

## REVISÃO DE LITERATURA

No Brasil, as neoplasias malignas constituem a segunda causa de morte, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida, notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade. Estima-se para o ano de 2010 cerca de 14,120 novos casos de neoplasias malignas em cavidade oral, tendo sido incluídos nesta categoria todos os cânceres com códigos entre C00 e C10, e correspondendo a aproximadamente 3,76% de todos os casos de câncer no Brasil, excluindo o de pele não melanoma (INCA, 2009).

Globalmente, o câncer oral é o sexto tipo mais comum (WARNAKULASURIYA, 2009; HORNER *et al.*, 2010). A média de incidência anual estimada para o câncer oral é cerca de 275.000, sendo que dois terços dos casos ocorrem em países em desenvolvimento. Existe uma grande variação geográfica na incidência do câncer oral: as áreas caracterizadas por elevadas taxas de incidência (excluindo lábio) são encontradas nas regiões Sul e Sudeste da Ásia (por exemplo, Sri Lanka, Índia, Paquistão e Taiwan), partes da Europa Ocidental (França) e Europa Oriental (por exemplo, Hungria, Eslováquia e Eslovénia), partes da América Latina e

Caribe (por exemplo, Brasil, Uruguai e Porto Rico) e em regiões do Pacífico (por exemplo, Papua Nova Guiné e Melanésia) (WARNAKULASURIYA, 2009).

A estimativa para 2010, última realizada pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2009) indicou que, no Brasil, os cânceres da cavidade oral ficariam na 7ª posição em relação à incidência, com 14.120 novos casos, sendo 10.330 para o sexo masculino (5º mais comum) e 3.790 para o feminino (7º mais comum).

A mortalidade do câncer oral no Brasil difere conforme a região geográfica. A região sul apresenta uma taxa de 3,58 mortes para cada 100.000 habitantes; a sudeste, 3,55; e as regiões norte, nordeste e centro-oeste apresentam um patamar mais baixo para a mortalidade do câncer oral, com taxas de 0,86, 1,41 e 1,94, respectivamente. O perfil dos pacientes acometidos pelo câncer oral é do sexo masculino com idade mais avançada, a partir da 6ª década de vida. (LOFFREDO *et al.*, 2006; BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2010; CAMISASCA *et al.*, 2011). Contudo, a incidência em adultos jovens tem aumentado, com idades entre 20 e 44 anos, especialmente em língua (POPOVTZER *et al.*, 2004; SHIBOSKI *et al.*, 2005; ZYGOGIANNI *et al.*, 2011).

Na cavidade oral, o carcinoma de células escamosas (CCE) é o tipo histológico predominante, sendo responsável por mais de 90% das neoplasias malignas diagnosticadas na boca (WONG *et al.*, 1996; NOLLET *et al.*, 1999; NEVILLE *et al.*, 2009; SCULLY, 2009; WARNAKULASURIYA, 2009).

Quanto ao fator etiológico, não há um fator causador isolado claramente definido ou aceito, mas sabe-se que tanto fatores extrínsecos quanto intrínsecos podem estar associados com a etiologia do câncer *oral*. Fatores extrínsecos incluem o fumo de tabaco, álcool e a radiação. Fatores intrínsecos incluem os estados sistêmicos ou gerais, como a desnutrição, deficiência de ferro e vitamina A, anemia, infecção por vírus oncogênicos, candidíase, sífilis e imunossupressão. A hereditariedade parece não desempenhar um papel importante na carcinogênese oral (NEVILLE *et al.*, 2009).

Clinicamente, o CCEO pode se apresentar de forma exofítica, que é a mais comum, endofítica, leucoplásica, eritroplásica ou leucoeritroplásica (NEVILLE *et al.*, 2009; NATARAJAN & EISENBERG *et al.*, 2011).

A superfície topográfica geralmente apresenta-se de forma não homogênea (corrugada, verrucosa ou nodular). Pode ou não apresentar dor ou parestesia, geralmente por invasão do nervo alveolar inferior. Dependendo da localização, a invasão do tumor pode e frequentemente evolui com perda de mobilidade ou fixação de estruturas anatômicas vizinhas ao trajeto do tumor. Esta situação pode resultar em comprometimento funcional em relação à fala, mastigação e deglutição. Invasão adjacente ou subjacente ao osso maxilar ou mandibular pode resultar em destruição lítica do osso alveolar e periodontal com presença de mobilidade dentária avançada (NATARAJAN & EISENBERG *et al.*, 2011).

