



Universidade Federal Fluminense

MARCOS ANTONIO NUNES COSTA SILAMI

**IMUNOEXPRESSÃO DO CCR7 EM CARCINOMAS DE CÉLULAS
ESCAMOSAS EM LÍNGUA E ASSOALHO DE BOCA COM E SEM
METÁSTASES EM LINFONODOS CERVICAIS**

Niterói

2011

MARCOS ANTONIO NUNES COSTA SILAMI

**IMUNOEXPRESSÃO DO CCR7 EM CARCINOMAS DE
CÉLULAS ESCAMOSAS EM LÍNGUA E ASSOALHO DE
BOCA COM E SEM METÁSTASES EM LINFONODOS
CERVICAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre.

Área de concentração: Patologia Humana
Linha de Pesquisa: Doenças Orais

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Simone de Queiroz Chaves Lourenço

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Vânia Glória Silami Lopes

Niterói

2011

MARCOS ANTONIO NUNES COSTA SILAMI

**IMUNOEXPRESSÃO DO CCR7 EM CARCINOMAS DE CÉLULAS
ESCAMOSAS EM LÍNGUA E ASSOALHO DE BOCA COM E SEM
METÁSTASES EM LINFONODOS CERVICAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal Fluminense, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre. Área de concentração: Patologia Humana. Linha de pesquisa: Doenças Orais.

Aprovado em _____ de 2011.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fábio Ramôa Pires (examinador prévio)

Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Prof. Dr. Fernando Luiz Dias

Instituto Nacional do Câncer

Prof^a. Dr^a. Nathalie Henriques Silva Canedo

Universidade Federal do Rio de Janeiro

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFF, pela oportunidade na realização do mestrado. À secretária Thereza Christina Fontana pela perfeição no exercício de suas funções.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Patologia, responsáveis pelo meu aprendizado e formação em patologia despertando a curiosidade científica.

À Vânia, secretária do Dr. Fernando Luiz Dias, aos funcionários do arquivo da DIPAT e à Lucinéia, do arquivo médico, obrigado pela ajuda e paciência.

À Professora Andréa Pires, obrigado pela enorme disponibilidade e simpatia na participação efetiva deste trabalho.

À Professora Eliene Carvalho da Fonseca cujo apoio e confiança no laboratório de Imuno-histoquímica viabilizaram a realização deste trabalho. Às funcionárias do laboratório, Katia Valéria e Mônica Panasco pela ajuda inestimável, foram longas horas de conversas.

Aos funcionários do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do HUAP, Maria, Lili e Rick por me acolherem de forma tão gentil, e em

especial à Aracy, por estar sempre disposta a ajudar a todos. Obrigado pela paciência com as inúmeras brincadeiras.

Às técnicas da patologia Aline e Lívia e o técnico Antonio Carlos, a paciência e a colaboração neste trabalho ficarão marcadas para sempre. Quantos linfonodos!! Meu muito obrigado.

As funcionárias Kátia, Anete e Valéria por sempre atenderem as minhas solicitações.

Aos amigos da minha turma de mestrado. Caminhamos juntos durante essa jornada, em especial a super dupla Juliana Noronha e Simone Gonçalves, que me ajudaram muito. Mantenham sempre a calma, vocês são demais.

Ao grupo BRODERS, que me confirmou que a união faz a força. A lealdade e a cumplicidade desse grupo são emocionantes. Faço questão de citar o nome de cada um: Ana Flávia, Assis, Dani Camisasca, Julia, Juliana, Luisa, Renata, Thais, Rhayany, Elisa, Vagner, André, Daniela (Mumu), Silvia Paula, Cintia. Cada um sabe o quanto me ajudou em todas as etapas desse trabalho.

À responsável por esse grupo dar certo, a nossa orientadora professora Simone Lourenço, um exemplo de 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.

À decana do serviço de patologia professora/tia/coorientadora Vânia Silami, exemplo de vida e grande incentivo profissional, querida por todos e bonita por natureza. Que beleza!!

Aos meus familiares, em especial minha tia Vilma, sempre torcendo de longe.

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.

À minha namorada Maíra, pela paciência e compreensão nas minhas frequentes ausências, pelo amor e carinho!! Obrigado pela força e palavras de incentivo. Te amo! A Zeliná, Robsón e Rafael, obrigado por me abrigarem na minha “segunda casa”.

