

## 5 DISCUSSÃO

Globalmente, o câncer oral é o sexto tipo mais comum de câncer (WARNAKULASURIYA, 2009; HORNER *et al.*, 2010), sendo o CCE o responsável por mais de 90% das neoplasias malignas diagnosticadas na cavidade oral (WONG *et al.*, 1996; NOLLET *et al.*, 1999; NEVILLE *et al.*, 2009; SCULLY, 2009; WARNAKULASURIYA, 2009).

O perfil dos pacientes acometidos pelo câncer oral é do sexo masculino com idade mais avançada, à partir da 6<sup>a</sup> década de vida, cor de pele branca, tabagistas e etilistas (LOFFREDO *et al.*, 2006; BRANDWEIN-GENSLER *et a.*, 2010; CAMISASCA *et al.*, 2011; ZYGOGIANNI *et al.*, 2011), nota-se que trabalhos de diferente perfis 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). Nesse estudo, optou-se por excluir pacientes adultos jovens com menos de

45 anos, pois a literatura descreve a possibilidade de tratar-se de um grupo distinto de pacientes com etiopatogenia específica para o câncer bucal. (POPOVTZER *et al.*, 2004) A proporção homens e mulheres nesse trabalho foi de 1,5:1 igual da literatura em geral (WARNAKULASURIYA, 2009)

Embora tenha se obtido um avanço nas técnicas cirúrgicas, em abordagens multidisciplinares de tratamento e novas drogas antineoplásicas tenham surgido, a sobrevivência 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) com os pacientes ainda sucumbindo à doença metastática (MBURU *et al.*, 2006).

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 do conteúdo cervical para definir o N (acometimento ou não de linfonodos), caracterizando dessa forma o estadiamento mais fiel do tumor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Comparando os dados da população desse estudo os estadiamentos clínicos I e II predominavam em ambos os grupos CM e SM. O grupo CM apresentou apenas estádios patológicos tardios (III e IV), influenciado pelo comprometimento de linfonodos cervicais e essa associação se mostrou estatisticamente significativa, caracterizando um subgrupo de grande interesse.

Esses pacientes com tumor de língua e assoalho de boca apresentaram estadiamento clínico inicial (I e II) e patológico avançado (III e IV), justamente pela alta taxa de metástases ocultas (29,3%).

A presença de metástases em linfonodos cervicais é o mais importante fator prognóstico (WOOLGAR, 1999; FERLITO *et al.*, 2002; HOLLENBEAK *et al.*, 2001; KOWALSKI & SANABRIA, 2007; SANO & MYERS, 2007; DAS & SKOBE, 2008; NATAJARAN & EISENBERG, 2011; LIU *et al.*, 2011) sendo uma variável independente para determinar a sobrevida dos pacientes (MYERS, 2010). HOLLENBEAK *et al.*, (2001), dividiram sua amostra através de exames de imagem (tomografia computadorizada (TC) e tomografia por emissão de pósitrons (PET) e comparou os grupos com e sem envolvimento de linfonodos e encontrou associação estatisticamente significativa ( $p < 0,00001$ ) para a sobrevida. De forma semelhante HONORATO *et al* (2009) em estudo epidemiológico concluíram que a ausência de linfonodos acometidos ao 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 exame ainda não realizado em 2001. A caracterização dos linfonodos comprometidos foi feita primariamente no exame clínico e confirmada ou não no 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 (SANO & MYERS *et al.*, 2007; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; KOWALSKI & MEDINA, 2008).

Em sua revisão sobre o câncer oral, MYERS (2010), afirmou que o CCE apresenta propensão para metástase mesmo em estádios iniciais. Tumores em estágio iniciais I e II (cN0), localizadas 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, que se apresenta normalmente maior que 20%, podendo variar até 30% (PIMENTA-AMARAL *et al.*, 2004; CAMPANA & MEYERS, 2006; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; KOWALSKI & SANABRIA, 2007). No presente estudo sete (17,1%) dos 41 pacientes estudados apresentaram cN0 e após a cirurgia passaram pN+. Após realização da análise dos recortes submetidos a pan-CK AE1/AE3, mais cinco (12,2%) foram classificados pN+, totalizando 12 (29,3%) pacientes com presença de metástase oculta. O percentual de metástases ocultas encontrado nesse estudo se assemelha ao 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).

A radioterapia deve ser usada como tratamento complementar em casos de pescoço positivo com múltiplos linfonodos, extravasamento capsular, invasão angiolinfática e/ou perineural, doença residual microscópica ou lesão primária T3 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007), ou seja, pacientes que exibem fatores preditivos de pior prognóstico (BRENDWEIN-GENSLER *et al.*, 2005). No presente trabalho observou-se que do grupo CM, apenas 5 (29%) pacientes não realizaram

radioterapia adjuvante, sendo quatro dos casos nos quais foram localizadas micro e macrometástases após recortes em HE e IHQ. Desses quatro 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.* (2009) 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.