Histopatologicamente, o epitélio superficial é caracterizado por ilhas ou cordões invasivos de células epiteliais malignas, com diferenciação em direção a

uma morfologia escamosa. Normalmente, estas células apresentam uma abundância de citoplasma com núcleos grandes e vários graus de pleomorfismo celular e nuclear são observados. Assim como em outros tumores malignos, alguma mudança no estroma pode ser observada, como a deposição de um colágeno mais denso, formação de novos vasos sanguíneos e a presença de infiltrado inflamatório crônico (NEVILLE *et al.*, 2009).

A análise histopatológica vem, há muito tempo, sendo usada como indicativo do prognóstico para cânceres. BRODERS (1941) já afirmava que a classificação microscópica, tamanho, localização, suprimento sanguíneo e linfático de um câncer e a idade do paciente deveriam ser usados para denotar o grau de malignidade da lesão. Esse autor propôs uma classificação desses tumores baseada no padrão de diferenciação celular e, com adaptações, essa classificação ainda é atualmente indicada pela OMS (2005). Esse sistema avalia o grau de diferenciação celular através da análise do grau de ceratinização das células, do número de mitoses, do pleomorfismo celular e da arquitetura tecidual do epitélio, classificando os tumores como bem, moderadamente ou pouco diferenciados (BARNES *et al.*, 2005).

Com semelhante propósito, outras classificações foram descritas na literatura, como a de BRYNE *et al.* (1989), a de ANNEROTH *et al.* (1984) e mais recentemente a de BRANDWEIN-GENSLER *et al.* (2005), que propuseram uma Avaliação Histopatológica de Risco (AHR) para CCEO fortemente preditiva para a análise da sobrevida dos pacientes. Esses últimos autores avaliaram três variáveis histopatológicas – o padrão de invasão, invasão perineural e infiltrado linfocitário –

que recebem escores e, ao final, a soma desses valores caracterizam baixo, intermediário e alto risco para recidivas e sobrevida (BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2005).

Em 2008, LINDENBLATT analisou diferentes classificações histopatológicas para CCEO em 53 casos retrospectivos diagnosticados em 1999 no INCA-RJ. Na análise histopatológica, 83% dos casos foram classificados como moderadamente diferenciados (OMS), 52,8% como de risco intermediário para BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 45,3% como de prognóstico intermediário para ANNEROTH *et al.* e 50,9% para BRYNE *et al.* A classificação de ANNEROTH *et al.* mostrou associação significativa com o estadiamento patológico ( $p=0,017$ ) e envolvimento de linfonodos ( $p=0,007$ ). Houve associação estatisticamente significativa entre a classificação da OMS, a presença de recidiva ( $p=0,043$ ) e a sobrevida livre de doença (5 anos) ( $p=0,031$ ). A avaliação histopatológica de risco mostrou associação estatisticamente significativa com a sobrevida total ( $p=0,015$ ), a sobrevida livre de doença ( $p=0,037$ ) e a sobrevida específica (5 anos) ( $p=0,029$ ). A gradação proposta por BRYNE *et al.* não apresentou associação estatística.

O carcinoma de células escamosas de língua é o mais comum câncer diagnosticado na cavidade oral (BELLO *et al.*, 2010), e sua epidemiologia global mostra significativa variação geográfica e constitui um problema de saúde pública (MOORE, 2000).

Segundo NEVILLE *et al.* (2009), os locais mais frequentes para a ocorrência do carcinoma intra-oral depois da língua são o assoalho *oral*, palato mole, gengiva, mucosa da bochecha, mucosa labial e palato duro (NEVILLE *et al.*, 2009).

As lesões linguais possuem alta frequência de metástase regional, pior prognóstico e contam com as piores taxas de sobrevida (GERVÁSIO *et al.*, 2001; PIMENTA-AMARAL *et al.*, 2004; VARTANIAN *et al.*, 2004; CHOI *et al.*, 2006; BELLO *et al.*, 2010), de aproximadamente cinco anos para 15% dos casos (WÜNSCH-FILHO *et al.*, 2002).