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL.....	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	18
3.2 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	19
3.2.1 Critérios de inclusão	19
3.2.2 Critério de exclusão	20
3.2.3 Registro dos dados sócio-demográficos e clínico-patológicos	21
3.2.4 Seleção e preparo do material de estudo	21
3.2.5 Técnica Imuno-histoquímica	23
3.3 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	27
3.3.1 Descrição da população de estudo	27
3.3.2 Avaliação histopatológica do tumor	27
3.3.3 Gradação histopatológica da OMS	28
3.3.4 Avaliação histopatológica de risco (AHR)	29
3.3.5 Análise histopatológica dos linfonodos cervicais	33
3.4 AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	34
3.4.1 Pan-citoqueratina AE1/AE3	34
3.4.2 CCR7	35
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	35
3.5.1 Associação das variáveis	35
3.5.2 Análise de sobrevida	35
4 RESULTADOS	37

4.1	DESCRIÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	37
4.2	ANÁLISE DOS LINFONODOS CERVICAIS.....	38
4.2.1	Caracterização geral dos linfonodos isolados.....	38
4.2.2	Dados histopatológicos.....	38
4.2.3	Dados imuno-histoquímicos.....	39
4.3	DADOS SÓCIO-DEMOGRÁFICOS.....	42
4.4	DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS.....	44
4.5	DADOS DE SEGUIMENTO.....	46
4.6	DADOS DAS GRADAÇÕES HISTOPATOLÓGICAS.....	47
4.7	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DO CCR7.....	50
4.8	ANÁLISE DE SOBREVIDA.....	54
4.8.1	Análise de sobrevida global.....	54
4.8.2	Análise de sobrevida livre de doença.....	61
5	DISCUSSÃO.....	66
6	CONCLUSÕES.....	77
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
8	ANEXOS.....	86

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AHR	Avaliação histopatológica de risco
CCE	Carcinoma de células escamosas
CCEO	Carcinoma de células escamosas oral
CC19	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 19</i>
CCL21	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 21</i>
CCR7	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 7</i>
CCR10	<i>Chemokine (C-C motif) receptor 10</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
cT	Variável T (tamanho) do TNM clínico
cTNM	Estadiamento clínico
cN	Variável N (linfonodos) do TNM clínico
cN+	Variável N (linfonodos) positiva do TNM clínico
cN0	Variável N (linfonodos) negativa do TNM clínico
CM	Grupo com metástase
CXCR4	<i>Chemokine (CXC motif) receptor 4</i>
DAB	Diaminobenzidina
DIPAT	Divisão de Patologia
HE	Hematoxilina / Eosina
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
IFN	Interferon
IHQ	Imuno-Histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
ITC	Células isoladas de tumor
kDa	Quilodalton
MM	Micrometástase
mRNA	Ácido ribonucléico – mensageiro
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pan-Ck AE1AE3	Pan-citoqueratina AE1AE3
pN	Variável N (linfonodos) do TNM patológico
pN+	Variável N (linfonodos) positiva do TNM patológico
pN0	Variável N (linfonodos) negativa do TNM patológico
pT	Variável T (tamanho) do TNM patológico
pTNM	Estadiamento patológico
PPG	Programa de Pós-Graduação
RT-PCR	Reverse transcription - polymerase chain reaction
RJ	Rio de Janeiro
SM	Grupo sem metástase
SPSS	Statistical Package for Social Sciences
TNF- α	Fator de necrose tumoral – alfa
TNM	Classificação de tumores malignos
UFF	Universidade Federal Fluminense

