pequenos do que geralmente é estimado.

Na análise histopatológica, os tumores do grupo pN+ apresentaram em sua maioria o pior padrão de invasão (tipo 4), enquanto que no grupo pN0, os padrões 2 e 3 foram quase que exclusivos desse grupo. Essa associação foi significativa ($p = 0,003$) e concorda com o relatado por que os tumores com padrão de invasão pior são associados a metástase linfonodal. (BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2005, 2010). JERJES *et al.*, 2010 encontraram uma associação significativa entre a presença de recidiva e o padrão de invasão do tumor, que ele definiu como "não coesivo".

No acompanhamento dos pacientes, houve maior registro de recidiva no grupo pN0, dos 18 casos de recidiva 11 (61%) quando comparado ao grupo pN+ (7 – 39%). JERJES *et al.* (2010) que estudaram 115 CCEO iniciais (T1 e T2) e a presença de recidivas, diferente do nosso estudo, encontraram que a recidiva regional foi associada a tumores pN+.

Além dos dados de recidiva, nosso estudo apresentou 13 (16,3%) casos de segundo tumor primário, sendo 11 (85%) em paciente do grupo pN0, mostrando uma associação significativa ($p = 0,03$). LIU *et al.* (2013), em população de estudo muito similar, estudou 72 pacientes com CCE T1-T3N0 e verificou uma maior incidência de segundo tumor primário (27,8%), sendo 75% em cavidade oral, com significativa menor sobrevida. Esses dados podem ser explicados porque os autores incluíram nos estudos apenas pacientes tratados com cirurgia exclusiva, sem radioterapia adjuvante.

A literatura mundial vem sinalizando para a importância da investigação de metástase linfonodal através de recortes semi-seriados que podem aumentar a detecção de micrometástases linfonodais em pacientes patologicamente no estágio N0 (FERLITO *et al.*, 2002). A análise de várias secções do tecido com 5 μm de espessura representa uma amostra muito pequena, cerca de um centésimo do linfonodo. Entretanto, ainda não existe um consenso definido quanto ao intervalo de recortes que deva ser utilizado, diferentes intervalos entre os recortes selecionados já foram descritos como 100 μm (WOOLGAR, 1999), 150 μm (ROSS *et al.*, 2004; ATULA *et al.*, 2009), 200 μm (HAMAKAWA, 2000) e 500 μm (GUO, 2007). Diante desse cenário, The International Union Against Cancer (UICC) não define o número de secções necessárias para os recortes em linfonodos (SOBIN & WITTEKIND, 1997). Nesse estudo, optou-se por utilizar o intervalo de 150 μm entre os recortes, feito em duas etapas. Acreditamos que esse protocolo garante uma análise mais aprofundada dos linfonodos previamente considerados como livres de tumor, mostrando-se eficiente na identificação de macro e micrometástases. Havendo suspeita de metástases não evidenciadas nessas etapas poder-se-ia prosseguir com os recortes, não sendo necessário no momento desse estudo. A IHQ utilizando o anticorpo anti-pan-CK AE1/AE3 foi escolhida para aumentar a taxa de detecção de micrometástases (TRAPPEN & PEPPER, 2002; KWON *et al.*, 2004; YOSHIDA *et al.*, 2005) e também com intuito de caracterizar com maior precisão o grupo de pacientes com e sem metástase cervical. Os cortes semi-seriados e a reação IHQ foram realizados nos linfonodos dos pacientes com tumores de língua e/ou assoalho de boca, do grupo pN0, sendo encontradas metástases e micrometástases em nove pacientes (11,3%), sendo dois casos T3 e conseqüentemente classificados em estágio avançado e os outros sete casos classificados em estágio clínico inicial (I e II). As seis macrometástases e uma micrometástase foram evidenciadas tanto nos

recortes em HE quanto na IHQ, no entanto dois casos de micrometástases só puderam ser encontrados com a pan-CK AE1/AE3, destacando a importância da reação IHQ com esse propósito. No presente estudo, os três pacientes com micrometástases evoluíram para o óbito. A literatura tem abordado a discussão sobre qual é o valor prognóstico das micrometástases. A detecção de micrometástases tem um papel importante no estadiamento patológico dos tumores, podendo fornecer um melhor planejamento em terapias adjuvantes para pacientes que estejam em risco de recidiva da doença. (WOOLGAR, 1999; XU *et al.*, 2008; ATULA *et al.*, 2009). Com apenas três casos do nosso trabalho, a análise fica superficial e desta forma, não se pode concluir sobre o tema.