Essas localizações de maior propensão para o câncer *oral* incluem a cavidade oral, superfície lateral e ventral da língua e assoalho da boca, isto é, locais em que a mucosa não é ceratinizada. Presumivelmente, nestas áreas específicas, os carcinógenos dissolvidos na saliva encontram uma fina barreira de proteção, que permite o contato prolongado e com fácil acesso à superfície de células epiteliais escamosas (NATARAJAN & EISENBERG *et al.*, 2011).

Os tumores linguais são diagnosticados em estágios mais avançados, provavelmente em virtude da sua topografia, favorecendo o crescimento do tumor na obscuridade, invadindo a musculatura profunda da base da língua, cuja rica drenagem linfática facilita a disseminação de células neoplásicas para as cadeias linfáticas do pescoço (AMORIM FILHO *et al.*, 2004).

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, assim, estimar a sobrevida dos pacientes. As informações obtidas através dos exames clínico 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. 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. Os estádios I e II são considerados iniciais e apresentam melhor prognóstico quando comparados aos estádios III e IV, denominados como tardios, de pior 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. O tratamento de lesões iniciais, estádios I e II, localizadas em língua e em lesões infiltrativas de assoalho de boca (as mais comuns), deve associar-se ao esvaziamento cervical eletivo supra-omo-hioideo (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). Entretanto, alguns autores concluem que a terapia desse grupo de pacientes permanece controversa (BYERS

*et al.*, 1998; KOWALSKI & SANABRIA, 2007). BAJWA *et al.* (2011) afirmam que o esvaziamento cervical dos níveis I, II e III é efetivo no tratamento do pescoço cN0.

Outro componente que deve ser valorizado no processo de metástase cervical é o extravasamento capsular linfonodal. Estudos relatam que esse grupo de pacientes apresenta altas taxas de recidiva locoregional, metástase à distância e diminuição da sobrevida (MYERS *et al.*, 2001; GREENBERG *et al.*, 2003; SHAW *et al.*, 2010).

A espessura do tumor pode ser definida como a maior extensão no sentido vertical do tumor, excluindo a camada de ceratina, levando em consideração a distância da superfície até sua extensão mais profunda perpendicularmente, sendo geralmente expressa em milímetros (JING *et al.*, 2006; KANE *et al.*, 2006). A espessura tem apresentado forte relação com o envolvimento linfonodal cervical no CCEO, mas um *cutoff* preciso, clinicamente ideal, ainda não foi estabelecido. LODDER *et al.* (2011) realizaram levantamento da literatura onde encontraram 19 artigos científicos, de 1986 até 2009, que analisaram tumores de cavidade oral, língua e assoalho, cujo objeto de estudo foi a espessura do tumor utilizando *cutoffs* de 1,5mm até 13mm. HUANG *et al.* (2009) consideraram a espessura do tumor como valor preditivo para propor terapias adjuvantes.

A promessa de basear as decisões de tratamento em biomarcadores ainda não foi totalmente realizada em virtude da pouca compreensão dos mecanismos regionais e distantes das metástases de CCE de língua (SANO & MYERS, 2007).



A agressividade dos tumores está relacionada a diversos fatores, como a gradação histopatológica, localização e tamanho da lesão, grau de comprometimento dos tecidos vizinhos e pela presença de metástases. Um dos principais indicadores do prognóstico destas lesões é a presença de metástases para linfonodos cervicais e órgãos à distância (BEAVON, 2000).

Embora tenha havido um avanço nas técnicas cirúrgicas, em abordagens multidisciplinares de tratamento e no surgimento de novas drogas anticancerosas, a sobrevida dos pacientes acometidos pelo câncer *oral* apresentou discreta melhora segundo DEL-SORDO *et al.* (2010) ou em nada melhorou segundo BEAVON (2000) e os pacientes ainda sucumbem à doença metastática (MBURU *et al.*, 2006).

A metástase em linfonodos cervicais é o principal fator prognóstico para o CCE oral (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).