RESUMO

A presença de metástase em linfonodos cervicais tem se destacado como principal fator de pior prognóstico e menor sobrevida para o carcinoma de células escamosas oral (CCEO). A metástase é um processo complexo, que resulta das interações de células malignas com o microambiente tecidual. A interação quimiotática entre o CCR7, expresso no tumor, e o seu ligante CCL21, expresso nos linfonodos cervicais (órgão-alvo), apresenta-se como um mecanismo quimiotático de células tumorais. A imunopositividade do CCR7 está associada à presença de metástase em linfonodos cervicais. O objetivo geral desse estudo foi avaliar e comparar a imunoexpressão da proteína CCR7 em carcinomas de células escamosas primários em língua e assoalho de boca e nos respectivos linfonodos cervicais em pacientes com e sem metástase cervical. O estudo foi retrospectivo e descritivo que utilizou material em parafina referentes a peças cirúrgicas de CCEO localizados em língua e assoalho de boca, submetidos à cirurgia associada ao esvaziamento cervical e seus linfonodos cervicais, diagnosticados no INCA, em 2001. Os dados sócio-demográficos e clínico-patológicos foram registrados. As lâminas dos CCEO foram reavaliadas em HE para confirmação do diagnóstico e aplicação das classificações histopatológicas da OMS e AHR. Os linfonodos foram reavaliados em HE quanto à presença ou não de metástases e essa análise complementada com recortes semi-seriados corados em HE e reação imuno-histoquímica (IHQ) utilizando o anticorpo anti-citoqueratina AE1/AE3 nos linfonodos cervicais níveis I, II e III, considerados livres de metástases. Com esses resultados a população de estudo foi dividida em dois grupos: sem metástase (SM) e com metástase (CM). Em seguida, foi avaliada a imunoexpressão do CCR7 em tumores e linfonodos metastáticos. Os resultados IHQ qualitativos foram correlacionados aos dados sócio-demográficos e clínico-patológicos. Foram coletados os dados de 524 pacientes no ano de 2001 que após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão foram eliminados 483 pacientes, obtendo a população de estudo final 41 pacientes. Os recortes em HE e a pan-CK AE1/AE3 realizados em 29 pacientes evidenciaram três metástases (10,3%) e duas micrometástases (6,9%) nos linfonodos cervicais dividindo a população de estudo em grupo SM (24 pacientes) e grupo com metástase (17 pacientes). A associação das variáveis entre os grupos revelou significância estatística com o estadiamento patológico ($p=0,001$). A expressão do CCR7 no tumor apresentou tendência significativa nas associações entre os grupos ($p=0,058$) e com a espessura ($p=0,051$). No grupo SM, a pior sobrevida global foi significativa para pacientes não etilistas ($p=0,0001$), não-tabagistas ($p=0,0002$) com cT III e IV ($p=0,004$) e AHR de baixo risco ($p=0,0001$). No grupo CM, houve pior sobrevida global em pacientes com histórico de câncer na família ($p=0,0075$) e presença de recidiva ($p=0,014$). A sobrevida livre de doença foi pior apenas no grupo SM, em pacientes não-etilistas ($p=0,0116$) e AHR baixo risco ($p=0,039$). CCE em língua e assoalho de boca apresenta metástases ocultas com alta frequência (29,3%). O recorte dos linfonodos associado à reação da pan-CK AE1/AE3 é uma importante ferramenta complementar, na detecção de metástases linfonodais. A expressão positiva do CCR7 nos tumores apresentou tendência significativa para metástase em linfonodos cervicais e espessura do tumor. A imunoexpressão da quimiocina CCR7 mostra-se maior em tumores de pacientes que apresentam metástase cervical devendo ser mais investigada como potencial biomarcador de metástase cervical e prognóstico para CCEO.

Palavras-chave: câncer da boca, carcinoma de células escamosas, língua, assoalho, metástase em linfonodos cervicais, pan-citoqueratina AE1/AE3, CCR7.

ABSTRACT

Cervical lymph nodes metastasis occurrence has been highlighted as the main factor of both worse prognosis and survival for oral squamous carcinoma cell (OSCC). Metastasis is a complex process resulted from malign cells and tissue microenvironment interaction. Chemotatic interaction between tumor-expressed CCR7 and its ligand, cervical-lymph-node-expressed (target organ) CCL21 shows itself as a tumor cell chemotatic mechanism. CCR7 immunopositivity is associated with metastasis presence in cervical lymph nodes. This study purpose is to evaluate and compare the CCR7 protein immunoexpression in tongue and floor of mouth primary SCC and in its respective cervical lymph nodes in patients with and without cervical metastasis in a retrospective and descriptive model using paraffin embedded samples from surgical parts of tongue and floor of mouth OSCC in patients who had undergone surgery associated with neck and its cervical lymph nodes dissection, all of them diagnosed at INCA in 2001. Sociodemographical and clinical and pathological data were registered. OSCC sections were reevaluated using H&E staining for diagnosis confirmation and application of WHO and AHR histopathological classifications. Lymph nodes sections were reevaluated using H&E staining for whether the presence or not of metastasis, complemented with semi-seriated H&E-stained sections and immunohistochemical (IHC) reaction using anti-cytokeratin AE1/AE3 antibody in cervical lymph nodes levels I, II, and III when metastasis-free. Based on the results, the whole study population was separated in two groups: without metastasis (WOM) and with metastasis (WM). Then, CCR7 immunoexpression in metastatic tumors and lymph nodes was evaluated. Qualitative IHC results were correlated to sociodemographical and clinical and pathological data. From all of the 524 patients who had their data gathered in 2001, inclusion and exclusion criteria eliminated 483 of them, resulting in a final study population of 41 patients. H&E-stained and pan-CK AE1/AE3-immunostained sections from 29 patients showed 3 metastasis (10.3%) and 2 micrometastasis (6.9%) in cervical lymph nodes, so that WOM group (n = 24) and WM (n = 17) were separated. Variables association between groups revealed statistic significance with pathological stage (p=0.001). CCR7 expression in tumors had a significant tendency in association between groups (p=0.058) as well as with tumor thickness (p=0.051). In WOM group, worse global survival was significant in non-alcoholic patients (p=0.0001), non-smokers patients (p=0.0002), with cT III and IV (p=0.004), and low risk AHR (p=0.0001). In WM group, there was worse survival in patients with family history of cancer (p=0.0075) and recidivism (p=0.014). Disease-free survival was worse only in the WM group, and in non-alcoholic patients (p=0.0116), and in low risk AHR (p=0.039). Tongue and floor of mouth SCC frequently presents hidden metastases (29.3%). Lymph nodes sectioning associated with pan-CK AE1/AE3 reaction were found to be an important complementary tool in lymph nodes metastases detection. CCR7 positive expression in tumors had a significant tendency in cervical lymph nodes metastases and tumor thickness. Chemokine CCR7 higher immunoexpression in tumors of patients with cervical metastasis suggests its potential role as metastasis and OSCC prognosis biomarker to be confirmed with further investigations.