Por outro lado, cada vez mais a literatura valoriza trabalhos que estudam um mesmo sítio de CCEO e perfil semelhantes de pacientes/tumores, optando dessa forma por ter uma população de estudo menor, entretanto homogênea no seu perfil.

O número de estudos que se propuseram a investigar a participação dos vasos linfáticos no processo metastático vem aumentando e alguns trabalhos demonstraram, em modelos animais, que a presença dos vasos linfáticos próximos ao tumor podem contribuir para a metástase em linfonodos. (HOSHIDA *et al.*, 2006; DAS & SKOBE, 2008). Seguindo esse raciocínio, fatores linfangiogênicos, em especial o VEGF-C vem sendo estudado e associado ao processo metastático por agirem na formação de novos vasos e nos vasos linfáticos pré-existentes.

Diante dessa investigação da literatura, o presente estudo definiu como proposta verificar se a densidade linfática poderia apresentar associação com a ocorrência de metástases ocultas nos linfonodos cervicais, para dessa forma identificar possíveis fatores preditivos para pacientes com CCE de língua e assoalho de boca, contribuindo para melhorar a precisão na indicação do esvaziamento cervical eletivo e o prognóstico desses pacientes.

O estudo imuno-histoquímico da podoplanina, marcador específico para endotélio linfático, permite identificar a presença dos vasos linfáticos e de quantificá-los, através da densidade linfática tumoral. OHNO *et al.* (2007) e SIRIWADERNA *et al.* (2008) avaliaram CCEO e a influência do VEGF-C nos vasos linfáticos, e encontraram que os casos que apresentavam forte expressão de VEGF-C, exibiam maior densidade de vasos linfáticos. Diversos estudos relacionam a alta densidade de vasos linfáticos com metástases regionais (MIYAHARA *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2018; CHUNG *et al.*, 2010) e a menor sobrevida desses pacientes (MUNOZ-

GUERRA *et al.*, 2004 e MIYAHARA *et al.*, 2007). Em nosso estudo, não encontramos a associação da presença de metástase regional e da menor sobrevida com a alta densidade de vasos linfáticos.

Acredita-se que os vasos linfáticos peritumorais são mais dilatados e permeáveis, diferente dos vasos intratumorais que são mais comprimidos e menos funcionais (PADERA *et al.*, 2002; KYZAS *et al.*, 2005).

Tem-se discutido se a disposição dos vasos linfáticos em relação ao tumor, sejam eles intratumorais ou peritumorais, apresentam alguma diferença em relação ao extravasamento das células epiteliais malignas no processo de metástase para linfonodos cervicais. Diante disso, decidimos por analisar a DVL, DLI e DLP conforme a maioria da literatura faz, em busca de melhores resultados com relação a essas variáveis e o potencial preditivo para CCE de língua e assoalho de boca.

A literatura tem relatado e defendido que uma espessura tumoral > 4 mm leva a um risco aumentado de metástases nodais no pescoço (GANLY *et al.* 2013). Em 2014, BALASUBRAMANIAN *et al.* (2014) em uma série retrospectiva de 343 pacientes, avaliou a espessura tumoral como preditor para metástase cervical. Houve diferença significativa no risco de metástase em relação a espessura e a localização do tumor. Os autores concluíram recomendando o esvaziamento cervical eletivo em tumores de assoalho de boca > 2 mm e tumores de língua > 4 mm. No nosso estudo, tumores com maiores espessuras, foram associados significativamente ($p = 0,014$) com a baixa DVL, podemos explicar esse resultado porque utilizamos como *cutoff* da variável espessura a média dos valores encontrados, que correspondeu a 1mm.