Na correlação das variáveis em relação aos grupos SM e CM, o estadiamento patológico mostrou associação estatisticamente significativa, o que é esperado pela forte influência do pN na classificação TNM, agrupando os pacientes pN+ em estádios avançados (III e IV). No acompanhamento dos pacientes, houve maior registro de recidiva no grupo SM (10 - 42%) quando comparado ao grupo CM (3 – 18%), diferente do que foi relatado por JERJES *et al* (2010). Dos 10 pacientes, sete (70%) manifestaram recidiva regional e apenas um foi tratado com radioterapia adjuvante. Pelo descrito a radioterapia complementar em pacientes com CCE em língua e assoalho de boca independente da identificação de metástases linfonodais parece impedir o aparecimento de recidivas regionais. Outro ponto interessante desses sete pacientes (grupo SM) com recidiva regional, três apresentaram imunomarcagem para CCR7 nos tumores podendo indicar ainda presença de metástases ocultas que justifiquem a progressão da doença.

A radioterapia adjuvante mostrou tendência estatisticamente significativa, entre os grupos SM e CM, o que era esperado, pois geralmente são submetidos à terapia adjuvante os pacientes nos quais se identifica algum fator de risco que indique doença mais agressiva, como por exemplo, metástase em linfonodos ou extravasamento capsular.

A análise de sobrevida global mostrou pior sobrevida para os pacientes não etilistas e não tabagistas do grupo SM, achados que diferem com os relatos da literatura (CAMISASCA *et al.*, 2011; ZYGOGIANNI *et al.*, 2011). Talvez o grupo de estudo possa estar relacionado a outros fatores de riscos associados ao CCEO. Nesse mesmo grupo a classificação AHR de baixo risco apresentou menor sobrevida global, esse foi um resultado inesperado e não se conseguiu justificar. As variáveis cT dos tumores avançados (III e IV) apresentaram pior sobrevida global, demonstrando que tumores maiores, apresentam comportamento mais agressivo. Dado bem estabelecido pela literatura (BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2010).

No grupo CM apresentaram pior sobrevida global pacientes com antecedentes familiares de câncer e pacientes que desenvolveram recidivas ao longo do acompanhamento, revelando que em pacientes com histórico de metástases quando evolui com aparecimento de recidivas, o desfecho óbito é comum (CAMISASCA *et al.*, 2011), A relação da hereditariedade com a etiopatogenia do CCEO é muito controversa na literatura (HIROTA *et al.*, 2008), devendo-se realizar mais trabalhos para comprovar essa possível correlação.

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 representa uma amostra muito pequena, cerca de um centésimo do linfonodo. Entretanto, ainda não existe um consenso quanto ao intervalo utilizado, sendo descritos 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 a *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 como intervalo 150 µm em duas etapas. A escolha de 150 µm de intervalo entre os recortes foi o padrão mais citado na literatura e acreditamos que duas etapas iriam permitir uma análise mais aprofundada dos linfonodos previamente considerados livres, mostrando-se bem 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 pan-CK AE1/AE3 foi sugerida para aumentar a taxa de detecção de micrometástases (TRAPPEN & PEPPER, 2002) 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 assoalho bucal, do grupo SM, sendo encontradas metástases ocultas em cinco pacientes (17,2%), todos previamente classificados em estágio clínico inicial. As 3 macrometástases foram evidenciadas tanto nos recortes em HE quanto na IHQ, no entanto os dois casos de micrometástases só puderam ser encontrados com a pan-

CK AE1AE3, destacando a importância da reação IHQ com esse propósito. No presente estudo a evolução dos dois pacientes acometidos foi o óbito. Outro ponto de discussão na literatura pertinente 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 dois casos do nosso trabalho não se pode concluir sobre o tema.

A quimiocina receptor 7 (CCR7) medeia a adesão de leucócitos e a quimiotaxia dos locais periféricos da inflamação através da cadeia linfática para órgãos linfóides secundários. É expresso em células dendríticas maduras, células B, células imaturas e algumas células T de memória. Seus ligantes de quimiocinas, CCL19 (MIP-3 $\beta$ /ELC) e CCL21 (6CKine/SLC), são predominantemente expressos pelas células do estroma de órgãos linfóides, sua expressão aberrante tem sido identificada em certos tipos de tumor e foi associada à sobrevida e a via de invasão. (MBURU *et al.*, 2006).