Key-words: oral cancer, squamous carcinoma cell, tongue, floor of mouth, cervical lymph nodes metastasis, pan-cytokeratin AE1/AE3, CCR7.

1 INTRODUÇÃO

Globalmente, o câncer oral apresenta-se como o sexto tipo mais comum de câncer (WARNAKULASURIYA, 2009; HORNER *et al.*, 2010). 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; NEVILLE *et al.*, 2009; WARNAKULASURIYA, 2009; SCULLY & BAGAN, 2009).

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 pequenas taxas de sobrevida (GERVÁSIO *et al.*, 2001; 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 TNM tem sido o padrão de classificação adotado para caracterizar os tumores, propor a terapia mais adequada e estimar a sobrevida dos pacientes. As informações obtidas

através dos exames clínicos e de imagem são utilizadas para estabelecer o estágio clínico (cTNM). 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 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004; HONORATO *et al.*, 2009; BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2010).

Dependendo da localização, da extensão do tumor primário e do envolvimento dos linfonodos cervicais, o tratamento do câncer oral pode ser cirúrgico, radioterápico ou uma combinação de ambos. O tratamento do tumor é preferencialmente ressecção cirúrgica com margem de pelo menos 1,0 cm. 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-omo-hióideo (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; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; KOWALSKI & SANABRIA, 2007). Entretanto, alguns autores reforçam que a melhor terapia para esse grupo de pacientes permanece controversa (BYERS *et al.*, 1998; KOWALSKI & SANABRIA, 2007), embora BAJWA *et al.* (2011) tenham reportado em seu estudo, através da comparação do tratamento de 87 pacientes com CCEO com 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 metástase em linfonodos cervicais revela-se como o principal fator prognóstico para o CCEO (WOOLGAR, 1999; FERLITO *et al.*, 2002; HOLLENBEAK *et al.*, 2001; KOWALSKI & SANABRIA, 2007; SANO & MYERS, 2007; DAS & SKOBE, 2008; LIU *et al.*, 2011; NATAJARAN & EISENBERG, 2011). A avaliação dos linfonodos torna-se necessária para estadiamento do tumor, determinação do prognóstico e para o planejamento de estratégias terapêuticas (TRAPPEN & PEPPER, 2002).

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 identificados 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 pequenas micrometástases (MMs) ou células isoladas de tumor (ITC) (ATULA *et al.*, 2009).

A presença de células tumorais ocultas metastáticas, clinicamente indetectáveis pode explicar porque a recidiva é frequente 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).

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), tais como aquelas da regulação no tráfego dos linfócitos (WILEY *et al.*, 2001).

A interação quimiotática entre o receptor de quimiocina 7 (CCR7) e o seu ligante de quimiocina 21 (CCL21) pode ser um mecanismo de atração de células tumorais para os linfonodos em tumores de cavidade oral. (CAMPOFIORITO, 2006)

O CCR7 medeia a adesão de leucócitos e a quimiotaxia dos locais periféricos da inflamação por meio das cadeias linfáticas para órgãos linfóides secundários. A expressão aberrante do CCR7 tem sido identificada em certos tumores e associada à pior sobrevida e as vias de invasão (MBURU *et al.*, 2006).

A expressão do CCR7 foi identificada nos CCE primários e nos CCE metastáticos e mostrou-se significativamente associada ao maior tamanho do tumor, metástase em linfonodos, estágio clínico, recidiva e morte pela doença. O grupo de tumores CCR7 positivos apresentou baixa incidência de pacientes livres de doença metastática e menor sobrevida global (TSUZUKI *et al.*, 2006; SHANG *et al.*, 2009).

Como indica a literatura recente, a investigação da expressão da proteína CCR7 em CCEO pode ser útil para prever o prognóstico dos pacientes com potencial de metástase cervical (UEDA *et al.*, 2010). É importante aprofundar esses estudos em populações acometidas por câncer, especialmente com mesma localização, e com potencial de produção de metástases, como em língua e assoalho de boca, para se validar a futura aplicabilidade dessas moléculas como biomarcadores de metástases cervicais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Comparar a imunexpressão da proteína CCR7 em CCE primários em língua e assoalho de boca e nos respectivos linfonodos cervicais em pacientes com e sem metástase cervical.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Descrever as características sócio-demográficas e clínico-patológicas da população de estudo de pacientes com CCE em língua e assoalho de boca diagnosticados no Instituto Nacional do Câncer (INCA), no ano de 2001;
2. Reavaliar, em HE, os casos de CCE em língua e assoalho de boca para aplicação das classificações histopatológicas da Organização Mundial de Saúde (OMS) e Avaliação Histopatológica de Risco (AHR) e os linfonodos cervicais quanto à presença ou não de metástases;