Tumores bem diferenciados, foram os que apresentaram maior número de casos com alta DLI ($p = 0,012$). Esse achado nos indica que mesmo tumores bem diferenciados, podem ter alta densidade linfática e propensão para metástase cervical. Na avaliação na DLP os tumores cT3, cEstadio III (avançado) e pT avançado, apresentaram em sua maioria baixa DLP, sendo uma associação estatisticamente significativa. WATANABE *et al.* (2013) estudaram a DVL em 109 pacientes com CCEO e de lábio e constataram que a densidade de vasos linfáticos tende a diminuir com a progressão da doença, aumento do tamanho do tumor e aumento do tamanho do nódulo linfático metastático. Talvez, a DVL não indique diretamente o risco de metástase para linfonodos cervicais, mas pode refletir a presença de linfangiogênese por influência da expressão de VEGF, juntamente com

a perda de vasos linfáticos através do crescimento e progressão do tumor. ISHII *et al.* (2010) discutiram que em pacientes com CCEO, o tumor induz a linfangiogênese do linfonodo sentinela antes do início da metástase dos linfonodos, ou seja, a linfangiogênese nos linfonodos regionais, ao invés do aumento da densidade linfática no tumor, seria um importante fator prognóstico para a doença.

Em nosso estudo os tumores do grupo pN+, apresentaram e sua maioria alta DVL e alta DLP, porém não foi uma associação estatisticamente significativa, como relatado por SEDIVY *et al.*, 2003 e MIYAHARA *et al.*, 2007; SIRIWARDENA *et al.* (2008),

A baixa e a alta DLI apresentaram distribuição igual entre os grupos pN0 e pN+, diferente do que relataram LIANG *et al.* (2008) e SIRIWARDENA *et al.* (2008), que encontraram maior DLI em pacientes com comprometimento de linfonodos.

Em nosso estudo, identificamos a presença de vasos linfáticos no microambiente tumoral, através do anticorpo anti-podoplanina e avaliamos a densidade de vasos linfáticos. Entretanto, existem outros marcadores que vem sendo relacionados a linfangiogênese, como o VEGF-C, que secretado pelas células tumorais estimula formação de novos vasos linfáticos e receptores de quimiocina, como o CCR7, que participam ativamente guiando o extravasamento das células epiteliais malignas para os linfonodos cervicais. Nosso trabalho é o único que avaliou a densidade de vasos linfáticos nessa população de estudo do INCA, utilizando os recortes semi-seriados e o anticorpo anti-pan-CK AE1AE3, como ferramenta complementar na identificação de metástase ocultas.

Diante do exposto, a complexidade da biologia tumoral no processo metastático, principalmente com relação a influência de fatores linfangiogênicos precisam ser mais explorados, para viabilizar a identificação de biomarcadores de metástase para validar a futura aplicabilidade prognóstica.

O presente estudo apresentou como limitações, uma população de estudo relativamente pequena, além de dificuldade em obtenção de verba, o que ocasionou diretamente a não realização de outros marcadores imunohistoquímicos previamente selecionados para o trabalho.

6 CONCLUSÕES

- CCE localizados em língua e assoalho de boca apresentam metástases ocultas com alta frequência;
- Os recortes semi-seriados dos linfonodos associado à reação imuno-histoquímica da pan-CK AE1/AE3 permitiu a identificação de novos casos com metástase linfonodal;
- A densidade vascular linfática, densidade linfática intratumoral e densidade linfática peritumoral não apresentam diferença significativa para a sobrevida na população estudada.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDUL-AZIZ, M. A.; AMIN, A. K.; EL-ROUBY, D. H. *et al.* Lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma: Correlation with VEGF-C expression and lymph node metastasis. **Int J Dent**, 2017:7285656, 2017

ABU-GHANEM, S.; YEHUDA, M.; CARMEL, N. N. *et al.* Elective neck dissection vs observation in early-stage squamous cell carcinoma of the oral tongue with no clinically apparent lymph node metastasis in the neck: A systematic review and meta-analysis. **JAMA Otolaryngol Head Neck Surg**, 142(9):857-865, 2016.

ATULA, T.; HUNTER K. D.; COOPER, L. A. *et al.* Micrometastases and isolated tumour cells in sentinel lymph nodes in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Eur J Surg Oncol**, 35(5):532-538, 2009.

BAJWA, M. S.; MCMILLAN, R.; KHATTAK, O. *et al.* Neck recurrence after level I-IV or I-III selective neck dissection in the management of the clinically N0 neck in patients with oral squamous cell carcinoma. **Head Neck**, 33(3):403-406, 2011.