O presente estudo analisou a expressão do CCR7 em 41 casos de CCE de língua e assoalho bucal, comparando-os em dois grupos: o grupo SM apresentou 15 (63%) casos CCR7 negativos e 9 (38%) CCR7 positivos e o grupo CM, exibiu 5 (29%) casos CCR7 negativos e 12 (71%) CCR7 positivos. TSUZUKI *et al.* (2006) analisaram 90 pacientes com CCEO e orofaríngeo encontrando dados similares: para o grupo SM - 24 (53%) CCR7 negativos e 21 (47%) CCR7 positivos e para o grupo CM - 12(27%) CCR7 negativos e 33 (73%) CCR7 positivos. SHANG *et al.*



(2009) analisaram 85 pacientes com CCEO, encontrando expressão similar do CCR7 no grupo SM, porém no grupo CM dos 39 pacientes estudados, 31 (79%) apresentavam CCR7 positivo, evidenciando maior marcação nesse grupo.

A expressão positiva do CCR7 em CCEO mostrou uma taxa significativamente maior em pacientes com metástases em linfonodos cervicais em comparação a pacientes com expressão negativa do CCR7. No atual estudo, a expressão do CCR7 apresentou uma tendência estatisticamente significativa para metástases em linfonodos cervicais ( $p=0,058$ ), esse resultado pode ser provavelmente explicado pelo pequeno número de pacientes estudados. . Quando na realização do desenho desse estudo propôs-se estudar pacientes de um ano do INCA, que no levantamento inicial representavam 524 pacientes, não se esperava que com aplicação dos critérios de inclusão e exclusão ficaria tão reduzida. Por outro lado, cada vez mais a literatura valoriza trabalhos que estudam um mesmo sítio de CCEO e perfil semelhantes de pacientes/tumores, optando-se dessa forma por ter uma amostra menor, mas homogênea no seu perfil.

HUANG *et al.* (2009) e LODDER *et al.* (2011) consideraram a espessura do tumor como valor preditivo no CCE. No presente estudo a correlação da espessura do tumor e a expressão do CCR7 no tumor revelou tendência estatisticamente significativa ( $p=0,051$ ).

UEDA *et al.* (2010) estudaram 25 pacientes com CCE cabeça e pescoço e encontraram correlação estatisticamente significativa da expressão do CCR7 com pT, pN e grau de diferenciação. TSUZUKI *et al.* (2006) em estudo com 90 pacientes

com CCEO e orofaringe encontraram tal relação com as variáveis T, N, estágio clínico, recidiva e morte pela doença, bem como SHANG *et al.* (2009) com as seguintes variáveis: pior sobrevida global e livre de doença, cT, estágio clínico em 85 pacientes estudados. Estudos reportados na literatura demonstraram correlações estatisticamente significativas sobre a expressão positiva do CCR7 com diversas variáveis. No presente estudo a expressão do CCR7 foi analisada em relação as variáveis sócio-demográficas, clínico patológicas e dados de seguimento, nos grupos SM e CM, não apresentando correlações estatisticamente significativas, embora com tendência entre os grupos CM e SM e na espessura. Ainda assim, consideramos importante validar com mais trabalhos sua aplicabilidade na identificação de CCEO com potencial para metástase cervical.

No presente estudo, a expressão IHQ do anticorpo CCR7 em CCE, apresentou forte marcação citoplasmática e em membrana plasmática. Esses dados são reforçados pela literatura (TSUZUKI *et al.*, 2006; SHANG *et al.*, 2009; UEDA *et al.*, 2010). Na distribuição da imunomarcação do anticorpo CCR7 foi observada uma homogeneidade de expressão entre os casos positivos, não indicando necessidade de quantificação. Nos linfonodos metastáticos o padrão de expressão do anticorpo CCR7, apresentou marcação mais fraca, diferente de TSUZUKI, *et al.* (2006) que verificaram heterogênea imunomarcação tanto no tumor quanto nos linfonodos metastáticos.

Segundo UEDA *et al.*, (2010), especula em seu estudo que a indução de diferenciação celular pode influenciar na diminuição da expressão do CCR7 em CCE de cabeça e pescoço e inibir a metástase linfonodal. Se assim for, a diminuição de

expressão do CCR7 por esse mecanismo pode ter impacto clínico na prevenção de metástases linfonodais.. No presente estudo, o grupo SM apresentou dois pacientes com CCE bem diferenciados com expressão negativa do anticorpo CCR7 e seis pacientes com CCE pouco diferenciados com expressão positiva do CCR7 em três deles. No grupo CM, dois pacientes foram classificados como pouco diferenciados com expressão positiva do CCR7 em apenas um. Esses dados nos fazem refletir sobre a relação da classificação da OMS e a expressão do anticorpo CCR7 nos tumores, indicando uma possível relação entre a diferenciação celular e a expressão do CCR7.