3. Avaliar, a partir de recortes semi-seriados em HE e pela expressão IHQ do anticorpo anti-pan-citoqueratina (clone AE1/AE3), a presença de células epiteliais neoplásicas nos linfonodos cervicais diagnosticados livres de neoplasia;
4. Comparar a imunexpressão da proteína CCR7 no tumor primário nos grupos CM e SM, e nos linfonodos cervicais metastáticos do grupo CM;
5. Investigar a associação da imunopositividade do CCR7 nos CCE em língua e assoalho de boca com e sem metástases e nos linfonodos cervicais com metástases com os dados sócio-demográficos e clínico-patológicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa do INCA e aprovado sob o protocolo nº 44/10. **(ANEXO I)**

3.1. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Este trabalho foi desenvolvido através de uma parceria do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal Fluminense (PPG – UFF), Niterói, RJ, com o INCA, Rio de Janeiro, RJ.

Como o presente estudo visava primordialmente avaliar fatores prognósticos e preditivos do CCEO foi realizado um estudo retrospectivo que utilizou material incluído em parafina referente a peças cirúrgicas de CCEO primários e os respectivos linfonodos cervicais, diagnosticados no INCA, no período entre 1º de janeiro de 2001 e 31 de dezembro de 2001.

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 feito o levantamento dos pacientes registrados com CCEO no período de janeiro a dezembro de 2001.

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

3.2.1. Critérios de inclusão

1. Pacientes com diagnóstico anátomo-patológico de CCEO realizado entre 1º de janeiro de 2001 e 31 de dezembro de 2001;
2. Pacientes submetidos à ressecção cirúrgica como tratamento inicial quer seja seguida ou não de radioterapia ou quimioterapia adjuvante;
3. Tumor com localização primária em língua e/ou assoalho de boca;
4. Pacientes nos quais a cirurgia tenha sido realizada em associação com esvaziamento cervical;
5. Material embocado em parafina com qualidade e em quantidade suficientes para a realização da análise imuno-histoquímica, tanto do tumor quanto dos linfonodos cervicais;

6. Margens cirúrgicas livres de neoplasia ou displasia epitelial severa.

3.2.2 Critérios de exclusão

1. Pacientes com CCEO localizados em lábio e orofaringe (incluindo base de língua), área retromolar, gengiva superior, gengiva inferior, mucosa jugal ou palato duro;
2. Pacientes com dados demográficos e clínico-patológicos indefinidos ou ausentes;
3. Ausência de laudos histopatológicos tanto da lesão primária em boca quanto dos linfonodos cervicais;
4. Indisponibilidade dos blocos de parafina do tumor e dos linfonodos no arquivo da DIPAT do INCA;
5. Tumores classificados como carcinoma *in situ*.
6. Pacientes jovens, com idade ≤ 45 anos.

Foram selecionados 524 pacientes, e após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão acima citados, foram eliminados 483 prontuários obedecendo uma ordem, obtendo assim 41 pacientes selecionados. **(ANEXO II)**

Dos 41 pacientes, 12 tinham história de metástase cervical e 29 sem metástase cervical sendo separados em dois grupos com metástase (CM) e sem metástase (SM).

3.2.3 Registro dos dados sócio-demográficos e clínico-patológicos

Os dados referentes aos pacientes incluídos neste estudo foram armazenados na ficha de registro previamente confeccionada (**Anexo III**).

Dos prontuários analisados foram registradas as informações referentes ao paciente (sexo, idade, história de tabagismo e de etilismo), ao tumor (data da biópsia, localização do tumor), estadiamento clínico (cTNM), estadiamento patológico (pTNM), data do início do tratamento, presença de outros tumores, presença de recidiva, presença de metástases à distância, cálculo da sobrevida global, livre de doença e específica, a data da última consulta de acompanhamento ou do óbito do paciente. Com base no laudo anátomo-patológico foram registradas as informações referentes aos linfonodos cervicais esvaziados (quanto à presença ou não de metástases, nível acometido e presença de metástase extracapsular), sobre o tumor (tamanho, espessura, localização do tumor e gradação histopatológica segundo OMS); sobre as margens cirúrgicas (livres ou com presença de displasia), sobre a ocorrência e a data de recidivas e quanto à presença de metástases regional e à distância.

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, em conformidade com os procedimentos técnicos histológicos de rotina do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP), da Universidade Federal Fluminense (UFF) 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 três lâminas: a primeira para coloração em HE e as seguintes preparadas com silano para IHQ e uma extra.