BALASUBRAMANIAN, D.; EBRAHIMI, A.; GUPTA, R. *et al.* Tumour thickness as a predictor of nodal metastases in oral cancer: comparison between tongue and floor of mouth subsites. **Oral Oncol**, 50(12):1165-1168, 2014.

BEAVON, I. R. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. **Eur J Cancer**, 36(13):1607-1620, 2000.

BELLO, I. O.; SOINI, Y.; SALO, T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: Means, markers and perspectives (I). **Oral Oncology**, 46(9):630-635, 2010.

BETTENDORF, O.; PIFFKO, J.; BÀNKFALVI, A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? **Oral Oncol**, 40(2):110-119, 2004.

BRANDWEIN-GENSLER, M.; TEIXEIRA, M. S.; LEWIS, C. M. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly

predictive of local disease-free and overall survival. **Am J Surg Pathol**, 29(2):167-178, 2005.

_____; SMITH, R. V.; WANG, B. *et al.* Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Am J Surg Pathol**, 34(5):676-688, 2010.

BRYNE, M.; KOPPANG, H. S.; LILLENG, R. *et al.* Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J Oral Pathol Med**, 166(4):375-381, 1992.

BYERS, R. M.; EL-NAGGAR, A. K.; LEE, Y. Y. *et al.* Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue? **Head Neck**, 20(2):138-144, 1998.

CAMISASCA, D. R.; SILAMI, M.; HONORATO, J. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: clinicopathologic features in patients with and without recurrence. **ORL**, 73(3):170-176, 2011.

CAMPANA, J. P.; MEYERS, A. D. The surgical management of oral cancer. **Otolaryngol Clin North Am**, 39(2):331-348, 2006.

CHOI, K.; KIM, M. J.; YUN, P. Y. *et al.* Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults. **Oral Oncol**, 42(2):208-217, 2006.

CHRISTIANSEN, A.; DETMAR, M. Lymphangiogenesis and cancer. **Genes Cancer**, 2(12):1146-1158, 2011.

CHUNG, M. K.; MIN, J. Y.; SO, Y. K. *et al.* Correlation between lymphatic vessel density and regional metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. **Head Neck**, 32(4):445-451, 2010.

CIRLIGERIU, L.; CIMPEAN, A. M.; RAICA, M. *et al.* Dual role of podoplanin in oral cancer development. **In Vivo**, 28(3):341-347, 2014.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, 420(6917):860-867, 2002.

DAS, S.; SKOBE, M. Lymphatic vessel activation in cancer. **Ann N Y Acad Sci**, 1131(1):235-241, 2008.

DEL-SORDO, R.; ANGIERO, F.; BELLEZZA, G. *et al.* HER family receptors expression in squamous cell carcinoma of the tongue: study of the possible prognostic and biological significance. **J Oral Pathol Med**, 39(1):79-86, 2010.

DHAWAN, I.; SANDHU, S. V.; BHANDARI, R. *et al.* Detection of cervical lymph node micrometastasis and isolated tumor cells in oral squamous cell carcinoma using immunohistochemistry and serial sectioning. **J Oral Maxillofac Pathol**, 20(3):436-444, 2016.

DIAS, F.; KLIGERMAN, J.; MATOS DE SÁ, G. *et al.* Elective neck dissection versus observation in stage I squamous cell carcinomas of the tongue and floor of the mouth. **Otolaryngol Head Neck Surg**, 125(1):23-29, 2001.

EL-NAGGAR, A. K.; CHAN, J. K. C.; GRANDIS, J. R. *et al.* **WHO Classification of Head and Neck Tumours**, 4th edition. Lyon: IARC, 2017. 110-111p.

FARIAS, T. P.; PERYASSÚ, B. C.; REZENDE, J. F. *et al.* Análise crítica da aplicação da pesquisa do linfonodo sentinela no tratamento do câncer inicial de boca. **Rev Bras Cir Cabeça Pescoço**, 38(2):98-102, 2009.

FAUSTINO, S. E.; OLIVEIRA, D. T.; NONOGAKI S. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor-C does not predict occult lymph-node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 37(4):372-378, 2008.

FERLITO, A.; SHAHA, A. R.; RINALDO, A. *et al.* The incidence of lymph node micrometastases in patients pathologically staged N0 in cancer of oral cavity and oropharynx. **Oral Oncol**, 38(1):3-5, 2002.