A metástase linfonodal é uma das primeiras manifestações da disseminação de células tumorais, na maioria dos carcinomas humanos. A avaliação do envolvimento linfonodal é necessária para o estadiamento do tumor. Este processo é fundamental para determinar o prognóstico e o planejamento de estratégias terapêuticas (TRAPPEN & PEPPER, 2002).

A metástase ocorre como resultado de mudanças nas propriedades das células e da interação das células tumorais com as células e tecidos vizinhos. Para

ocorrência de metástase, as células se proliferam, perdem o contato com as células vizinhas, migram para a matriz extracelular, invadem os vasos sanguíneos e/ou linfáticos e são transportadas para órgãos distantes (TAKES *et al.*, 2002). Este processo de metástase tumoral é regulado por uma série de produtos genéticos, dentre os quais está a adesão entre as células e o receptor de matriz extracelular, as enzimas proteolíticas, os fatores de mobilidade, receptores específicos, fatores de crescimento e os fatores angiogênicos. O enfraquecimento da adesão entre as células é, obviamente, imperativo para que as células do tumor causem metástases à distância (BEAVON, 2000).

Os vasos linfáticos associados ao tumor constituem o principal canal para a disseminação precoce de células do tumor para os nódulos linfáticos e essa propagação ocorre através de vasos pré-existentes. Uma hipótese alternativa é que se trata de vasos linfáticos recém-formados, que são produzidos por um processo chamado linfangiogênese. (TRAPPEN & PEPPER, 2002). Evidências recentes indicam que a ativação do sistema linfático é um importante fator na progressão do tumor para metástase. A linfangiogênese do tumor tem sido associada ao aumento da propensão para metástase. Desse modo, a densidade de vasos linfáticos tem surgido como outro promissor indicador de prognóstico (DAS & SKOBE *et al.*, 2008).

## 1.1. PAN-CITOQUERATINA AE1/1E3

A presença de metástases nodais em cânceres de cabeça e pescoço é um fator prognóstico importante e crucial na tomada de decisões críticas em relação ao tratamento de radioterapia e acompanhamento (HONORATO *et al.*, 2009).

Como resultado de sensibilidade limitada, a histopatologia de rotina subestima a prevalência de micrometástases em linfonodos. A análise de várias secções do tecido com 5 µm representa uma amostra muito pequena, cerca de um centésimo do linfonodo. Micrometástases ocultas presentes no momento do diagnóstico primário são muitas vezes perdidas pelo método convencional. A imunohistoquímica foi sugerida para aumentar a taxa de detecção de micrometástases em linfonodos histologicamente livres de tumor com uso de anticorpos, como por exemplo, as citoqueratinas (TRAPPEN & PEPPER, 2002).

A documentação final de metástase nodal se baseia na avaliação histopatológica de rotina dos gânglios linfáticos no pescoço. As tecnologias mais recentes, incluindo imunohistoquímica, análise molecular e cortes seriados podem aumentar a detecção de micrometástases linfonodais em pacientes patologicamente no estágio N0 de câncer da cavidade oral e orofaringe (FERLITO *et al.*, 2002).

A classificação UICC corrente define uma micrometástase como um depósito de tumor que está entre 0,2 mm e 2,0 mm. Células tumorais isoladas são reconhecidas como uma entidade separada, sendo células tumorais únicas ou pequenos aglomerados menores do que de 0,2 mm em sua dimensão.

Múltiplos cortes histológicos de nódulos, muitas vezes auxiliados por imuno-histoquímica, podem revelar depósitos tumorais muito pequenos, causando problemas em termos de classificação, organização e gestão dos recursos dos pacientes. Um deles diz respeito à área de definições de micrometástases (MMs) e de células tumorais isoladas (ITC). Assim, a controvérsia surge quanto à possibilidade de tratamento suplementar, seja esvaziamento ou irradiação, a ser oferecido após a detecção de pequenas MMs ou ITC (ATULA *et al.*, 2009).