Nos linfonodos cervicais o processamento ocorreu de forma distinta. No grupo SM foram realizados cortes semi-seriados com intervalo de 150 µm entre os cortes selecionados, com objetivo de investigar a presença de micrometástases cervicais nesse grupo de pacientes. 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 e duas extras, de forma igual foram realizadas as lâminas de 5 a 8. Nesse

protocolo no grupo CM foram obtidas cinco lâminas: a primeira para coloração em HE, e as demais com silano, para IHQ e duas extras (**TAB. 1**).

TABELA 1. Protocolo de recorte dos blocos dos grupos sem metástase e com metástase.

	SEM METÁSTASE	COM METÁSTASE
TUMOR	1ª Lâmina: HE 2ª Lâmina: IHQ (CCR7) 3ª Lâmina: EXTRA	1ª Lâmina: HE 2ª Lâmina: IHQ (CCR7) 3ª Lâmina: EXTRA
LINFONODOS	1ª Lâmina: HE 2ª Lâmina: IHQ (CK) 3ª Lâmina: EXTRA 4ª Lâmina: EXTRA 5ª Lâmina: HE 6ª Lâmina: IHQ (CK) 7ª Lâmina: EXTRA 8ª Lâmina: EXTRA	1ª Lâmina: HE 2ª Lâmina: IHQ (CCR7) 3ª Lâmina: IHQ 4ª Lâmina: EXTRA 5ª Lâmina: EXTRA



150 µm

3.2.5 Técnica imuno-histoquímica

As reações IHQ foram realizadas no laboratório de IHQ do Serviço de Anatomia Patológica do HUAP-UFF – Niterói – RJ sob a supervisão da Profa. Eliene Carvalho da Fonseca.

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-CCR7 (diluição 1:150) (**TAB. 2**). Esses protocolos foram estabelecidos a partir de testes de padronização desenvolvidos e utilizou-se num primeiro momento como controles positivos para os anticorpos pan-CK AE1/AE3 e CCR7, CCE e próstata, respectivamente (segundo orientações do fabricante). Os anticorpos foram testados nos tecidos utilizados no estudo. Foram necessários pequenos ajustes para obtenção do protocolo final, dessa forma, para os anticorpos anti-pan-citoqueratina AE1/AE3 e CCR7 utilizou-se como controle positivo CCEO e como controle negativo foi feita a omissão do anticorpo primário, com o objetivo de assegurar a sensibilidade e especificidade da técnica.

TABELA 2. Padronização final dos anticorpos.

Anticorpo Primário	Clone	Fornecedor	Diluição	Recuperação antigênica (banho maria)	Ac secundário	Revelação
ANTI-CITOQUERATINA	AE1AE3	DAKO	1:400	Citrato pH 6	MACH 4	DAB
ANTI-CCR7	MM0067-9L11	ABCAM	1:150	Citrato pH 6	MACH 4	DAB + DAB <i>Enhancer</i>

A pan-CK AE1/AE3 foi usada somente nos casos de linfonodos cervicais do grupo SM (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), com o objetivo de identificar possíveis micrometástases não identificadas nas avaliações morfológicas em HE e dividir definitivamente os grupos CM e SM da população em estudo.

O anticorpo CCR7 foi utilizado nas lâminas correspondentes ao tumor primário do grupo SM e no tumor e no linfonodo metastático do grupo CM.

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).

No protocolo utilizado para o anticorpo CCR7, foi utilizado após o DAB cromógeno, o reagente DAB *Enhancer* (Solução pronta para uso, ZYMED® Laboratories) por 5 minutos, com a finalidade de intensificar a reação obtida pelo cromógeno. As demais etapas foram idênticas para os anticorpos.

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 – **TAB. 3**) por dois avaliadores, usando microscópio de luz, de forma independente. Também foi aplicada a avaliação histopatológica de risco proposta por BRANDWEIN-GENSLER *et al.* (2005) (**TAB. 4**).

A aplicação das duas classificações possibilitou a análise de quatro características morfológicas principais: a diferenciação celular, 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 caracterizam-se pelo predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, bem como mínima ceratinização (BARNES *et al.*, 2005). 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**.

TABELA 3. Classificação histopatológica recomendada pela OMS, 2005.

Fonte: Adaptado de BARNES L *et al.* World Health Organization Classification of Tumours. Lyon: IARC Press. 2005, p. 118-21.

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

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

Avaliação Histopatológica de Risco (AHR)			
Variável Histopatológica	Valores Atribuídos		
	0	1	3
Invasão perineural	Nenhum	Pequenos nervos	Grandes nervos
Infiltrado linfocitário	Contínuo	Grandes agregados	Pouco ou nenhum
Pior padrão de invasão	Padrão 1, 2 ou 3	4	5
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 (**FIG. 1**).

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. (**FIG. 2**).

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). Quando o tumor não estava acometendo a bainha do nervo, não foi considerado como invasão perineural.