GANLY, I.; GOLDSTEIN, D.; CARLSON, D. L. *et al.* Long-term regional control and survival in patients with "low-risk," early stage oral tongue cancer managed by partial glossectomy and neck dissection without postoperative radiation: the importance of tumor thickness. **Cancer**, 119(6):1168-1176, 2013.

GILLISON, M. L. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. **Head Neck**, 29(8):779-92, 2007.

GUO, C. B.; LI, Y. A.; GAO, Y. Immunohistochemical staining with cytokeratin combining semi-serial sections for detection of cervical lymph node metastases of oral squamous cell carcinoma. **Auris Nasus Larynx**, 34(3):347-351, 2007.

HAKEEM, A. H.; PRADHAN, S. A.; KANNAN, R. *et al.* Clinical outcome of surgical treatment of T1-2 N0 squamous cell carcinoma of oral tongue with observation for the neck: Analysis of 176 cases. **Ann Maxillofac Surg**, 6(2):235-240, 2016.

HAMAKAWA, H.; TAKEMURA, K.; SUMIDA, T. *et al.* Histological study on pN upgrading of oral cancer. **Virchows Arch**, 437(2):116-121, 2000.

HOLLENBEAK, C. S.; LOWE, V. J.; STACK, B. C. J. *et al.* The cost-effectiveness of fluorodeoxyglucose 18-F positron emission tomography in the N0 neck. **Cancer**, 92(9):2341-2348, 2001.

HONORATO, J.; CAMISASCA, D. R.; SILVA, L. E. *et al.* Análise de sobrevida global em pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de boca no INCA no ano de 1999. **Rev Bras Epidemiol**, 12(1):69-81, 2009.

HOSHIDA, T.; ISAKA, N.; HAGENDOORN, J. *et al.* Imaging steps of lymphatic metastasis reveals that vascular endothelial growth factor-C increases metastasis by increasing delivery of cancer cells to lymph nodes: therapeutic implications. **Cancer Res**, 66(16):8065-8075, 2006.

ISHII, H.; CHIKAMATSU, K.; SAKAKURA, K. *et al.* Primary tumor induces sentinel lymph node lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, 46(5):373-378, 2010.

JERJES, W.; UPILE, T.; PETRIE, A. *et al.* Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. **Head Neck Oncol**, 2(1):9, 2010.

KLIGERMAN, J.; LIMA, R. A.; SOARES, J. R. *et al.* Supraomohyoid neck dissection in the treatment of T1/T2 squamous cell carcinoma of oral cavity. **Am J Surg**, 168(5):391-394, 1994.

KOWALSKI, L. P.; MEDINA, J. E. Nodal metastases predictive factors. **Otolaryngol Clin North Am**, 31(4):621-637, 1998.

_____); SANABRIA, A. Elective neck dissection in oral carcinoma: a critical review of the evidence. **Acta Otorhinolaryngol Ital**, 27(3):113-117, 2007.

KWON, S. Y.; KIM, H. J.; WOO, J. S. *et al.* The usefulness of cytokeratin immunohistochemistry in detection of lymph node micrometastasis in neck dissection specimens. **Otolaryngol Head Neck Surg**, 131(3):300-306, 2004.

KYZAS, P. A.; GELEFF, S.; BATISTATOU, A. *et al.* Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. **J Pathol**, 206(2):170-177, 2005.

LIANG, X.; YANG, D.; HU, J. *et al.* Hypoxia inducible factor-alpha expression correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymphangiogenesis/angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Res**, 28(3A):1659-1666, 2008.

LIU, T. R.; CHEN, F. J.; YANG, A. K. *et al.* Elective neck dissection in clinical stage I squamous cell carcinoma of the tongue: Does it improve regional control or survival time? **Oral Oncol**, 47(2):136-141, 2011.

LIU, C. H.; CHEN, H. J.; WANG, P. C. *et al.* Patterns of recurrence and second primary tumors in oral squamous cell carcinoma treated with surgery alone. **Kaohsiung J Med Sci**, 29(10):554-559, 2013.

LOFFREDO, L. C. M.; PINELLI, C.; VITUSSI, T. R. C. *et al.* Oral cancer mortality trends in Brazilian geographical regions from 1996-2001. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, 27(2):133-138, 2006.