Novos estudos devem ser realizados para confirmar o papel do CCR7 como biomarcador para prognóstico de metástase cervical em CCEO. E a regulação da expressão do CCR7 pode ser útil como estratégia para prevenir a progressão do CCEO.

## 6 CONCLUSÕES

1. Carcinomas de células escamosas localizados em língua e assoalho de boca apresentam metástases ocultas com alta frequência.
2. O recorte dos linfonodos associado à reação imuno-histoquímica da pancitoqueratina AE1/AE3 é uma importante ferramenta complementar na detecção de metástase linfonodal.
3. Pacientes do grupo sem metástase, não-etilistas, não tabagistas, com tumores em estadiamentos clínicos avançados e com avaliação histopatológica de baixo risco apresentam pior sobrevida global.
4. Pacientes do grupo com metástase apresentam antecedentes familiares de câncer e aparecimento de recidivas, associados à pior sobrevida global.
5. Pacientes do grupo sem metástase, não-etilistas e com avaliação histopatológica de baixo risco apresentam pior sobrevida livre de doença.

6. A quimiocina CCR7 mostra-se mais expressa em tumores de pacientes com metástase cervical.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AMORIM FILHO, F. et al. Paradigma de disseminação local do carcinoma epidermóide da base de língua. **Rev Bras Otorrinolaringol** 70(4): 471-477, 2004.
2. ANNEROTH, G. et al. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand J Dent Res** 95: 229-249, 1987.
3. ANNEROTH, G.; HANSEN, L. S. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. **Scand J Dent Res** 92(5): 448-468, 1984.
4. ATULA, T. et al. Micrometastases and isolated tumour cells in sentinel lymph nodes in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Eur J Surg Oncol** 35(5):532-8, 2009.
5. BAJWA, M. S. 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):403-6, 2011.
6. BARNES, L. et al. **World Health Organization Classification of Tumours**. Lyon: IARC Press. 2005, 118-121.
7. BEAVON, I. R. G. The E-cadherin complex in tumor metastasis: structure, function, and regulation. **Eur J Canc** 36(13): 1607-1620, 2000.
8. BELLO I. O. et al. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: Means, markers and perspectives. **Oral Oncology** 46:630–635, 2010.

9. BRANDWEIN-GENSLER, 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.
10. \_\_\_\_\_. Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Am J Surg Pathol** 34: 676–688, 2010.
11. BRODERS, A. C. The microscopic grading of cancer. **Surg Clin North America** 21(4): 947-962, 1941.
12. BRYNE, M. et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med** 18(8): 432-437, 1989.
13. \_\_\_\_\_. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J Pathol** 166(4): 375-381, 1992.
14. BYERS R. M. 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):138-44, 1998.
15. CAMISASCA, D. et al. Oral Squamous Cell Carcinoma: Clinicopathological Features in Patients with and without Recurrence. **ORL** (73):170–176, 201.
16. CAMPANA J.P.; MEYERS A. D. The surgical management of oral cancer. **Otolaryngol Clin North Am** 39: 331–348, 2006.
17. CAMPOFIORITO, C. **Correlação dos ligantes de quimiocina e de seus respectivos receptores em relação à invasão de linfonodos nos carcinomas epidermóides em cabeça e pescoço**. 429/2006. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
18. CHOI, K. et al. Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults. **Oral Oncol** 42(2): 208-217, 2006.
19. COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature** 26;420(6917):860-7, 2002.
20. DEL-SORDO, R. 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
21. DAS, S.; SKOBE, M. Lymphatic vessel activation in cancer. **Ann N Y Acad Sci** 1131:235-41, 2008.
22. DING, Y. et al. Association of CC chemokine receptor 7 with lymph node metastasis of esophageal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 9(9):3406-12, 2003.

23. FERLITO, 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.
24. GERVÁSIO, O. et al. Comparasion of differentiation markers between normal and two cell carcinomas of the oral cavity. **J Oral Pathol Med** 12(1):57-61, 2001.
25. GILLISON, M. L. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. **Head Neck** 29:779-92, 2007.
26. GREENBERG, J. S. et al. extent of extracapsular spread. A critical prognosticator in oral tongue cancer. **Cancer** 97:1464–70, 2003.
27. GUO, C. B. et al. Immunohistochemical staining with cytokeratin combining semi-serial section of cervical lymph node metastases of oral squamous cell carcinoma. **Auris Nasus Larynx** 34:347-351, 2007.
28. HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The Hallmarks of Cancer. **Cell Cell** 100:57–70, 2000.
29. HAMAKAWA, H. et al. Histological study on pN upgrading of oral cancer. **Virchows Arch** 437:116–121, 2000.
30. HIROTA, S. K. Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: A comparative analysis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** 13(4):227-31, 2008.
31. HOLLENBEAK, C. S. et al. The cost-effectiveness of fluorodeoxyglucose 18-F positron emission tomography in the N0 neck. **Cancer** 92(9):2341-8, 2001.
32. HORNER M.J.; RIES L.A.G.; KRAPCHO M. et al. SEER Cancer Statistics Review 1975 – 2006. **National Cancer Institute** Bethesda (MD). Disponível em: [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2006](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006). Acessado em janeiro 2010.
33. HONORATO, J. 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.
34. HOPKEN, E. U. et al. Up-regulation of the chemokine receptor CCR7 in classical but not in lymphocyte-predominant hodgkin cells in lymphoid organs. **Blood** 99(4):1109-1116, 2002.
35. HUANG, S. H. et al. Predictive value of tumor thickness for cervical lymph-node involvement in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Cancer** 115:1489–1497, 2009
36. INCA. **Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil**, Rio de Janeiro: INCA, 2009. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>.