ATULA *et al.* (2009) analisaram linfonodos que a princípio apresentavam-se livres de metástase em 107 pacientes. Como metodologia, foram feitas três secções adicionais de cortes, com intervalo de 150 µm entre elas. Na primeira secção, foi feita coloração de rotina com hematoxilina e eosina (HE). Caso essa continuasse negativa, a citoqueratina AE1/AE3 seria usada na secção 3. Depósitos metastáticos foram encontrados na primeira secção em 24 pacientes. Em 5 pacientes, os depósitos foram achados na secção 2 (sem citoqueratina) e em 6 pacientes a coloração com citoqueratina (secção 3) foi essencial para a descoberta de mais depósitos metastáticos.

Como o método imuno-histoquímico aumentou a taxa de detecção de micrometástases ocultas em linfonodos cervicais de cabeça e pescoço em pacientes com carcinoma de células escamosas, pode ser recomendado para uso em diagnóstico de rotina de pacientes com resultados negativos para metástase linfonodal na rotina de HE. Outros estudos de dissecação de pescoço mostraram que

a imuno-histoquímica pode revelar pequenas metástases em 5 a 13% dos pacientes que a princípio eram livres ao exame histopatológico (KWON, 2004).

A presença de células tumorais ocultas metastáticas ou latentes metástases (micrometástases), clinicamente indetectáveis na apresentação clínica inicial podem explicar por que a recidiva é frequente neste grupo 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).

TRAPPEN & PEPPER (2002) afirmaram que uma previsão rigorosa da recorrência metastática do tumor não é possível. Do contrário, este grupo de pacientes de alto risco poderia receber terapia adjuvante.

HAMAKAWA *et al.*, 2000, revisaram 554 linfonodos cervicais de 73 pacientes com CCE. As amostras foram seccionadas em intervalos de 200  $\mu\text{m}$ , sendo uma série foi usada para HE e as demais para imuno-histoquímica para citoqueratina. No total, foram detectadas micrometástases em 29 sítios em 23 linfonodos de 16 pacientes, correspondendo a 4,2% dos linfonodos examinados e 21,9% dos pacientes. Esses dados indicam que a análise imuno-histoquímica dos linfonodos pode ser usada para refinar o sistema de estadiamento e um número significativo de casos pode ter micrometástases detectadas e, conseqüentemente, ter seu estadiamento alterado.

## 1.2 CCR7

Dados recentes têm ampliado o conceito de que a inflamação é um componente crítico da progressão do tumor. Muitos tipos de câncer surgem a partir de sítios de infecção, irritação e inflamação crônica. O microambiente do tumor, que é em grande parte orquestrado por células inflamatórias, é indispensável participante do processo neoplásico, promovendo a sobrevivência, proliferação e migração. Além disso, as células tumorais tem cooptado algumas das moléculas sinalizadoras do sistema imunológico inato, como selectinas, quimiocinas e seus receptores de migração, invasão e metástase (COUSSENS & WERB, 2002; MANTOVANI *et al.*, 2010).

As células tumorais produzem várias citocinas e quimiocinas que atraem leucócitos. O componente inflamatório de uma neoplasia em desenvolvimento pode incluir uma população diversificada de leucócitos - por exemplo, neutrófilos, células dendríticas, macrófagos, eosinófilos e mastócitos, bem como os linfócitos - que são capazes de produzir um conjunto variado de citocinas, mediadores citotóxicos, incluindo espécies reativas de oxigênio, proteases de serina e cisteína, matriz metaloproteinases, agentes de perfuração da membrana e mediadores solúveis de morte celular, como fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas e interferons (IFNs) (KUPER *et al.*, 2000; WAHL *et al.*, 1998).

Estão descritas mais de cinquenta quimiocinas e dezoito receptores. As quimiocinas que parecem ter um papel no processo de metástase pertencem a uma família de proteínas homologas com 8 a 10 kDa, subdivididas com base na posição

relativa dos resíduos de cisteína na proteína. Nas quimiocinas CXC os primeiros dois resíduos de cisteína são separados por um aminoácido simples, enquanto que nas quimiocinas CC os dois primeiros resíduos de cisteína são adjacentes; as quimiocinas XC perderam um dos resíduos de cisteína e, finalmente, as quimiocinas CX<sub>3</sub>C contém aminoácidos entre duas cisteínas (LUSTER, 1998; MURPHY, 2001; ZLOTNIK, 2004, KULBE *et al.*, 2004, KAKINUMA & HWANG, 2006).