LONGATTO FILHO, A.; OLIVEIRA, T. G.; PINHEIRO, C. *et al.* How useful is the assessment of lymphatic vascular density in oral carcinoma prognosis? **World J Surg Oncol**, 11(5):140, 2007.

LYMAN, G. H.; GIULIANO, A. E.; SOMERFIELD, M. R. *et al.* American Society of Clinical Oncology: American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast cancer. **J Clin Oncol**, 23(30):7703-7720, 2005.

MARGARITESCU, C.; RAICA, M.; PIRICI, D. *et al.* Podoplanin expression in tumor-free resection margins of oral squamous cell carcinomas: an immunohistochemical and fractal analysis study. **Histol Histopathol**, 25(6):701-711, 2010.

MBURU, Y. K.; WANG, J.; WOOD, M. A. *et al.* CCR7 mediates inflammation-associated tumor progression. **Immunol Res**, 36(1-3):61-72, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **TNM: classificação de tumores malignos**. 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p. Disponível em <<http://www.inca.gov.br/tratamento/tnm/>> Acesso em: 12 de junho de 2015.

_____; **Rotinas internas do INCA: Serviço de cirurgia de cabeça e pescoço**. Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2007. 138-140p.

_____; **Estimativa 2018 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2018. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/>> Acesso em: 12 de março de 2018.

MIYAHARA, M.; TANUMA, J.; SUGIHARA, K. *et al.* Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. **Cancer**, 110(6):1287-1294, 2007.

MONTERO, P. H.; PATEL, S. G. Cancer of the oral cavity. **Surg Oncol Clin N Am**, 24(3):491-508, 2015.

MUNOZ-GUERRA, M. F.; MARAZUELA, E. G.; MARTIN-VILLAR, E. *et al.* Prognostic significance of intratumoral lymphangiogenesis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Cancer**, 100(3):553-560, 2004.

MYERS, J. **Oral cancer metastasis**. Houston: Springer, 2010. 346p

NATARAJAN, E.; EISENBERG, E. Contemporary concepts in the diagnosis of oral cancer and precancer. **Dent Clin North Am**, 55(1):63-88, 2011.

NEVILLE, B. W.; DAMM, D. D.; ALLEM, C. M. *et al.* **Patologia Oral & Maxilofacial**. 4ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. 347p.

NOLLET, F.; BERX, G.; VAN ROY, F. The role of the cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. **Mol Cell Biol Res Com**, 2(2):77-85, 1999.

OHNO, F.; NAKANISHI, H.; ABE, A. *et al.* Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinomas evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin antibody: an analysis in comparison with angiogenesis. **J Oral Pathol Med**, 36(5):281-289, 2007.

ORD, R. A. Surgical management of the N0 neck in early stage T1–2 oral cancer; a personal perspective of early and late impalpable disease. **Oral Maxillofac Surg**, 16(2):181-188, 2012.

PADERA, T. P.; KADAMBI, A.; DI TOMASO, E. *et al.* Lymphatic metastasis in the absence of functional intratumor lymphatics. **Science**, 296(5574):1883-1886, 2002.

PATEL, S. G.; SHAH, J. P. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. **CA Cancer J Clin**, 55(4):242-258, 2005.

PEPPER, M. S.; TILLR, J. C.; NISATO, R. *et al.* Lymphangiogenesis and tumor metastasis. **Cell Tissue Res**, 314(1):167-177, 2003.

PIMENTA-AMARAL, T. M.; FREIRE, A. R. S.; CARVALHO, A. L. *et al.* Predictive factors of occult metastasis and prognosis of clinical stages I and II squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. **Oral Oncol**, 40(8):780-786, 2004.

ROBBINS, K. T.; FERLITO, A.; SHAH, J. P. *et al.* The evolving role of selective neck dissection for head and neck squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, 270(4):1195-202, 2013.

ROSS, G. L.; SOUTAR, D. S.; GORDON MACDONALD, D. *et al.* Sentinel Node Biopsy in head and neck cancer: Preliminary results of a multicenter trial. **Annals of Surgical Oncology**, 11(7):690-696, 2004.

ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu Rev Immunol**, 18:217-242, 2000.

SANO, D.; MYERS, J. N. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. **Cancer Metastasis Rev**, 26(3-4):645-662, 2007.