37. JERJES, W. et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2oral squamous cell carcinoma patients. **Head & Neck Oncology** 2:9, 2010.
38. JING J. et al. Prognostic predictors of squamous cell carcinoma of the buccal mucosa with negative surgical margins. **J Oral Maxillofac Surg** 64(6): 896-901, 2006.
39. KANE S. V. et al. Depth of invasion is the most significant histological predictor of subclinical cervical lymph node metastasis in early squamous carcinomas of the oral cavity. **Eur J Surg Oncol** 32(7): 795-803, 2006.
40. KAKINUA, T. HWANG, S. T. Chemokines, chemokines receptors, and cancer metastasis. **J Leukoc Biol** 79(4):639-51, 2006.
41. KOWALSKI, L. P.; SANABRIA, A. Elective neck dissection in oral carcinoma: a critical review of the evidence. **Acta Otorhinolaryngol Ital** 27(3):113-7, 2007.
42. KOWALSKI, L. P.; & MEDINA J. E. Nodal metastases predictive factors. 30-6665, 1998
43. KULBE H, et al. The chemokine network in cancer—much more than directing cell movement. **Int J Dev Biol** 48(5-6):489-96, 2004.
44. KUPER, H. et al. Infections as a major preventable cause of human cancer. **J. Intern. Med** 248, 171–183, 2000.
45. LINDENBLATT, R. de C. **Estudo comparativo de alterações genéticas em carcinoma de células escamosas bucal de pacientes adultos jovens tabagistas/etilistas e não tabagistas/etilistas**. 2008. ----p. Dissertação (Mestrado em Patologia Bucodental) – Universidade Federal Fluminense, 2008.
46. LIU, T. R. 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):136-41, 2011.
47. LODDER, W. L. et al. Tumour thickness in oral cancer using an intra-oral ultrasound probe. **Eur Radiol** 21: 98–106, 2011.
48. LOFFREDO, L. C. M. et al. Oral cancer mortality trends in Brazilian geographical regions from 1996-2001. **Rev Ciênc Farm Básica Apl** 27(2): 133-138, 2006.
49. LUSTER, A. D. Chemokines – Chemotatic cytokines that mediate inflammation. **N. Eng. J. Med** 338(7): 426-445, 1998.
50. MANTOVANI, A. et al. The chemokine system in cancer biology and therapy. **Cytokine & Growth Factor Reviews** 21:27–39, 2010.

51. MASHINO, K. et al. Expression of chemokine receptor ccr7 is associated with lymph node metastasis of gastric carcinoma. **Cancer Research** 62,2937–2941, 2002.
52. MBURU, Y. K. et al. CCR7 mediates inflammation-associated tumor progression. **Immunol Res** 36(1-3):61-72, 2006.
53. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **TNM: classificação de tumores malignos**, 6. ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254p. Disponível em <http://www.inca.gov.br/tratamento/tnm/>
54. \_\_\_\_\_. **Rotinas internas do INCA: Serviço de cirurgia de cabeça e pescoço**. Instituto Nacional do Câncer. - Rio de Janeiro: INCA. 22p, 138-140p, 2007
55. MULLER, A, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature** 2001;410:50–6.
56. MOORE, S. R. et al. The epidemiology of tongue cancer: a review of global Incidence. **Oral Diseases** 6, 75–84, 2000.
57. MURAKAMI, T, CARDONES, AR, HWANG, ST. Chemokine receptors and melanoma metastasis. **J Dermatol Sci**, 2004;36:71–8.
58. MURPHY, PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. **N. Eng. J. Med**, 2001; 345(11): 833-835. Nci National Cancer Institute [www.cancer.gov/cancer](http://www.cancer.gov/cancer)
59. MYERS, J. **Oral cancer metastasis**. Springer, 2010. 346p
60. NATARAJAN, E.; EISENBERG, E. Contemporary concepts in the diagnosis of oral cancer and precancer. **Dent Clin North Am** 55(1):63-88, 2011.
61. NEVILLE, B. W et al. **Patologia Oral & Maxilofacial**, 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 972p.
62. 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.
63. PIMENTA-AMARAL, T. M. 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):780-6, 2004.
64. POPOVTZER A. et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young patients. **Laryngoscope** 114:915-7, 2004.
65. ROSS, G. L. 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.

66. ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu Rev Immunol** 18:217, 2000.
67. SANO, D.; MYERS, J. N. Metastasis of squamous cell carcinoma of the oral tongue. **Cancer Metastasis Rev** 26(3-4):645-62, 2007.
68. SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. **Oral Oncol** 45(4-5):301-8, 2009.
69. SHANG, et al. Expression of chemokine receptor CCR7 is associated with cervical lymph node metastasis of oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology** 45:480–485, 2009.
70. SHAW, R. J. Extracapsular spread in oral squamous cell carcinoma. **Head Neck** 32: 714–722, 2010.
71. SHIBOSKI CH, SCHMIDT BL, JORDAN RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20–44 years. **Cancer** 2005; 103: 1843.
72. SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumours 5<sup>a</sup> edição**. 1997. Wiley, New York.
73. TAKANAMI, I. Overexpression of CCR7 mRNA in nonsmall cell lung cancer: Correlation with lymph nodes metastasis. **Int J Cancer** 2: 186-189, 2003.
74. TAKES, R. et al. Markers for nodal metastasis in head and neck squamous cell center. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 128(5): 512-518, 2002.
75. TILL, K. J. et al. The chemokine receptor CCR7 and  $\alpha$ 4 integrin are important for migration of chronic lymphocytic leukemia cells into lymph nodes. **Blood** 99(8): 2977, 2002.
76. TRAPPEN, P. O. V. & PEPPER, M. S. Lymphatic dissemination of tumour cells and the formation of micrometastases. **Lancet Oncol** 3:44–52, 2002.
77. TSUZUKI, H. et al. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas expressing CCR7 have poor prognoses. **Auris Nasus Larynx** 33:37–42, 2006.
78. UEDA, M. et al. Expression of CC-chemokine receptor 7 (CCR7) and CXC-chemokine receptor 4 (CXCR4) in head and neck squamous cell carcinoma. **Auris Nasus Larynx** 37:488–495, 2010.
79. VARTANIAN, 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.
80. VERED, M. et al. Oral tongue squamous cell carcinoma: recurrent disease is associated with histopathologic risk score and young age. **J Cancer Res Clin Oncol** 136:1039–1048, 2010.

81. WAHL, L. M.; KLEINMAN, H. K. Tumor-associated macrophages as targets for cancer therapy. **J. Natl Cancer Inst** 90,1583–1584, 1998.
82. WANG,J. et al. Expression pattern of chemokine receptor 6 (CCR6) and CCR7 in squamous cell carcinoma of the head neck identifies a novel metastatic phenotype. **Cancer Res** 64(5): 1861-6, 2004.
83. WARD, S. G. et al. Chemokines and T lymphocytes: more than an attraction. **Immunity** 9:1–11, 1999.
84. WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol** 45: 309–316, 2009.
85. WILEY, HE, et al. Expression of CC chemokine receptor-7 and regional lymph node metastasis of B16 murine melanoma. **J Natl Cancer Inst** 93:1638–43, 2001.
86. WONG, D. et al. Molecular biology of human oral cancer. **Crit Rev Oral Biol Med** 7(4): 319-328, 1996.
87. WOOLGAR, J. A. Micrometastasis in oral/oropharyngeal squamous cell carcinoma: incidence, histopathological features and clinical implications. **Br J Oral Maxillofac Surg** 37(3):181-6, 1999.
88. WÜNSCH-FILHO, V. The epidemiology of oral pahrynx cancer in Brazil. **Oral Oncol** 38(8): 737-747, 2002.
89. XU, et al. Clinical significance of micrometastases detection in lymph nodes from head and neck squamous cell carcinoma. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery** 139, 436-441, 2008.
90. ZLOTNIK, A.; YOSHIE, O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. **Immunity** 12:121–7, 2000
91. ZLOTNIK A. Chemokines in neoplastic progression. **Seminars in Cancer Biology** 14:181–185, 2004.
92. ZYGOGIANNI A. G. et al. Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. **Head Neck Oncol** 3:2, 2011.

## 8 ANEXOS

### ANEXO I. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.



Memo 275/10-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 14 de julho de 2010.