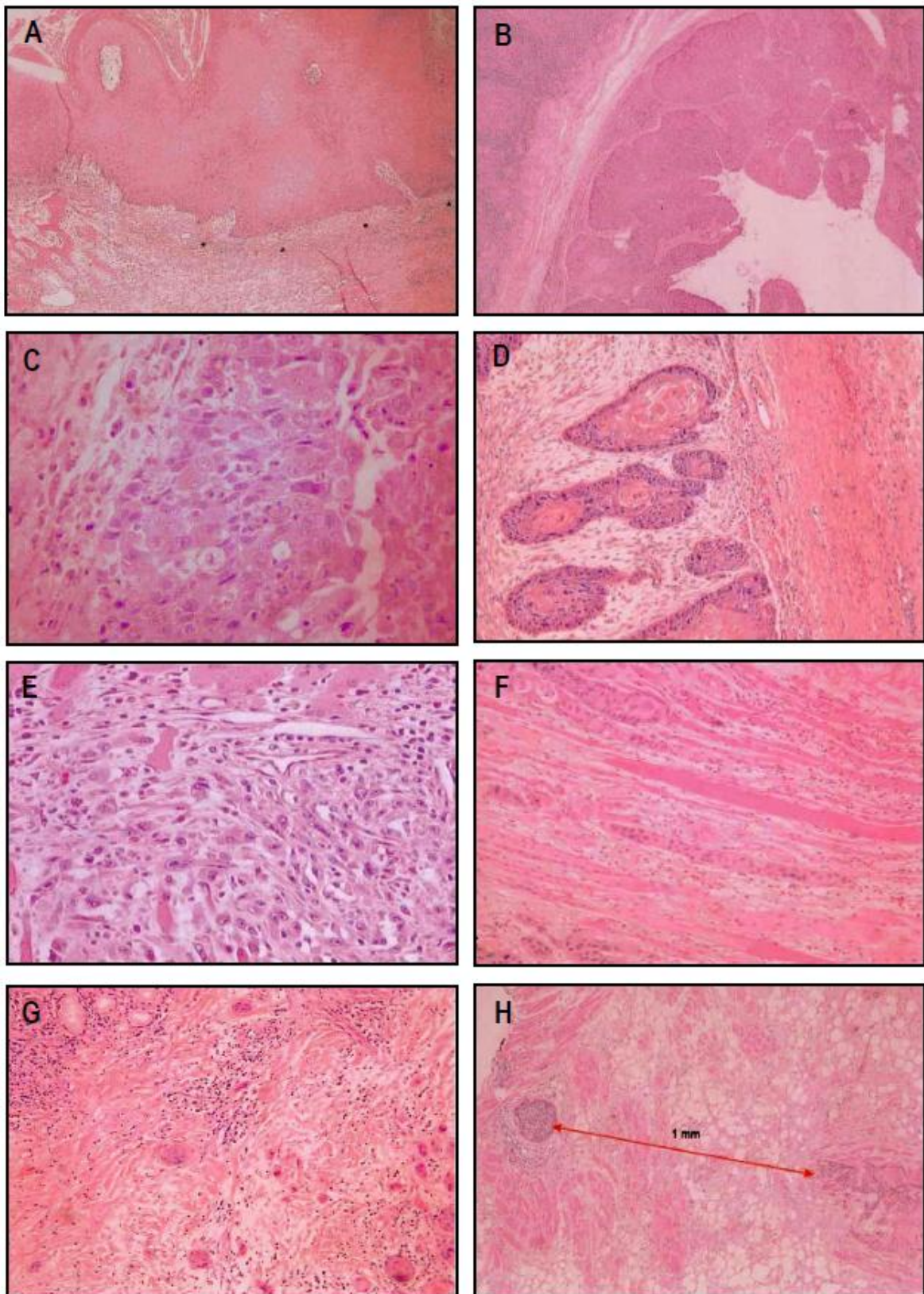


FIGURA 1. Padrões de Invasão do Carcinoma de Células Escamosas. A – padrão 1: frente ampla de invasão. B – padrão 2: padrão “semelhante a dedos”. C – padrão 2: pleomorfismo nuclear, apesar do padrão de invasão inócuo. D – padrão 3: ilhas na periferia tumoral com mais de 15 células. E – padrão 4: cordões 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).