SCHILLING, C.; SHAW, R.; SCHACHE, A. *et al.* Sentinel lymph node biopsy for oral squamous cell carcinoma. Where are we now? **Br J Oral Maxillofac Surg**, 55(8):757-762, 2017.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. **Oral Oncol**, 45(4-5):301-308, 2009.

SEDIVY, R.; BECK-MANNAGETTA, J.; HAVERKAMPF, C. *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor-C correlates with the lymphatic microvessel density and the nodal status in oral squamous cell cancer. **J Oral Pathol Med**, 32(8):455-460, 2003.

SHAH, J. P.; CANDELA, F. C.; PODDAR, A. K. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. **Cancer**, 66(1):109-113, 1990.

_____ ; ANDERSEN, P. E. Evolving role of modifications in neck dissection for oral squamous carcinoma. **Br J Oral Maxillofacial Surg**, 33(1):3-8, 1995.

SHAW, R. J.; LOWE, D.; WOOLGAR, J. A. *et al.* Extracapsular spread in oral squamous cell carcinoma. **Head Neck**, 32(6):714-722, 2010.

SIRIWARDENA, B. S.; KUDO, Y.; OGAWA, I. *et al.* VEGF-C is associated with lymphatic status and invasion in oral cancer. **J Clin Pathol**, 61(1):103-108, 2008.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumours**, 5th edition. New York: Wiley, 1997.

SUNDAR, S. S.; GANESAN, T. S. Role of lymphangiogenesis in cancer. **J Clin Oncol**, 25(27):4298-4307, 2007.

SUTON, P.; SALARIC, I.; GRANIC, M. *et al.* Prognostic significance of extracapsular spread of lymph node metastasis from oral squamous cell carcinoma in the clinically negative neck. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 46(6):669-675, 2017.

TAKES, R. P. Staging of the neck in patients with head and neck squamous cell cancer: imaging techniques and biomarkers. **Oral Oncol**, 40(7):656-667, 2004.

_____; RINALDO, A.; RODRIGO, J. P. *et al.* Can biomarkers play a role in the decision about treatment of the clinically negative neck in patients with head and neck cancer? **Head Neck**, 30(4):525-538, 2008.

TRAPPEN, P. O. V.; PEPPER, M. S. Lymphatic dissemination of tumour cells and the formation of micrometastases. **Lancet Oncol**, 3(1):44-52, 2002.

VARTANIAN, J.; CARVALHO, A. L.; DE ARAÚJO FILHO, M. J. *et al.* Predictive factors and distribution of lymph node metastasis in lip cancer patients and their implications on the treatment of the neck. **Oral Oncol**, 40(2):223-227, 2004.

VERED, M.; DOBRIYAN, A.; DAYAN, D. *et al.* Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer. **Cancer Sci**, 101(1):274-280, 2010.

VISHAK, S.; ROHAN, V. Cervical node metastasis in T1 squamous cell carcinoma of oral tongue-pattern and the predictive factors. **Indian J Surg Oncol**, 5(2):104-108, 2014.

WARBURTON, G.; NIKITAKIS, N. G.; ROBERSON, P. *et al.* Histopathological and lymphangiogenic parameters in relation to lymph node metastasis in early stage oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Surg**, 65(3):475-484, 2007.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**, 45(4-5):309-316, 2009.

WATANABE, S.; KATO, M.; KOTANI, I. *et al.* Lymphatic vessel density and vascular endothelial growth factor expression in squamous cell carcinomas of lip and oral cavity: A clinicopathological analysis with immunohistochemistry using antibodies to D2-40, VEGF-C and VEGF-D. **Yonago Acta Med**, 56(1):29-37, 2013.

WICKI, A.; CHRISTOFORI, G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. **Br J Cancer**. 96(1):1-5, 2007.

WILEY, H. E.; GONZALEZ, E. B.; MAKI, W. *et al.* Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. **J Natl Cancer Inst**, 93(21):1638-1643, 2001.

WONG, D.; TODD, R.; TSUJI, T. *et al.* Molecular biology of human oral cancer. **Crit Rev Oral Biol Med**, 7(4):319-328, 1996.

WOOLGAR, J. A. Micrometastasis in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma: incidence, histopathological features and clinical implications. **Br J Oral Maxillofac Surg**, 37(3):181-186, 1999.