A(o): Dr. Fernando Luiz Dias  
Pesquisador(a) Principal

**Registro CEP nº 44/10** (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)  
**Título do Estudo:** Análise da associação da imunexpressão do CCR7/CCL21 em carcinoma de células escamosas de boca com metástases em linfonodos cervicais

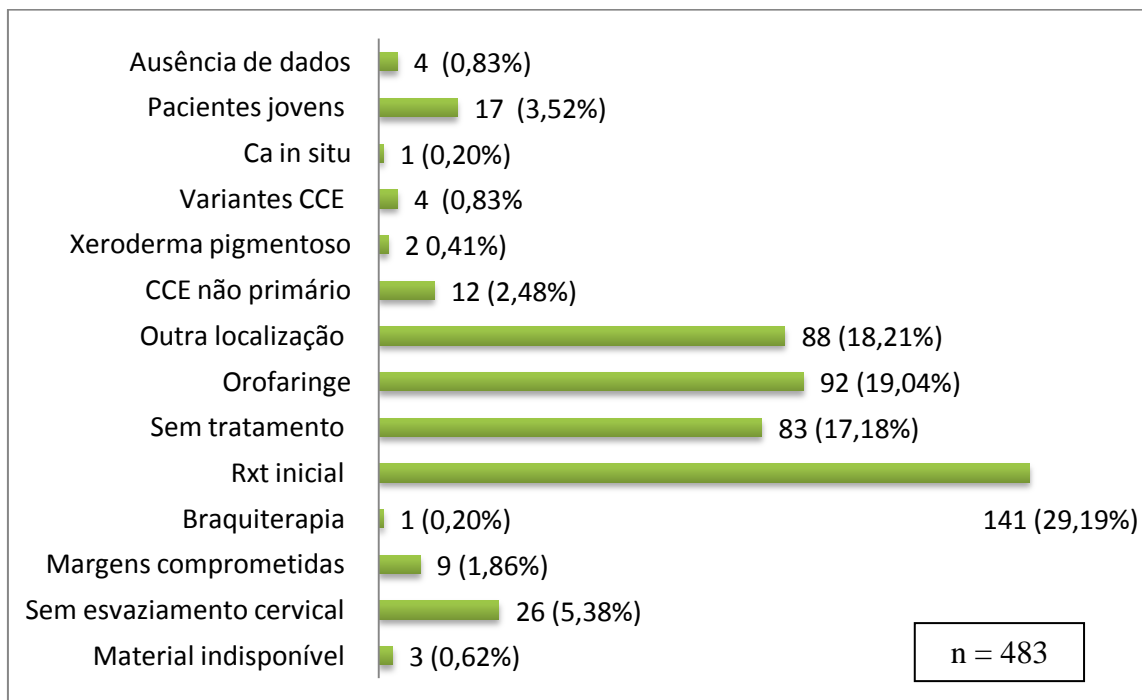
Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer **aprovou** após re-análise o estudo intitulado: **Análise da associação da imunexpressão do CCR7/CCL21 em carcinoma de células escamosas de boca com metástases em linfonodos cervicais**, bem como o seu **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, em 13 de julho de 2010.

**Ressalto que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o(a) pesquisador(a) responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu protocolo que estão previstos para as seguintes datas: janeiro/2011 e julho/2011.**

Atenciosamente,

Dra. Adriana Scheliga  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP-INCA