Esta classificação baseada na estrutura dos ligantes define o grupo de receptores de quimiocinas. Assim, os 10 receptores de quimiocinas CC (CCR1 a 10) e os 6 receptores de quimiocinas CXC (CXCR1 a 6) só reconhecem quimiocinas CC e CXC, respectivamente. Da mesma forma, o receptor para quimiocina C (XCR1) e o receptor para quimiocinas CX<sub>3</sub>C (CX<sub>3</sub>CR1) são restritos aos seus respectivos ligantes (MANTOVANI *et al.*, 2010).

As quimiocinas são pequenas proteínas que medeiam seus efeitos ligando-se aos receptores acoplados a proteína G e assumem um papel-chave em guiar o extravasamento de células inflamatórias (ZLOTNIK & YOSHIE, 2000; WARD, BACON, WESTWICK, 1998).

As quimiocinas foram definidas funcionalmente como fatores solúveis de regulação da migração direcional dos leucócitos durante estados de inflamação. No entanto, a biologia da quimiocina se estende a todos os tipos de células, podendo induzir efeitos diretos sobre as células estromais e neoplásicas humanas (ROSSI & ZLOTNIK, 2000; COUSSENS & WERB, 2002). COUSSENS & WERB (2002)

afirmaram ser consenso que o sistema de receptor de quimiocina pode ser dramaticamente alterado em tecidos neoplásicos, especialmente no fronte invasivo.

Existe muita discussão se as células malignas metastatizadas em um microambiente favorecem o seu crescimento específico ou se os diferentes órgãos estão dotados com a capacidade de prender ou atrair tipos específicos de células malignas através de fatores quimiotáticos (a chamada teoria "homing") (HANAHAN & WEINBERG *et al.*, 2000).

As células tumorais não só tiram proveito dos fatores tróficos promovidos pelas células inflamatórias, mas 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 *et al.*, 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).

As interações específicas entre os receptores de quimiocinas e seus ligantes parecem contribuir para a disseminação metastática e influenciar a sobrevivência em muitos modelos de câncer (MULLER *et al.*, 2001). Células cancerosas usam mecanismos mediados por quimiocinas durante o processo de metástase em



nódulos linfáticos das células cancerosas, tais como aquelas da regulação no tráfego de linfócitos (WILEY *et al.*, 2001).

A quimiocina receptor 7 (CCR7) medeia a adesão de leucócitos e a quimiotaxia dos locais periféricos da inflamação através da cadeia linfática para órgãos *linfoides* secundários. A expressão aberrante do CCR7 tem sido identificada por certos tipos de tumor e foi associada à sobrevida e a via de invasão. O CCR7 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 linfoides (MBURU *et al.*, 2006).