XU, Y.; LEFÈVRE, M.; PÉRIÉ, S. *et al.* Clinical significance of micrometastases detection in lymph nodes from head and neck squamous cell carcinoma. **Otolaryngol Head Neck Surg**, 139(3):436-441, 2008.

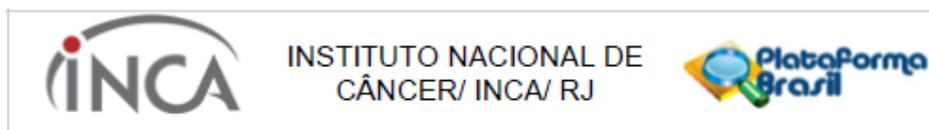
YOSHIDA, K.; KASHIMA, K.; SUENAGA, S. *et al.* Immunohistochemical detection of cervical lymph node micrometastases from T2N0 tongue cancer. **Acta Otolaryngol**, 125(6):654-658, 2005.

ZHAO, D.; PAN, J.; LI, X. Q. *et al.* Intratumoral lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma and its clinicopathological significance. **J Oral Pathol Med**, 37(10):616-625, 2008

ZYGOGIANNI, A. G.; KYRGIAS, G.; KARAKITSOS, P. *et al.* Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. **Head Neck Oncol**, 3(2):1-12, 2011.

8 ANEXOS

8.1 FOLHA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 270.615

BENEFÍCIOS:

Não há benefícios imediatos por tratar-se de estudo retrospectivo. São esperados benefícios decorrentes da possível capacidade de detecção de metástases ocultas a partir da análise imuno-histoquímica de proteínas -alvo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto é pertinente, relevante e está adequadamente desenhado. A equipe conta com profissionais capacitados a cada função. O projeto envolve uma tese de doutorado e conta com financiamento via pesquisador-orientador.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

As pendências em relação ao TCLE foram atendidas.

Um novo TCLE, destinado aos responsáveis legais de pacientes incapacitados o que foram a óbito, foi apresentado.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer (CEP-INCA), de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Ressalto o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo.

RIO DE JANEIRO, 13 de Maio de 2013

Assinador por:

Carlos Henrique Debenedito Silva
(Coordenador)

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203
Bairro: CENTRO CEP: 20.231-092
UF: RJ Município: RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)3207-4550 Fax: (21)3207-4556 E-mail: cep@inca.gov.br

8.2 APOIO FINANCEIRO – APQ1 FAPERJ (ANEXO II)



GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO
SECRETARIA DE ESTADO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA
FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

FAPERJ

Processo Nº E-26 _____ / ____
Data: ____/____/____ Fis. _____
Rubrica: _____

TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO Rio de Janeiro, 05/06/2013,
Nº DO PROCESSO E-26/110.955/2013 **Nº DE MATRÍCULA** 1999.5108.4
Parcela: Única

PROGRAMA APQ1 2012/02

PROJETO INVESTIGAÇÃO DE METÁSTASE CERVICAL OCULTA EM PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA ASSOCIADA À IMUNOEXPRESSION DE QUIMIOCINAS E MARCADORES DE LINFANGIOGÊNESE

OUTORGANTE Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

OUTORGADO Vania Gloria Silami Lopes

ENDEREÇO Estrada Leopoldo Fróes, 647 Niterói
São Francisco RJ 24360-005 TEL. 2711-1519

E-MAIL vasilami@uol.com.br

INSTITUIÇÃO UFF - Universidade Federal Fluminense
UNIDADE Hospital Universitário Antonio Pedro
DEPARTAMENTO Anatomia patológica

PLANO DE APLICAÇÃO

CUSTEIO	10.200,00	
Mat. Consumo Nacionais		10.200,00
TOTAL		10.200,00

REPRESENTANTE DA INSTITUIÇÃO: Diretor do Departamento

RELATÓRIO(S) CIENTÍFICO(S) a serem apresentados no prazo de 12 (doze) meses após a data do último pagamento do Auxílio.

PRESTAÇÃO DE CONTAS a ser apresentada no prazo de 12 (doze) meses após a data do último pagamento do Auxílio. **(com devolução de saldo, se houver)**

Declaro que os dados acima foram conferidos por mim nesta data, estando os mesmos corretos.

Rio, 21 de Junho de 2013.

Vania Gloria Silami Lopes
Assinatura