**ANEXO II.** Perfil dos pacientes excluídos da população de estudo.

## ANEXO III. Ficha de registro.

| CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA               |   |  |                                      |  |                                     | FICHA DE REGISTRO                 |  |
|--|---|--|--------------------------------------|--|-------------------------------------|-----------------------------------|--|
| Nº do Prontuário                                     |   | <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> <input type="text"/> |                                      |  |                                     |                                   |  |
| Nome do Paciente:                                    |   |  |                                      |  | Profissão:                          |                                   |  |
| <b>IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE</b>                     |   |  |                                      |  |                                     |                                   |  |
| Sexo   | Masc <input type="checkbox"/>             | Fem <input type="checkbox"/>   | Cor da pele:                         |  | Data de Entrada:                    |                                   |  |
| Naturalidade:  | <input type="text"/> <input type="text"/> |  |                                      |  | Data de Nascimento:                 |                                   |  |
| Residência (cidade e estado):                        |   |  |                                      |  | Data da Biópsia:                    |                                   |  |
| Escolaridade   |   |  | Antecedentes:                        |  |                                     |                                   |  |
| Analfabeto <input type="checkbox"/>                  | Básico <input type="checkbox"/>           | Médio <input type="checkbox"/>   | Superior <input type="checkbox"/>    | Completo <input type="checkbox"/>                    | Incompleto <input type="checkbox"/> |                                   |  |
| Tabagismo  | Sim <input type="checkbox"/>              | Não <input type="checkbox"/>   | Ex <input type="checkbox"/>          | Tipo/Dose:   |                                     |                                   |  |
| Etilismo   | Sim <input type="checkbox"/>              | Não <input type="checkbox"/>   | Ex <input type="checkbox"/>          | Tipo/Dose:   |                                     |                                   |  |
| <b>INFORMAÇÃO SOBRE A DOENÇA, TRATAMENTO</b>         |   |  |                                      |  |                                     |                                   |  |
| Outros Tumores                                       |   | Sim <input type="checkbox"/>   | Não <input type="checkbox"/>         | Qual:  |                                     | cTNM                              |  |
| Outras Informações:                                  |   |  |                                      |  |                                     | cEstádio                          |  |
| Descrição da Lesão:                                  |   |  |                                      |  |                                     | cTNM prévio tto:                  |  |
|  |   |  |                                      |  |                                     | cEstádio - tto:                   |  |
| Localização  | LÍNGUA <input type="checkbox"/>           | ASSOALHO <input type="checkbox"/>  | PALATO DURO <input type="checkbox"/> | REGIÃO RETRO <input type="checkbox"/>                | GENG INF <input type="checkbox"/>   | GENG SUP <input type="checkbox"/> |  |
|  | LÁBIO INF <input type="checkbox"/>        | LÁBIO SUP <input type="checkbox"/>   | PALATO MOLE <input type="checkbox"/> | OUTROS <input type="checkbox"/>                      |                                     | Qual:                             |  |
| Tratamento Inicial                                   |   |  | Tratamento Adjuvante                 |  |                                     | Data do tratamento inicial:       |  |
| Cirurgia <input type="checkbox"/>                    |   | Quimioterapia nº de ciclos: <input type="checkbox"/>   |                                      | Radioterapia Dose e fração: <input type="checkbox"/> |                                     |                                   |  |
| Radioterapia Dose e fração: <input type="checkbox"/> |   | Suporte (CSTO) <input type="checkbox"/>  |                                      | Quimioterapia nº de ciclos <input type="checkbox"/>  |                                     | Data final do tratamento:         |  |
| <b>INFORMAÇÕES SOBRE A CIRURGIA</b>                  |   |  |                                      |  |                                     |                                   |  |
| Esvaziamento Cervical                                |   | Sim <input type="checkbox"/>   |                                      | Não <input type="checkbox"/>                         |                                     | pTNM:                             |  |
| Margens Livres                                       |   | Sim <input type="checkbox"/>   |                                      | Após ampliação <input type="checkbox"/>              |                                     | Não <input type="checkbox"/>      |  |
|  |   |  |                                      |  |                                     | pEstádio:                         |  |
| <b>ACOMPANHAMENTO</b>                                |   |  |                                      |  |                                     |                                   |  |
| <b>Recidiva</b>                                      |   |  |                                      |  |                                     |                                   |  |
| Local <input type="checkbox"/>                       |   | Localização:   |                                      |  | Data recidiva:                      |                                   |  |
| Regional <input type="checkbox"/>                    |   | Distância <input type="checkbox"/>   |                                      | Detecção da Recidiva                                 |                                     | Clínica <input type="checkbox"/>  |  |
|  |   |  |                                      |  |                                     | RX <input type="checkbox"/>       |  |
|  |   |  |                                      |  |                                     | Histo <input type="checkbox"/>    |  |
|  |   |  |                                      |  |                                     | Cito <input type="checkbox"/>     |  |
|  |   |  |                                      |  |                                     | Outra/Qual                        |  |
|  |   |  |                                      |  |                                     | Tipo de tratamento da recidiva:   |  |
| Data CSTO:   |   | Data SED:  |                                      | Data Última Consulta:                                |                                     |                                   |  |
| Data Óbito:  |   | Causa Óbito:   |                                      |  |                                     |                                   |  |
| STP  |   | sim <input type="checkbox"/>   |                                      | não <input type="checkbox"/>                         |                                     | Local STP:                        |  |
|  |   |  |                                      |  |                                     | Data STP:                         |  |
| <b>HISTOPATOLOGIA</b>                                |   |  |                                      |  |                                     |                                   |  |
| Nº Biópsia:  |   | OMS biópsia  |                                      | In situ <input type="checkbox"/>                     |                                     | Bem <input type="checkbox"/>      |  |
|  |   |  |                                      |  |                                     | Mod <input type="checkbox"/>      |  |
|  |   |  |                                      |  |                                     | Pouco <input type="checkbox"/>    |  |
| Nº Cirurgia:   |   | OMS cirurgia   |                                      | In situ <input type="checkbox"/>                     |                                     | Bem <input type="checkbox"/>      |  |
|  |   |  |                                      |  |                                     | Mod <input type="checkbox"/>      |  |
|  |   |  |                                      |  |                                     | Pouco <input type="checkbox"/>    |  |