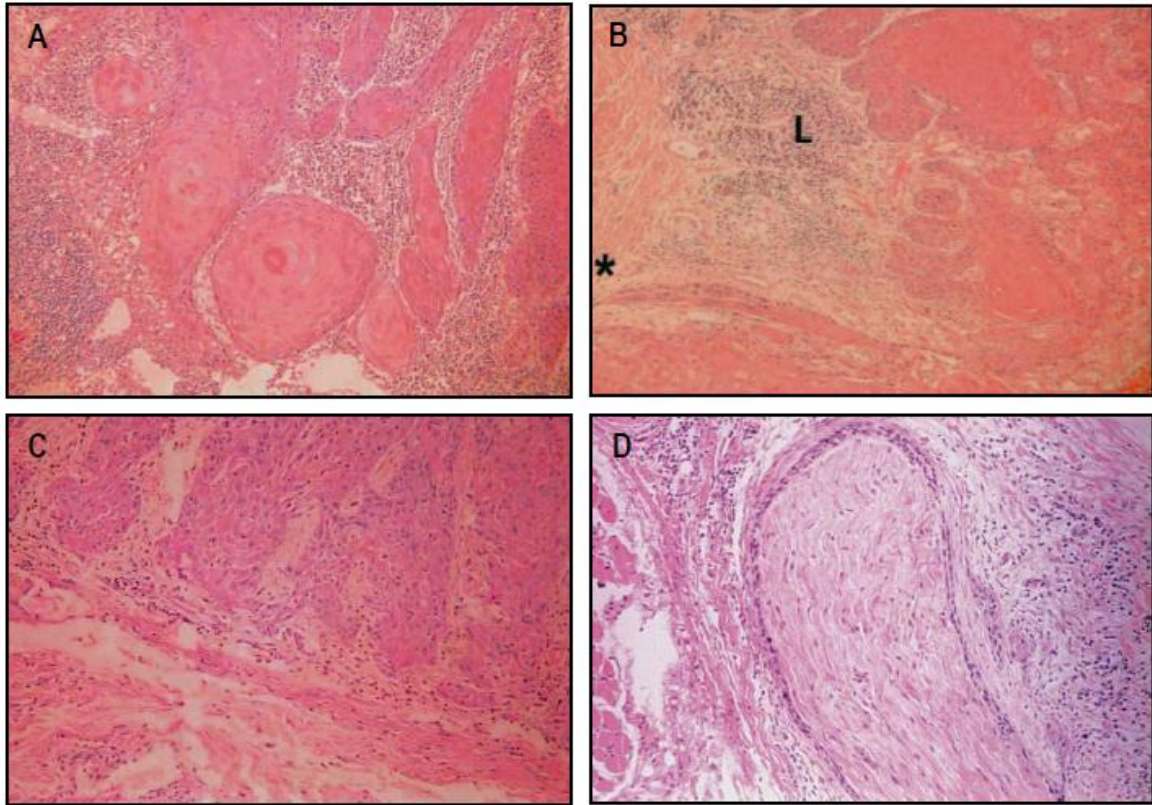


FIGURA 2. Infiltrado linfocitário. A – padrão 1: tecido linfóide contínuo e denso na interface. B - padrão 2: agregados de infiltrado linfóide presente na interface (L), mas o infiltrado se mostrava descontínuo (*). C – padrão 3: resposta linfocitária limitada, sem a formação de agregados linfóides. 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) e da reavaliação histopatológica em HE quanto à

presença ou não de metástases, realizou-se a primeira divisão da população do estudo em dois grupos:

- Pacientes com CCE em língua e assoalho de boca sem metástases em linfonodos cervicais (SM)
- Pacientes com CCE em língua e assoalho de boca com metástases em linfonodos cervicais (CM)

No grupo SM todos os linfonodos dos níveis I, II e III foram recortados e os cortes semi-seriados reavaliados em HE quanto a presença ou não de metástases

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* (UICC, 2002) define micrometástase como um depósito de tumor que está entre 0,2 mm e 2,0 mm, sendo macrometástase depósitos maiores que 2,0mm.

3.4.2 CCR7

Foi realizada análise qualitativa, quanto à positividade ou não do anticorpo primário nas células tumorais, tanto no tumor quanto no linfonodo metastático. Foi considerado como marcação positiva, o citoplasma e a membrana plasmática das células tumorais.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os registros das informações clínicas e microscópicas dos pacientes com CCEO foram armazenados em um banco de dados elaborado em planilha do Microsoft Excel. A análise estatística utilizou o software SPSS (Statistic Package for Social Sciences) versão 10.0.

3.5.1 Associação das variáveis

Para avaliar a associação entre as 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

O estudo da sobrevida utilizou a análise de Kaplan-Meier e o teste logrank para comparação das curvas. Para a avaliação da sobrevida foram consideradas as

datas do óbito *versus* a duração da sobrevida global, e para apreciação da recidiva a data da recidiva *versus* a duração do acompanhamento livre de doença.

Foram considerados “não censurados” para os cálculos da sobrevida global e recidiva todos os casos em que ocorreu o evento de interesse (óbito para a sobrevida global e recidiva para a sobrevida livre de doença). Os casos em que os eventos não ocorreram até a data da última informação objetiva do acompanhamento foram classificados como “censurados”.

Não foi possível inserir as variáveis significativas pelo teste do log rank usado na Análise de Kaplan-Meier, no Modelo de Regressão de Cox para determinar a contribuição individual das co-variáveis em relação à sobrevida devido ao pequeno número de casos do presente estudo.