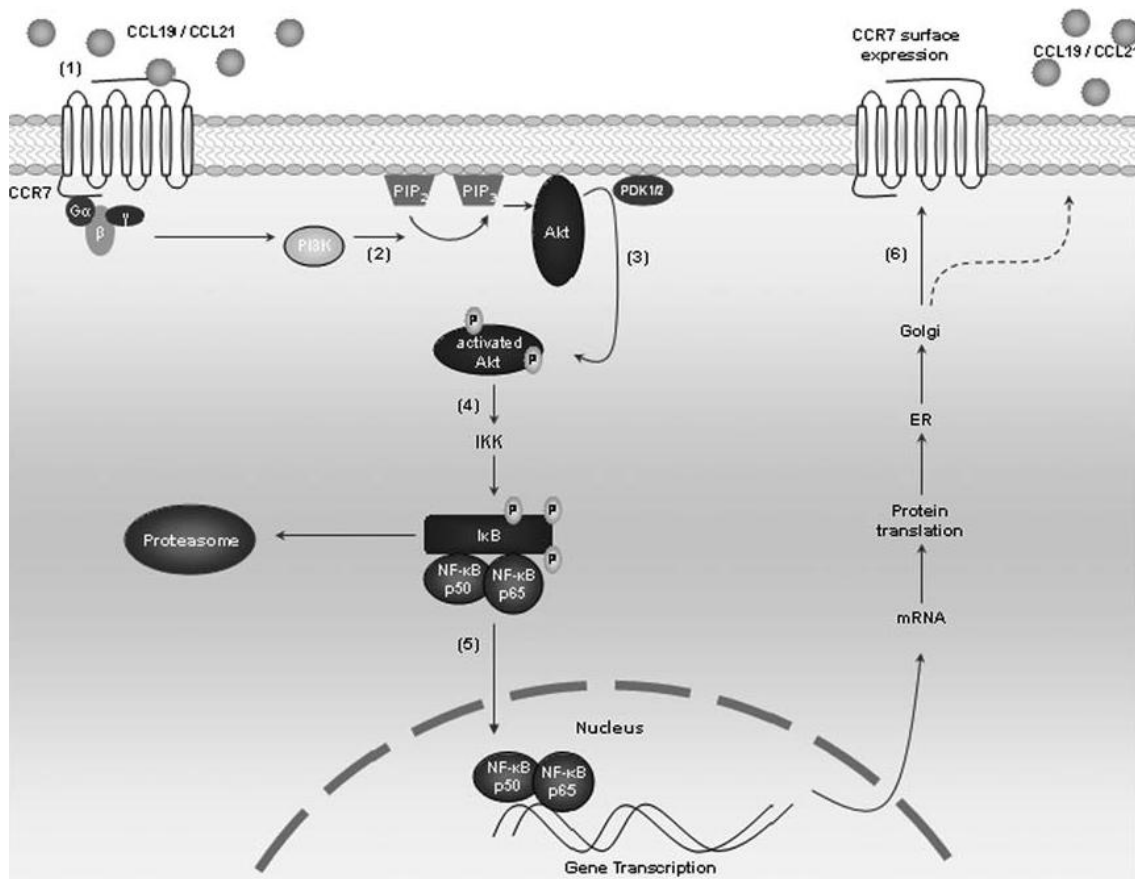
Receptores diferentes de quimiocinas podem determinar distintas metástases das células cancerosas em órgãos específicos. MURAKAMI *et al.* (2004) encontraram que os receptores de quimiocinas expressos por células cancerosas podem atuar para aumentar a metástase em linfonodos (CCR7), aumentar a adesão das células do endotélio vascular (CXCR4), promover a metástase distante, e/ou permitir que as células malignas iludam as respostas do hospedeiro (CCR10), usado no modelo de melanoma em ratos.

Em seu estudo, MULLER *et al.* (2001) relataram que altos níveis da expressão dos receptores quimiotáticos CXCR4 e CCR7 foram encontrados em células cancerosas de mama, determinando o destino metastático das células do tumor.

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço metastatiza previsivelmente para os linfonodos regionais. Por isso, a hipótese de "homing" dos receptores para os linfonodos, como por exemplo, o CCR7, pode mediar a metástase do tumor para estes órgãos linfoides secundários (WANG *et al.*, 2004).

MBURU, 2006 em seu estudo associou vias de sinalização inflamatórias, invasão, sobrevivência e metástase mediada por CCR7, explicando o *upregulation* seletivo de CCR7 no CCE de cabeça e pescoço metastático. No modelo sugerido de ativação autócrina do CCR7, a ativação do CCR7 pelo seu ligante ativa PI3K, que fosforila fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato(PIP<sub>3</sub>), criando um sítio de alta afinidade para a Akt na membrana plasmática. O ancoramento da Akt permite sua fosforilação e ativação, estando livre para ativar as IκB quinases (IKK), que por sua vez fosforilam IκB, marcando-o para degradação proteossômica e livrando NF-κB de seu complexo inibitório. Livre, NF-κB transloca-se para o núcleo e induz a expressão gênica no locus do CCR7, levando ao aumento dos níveis do receptor CCR7 na superfície celular e/ou ativação do receptor induzida pelo seu ligante (**FIG. 1**). Este modelo é condizente com o achado da Akt fosforilada em células não tratadas quando comparadas às células pré-tratadas com o bloqueio do CCR7 (pelo MAb), permitindo a conclusão de que tumores CCR7 positivos provavelmente são capazes de propagar a ativação autócrina do CCR7.

O papel da NF-κB na propagação de uma sinalização autócrina em células CCR7 positivas em CCE pode fornecer um biomarcador clinicamente útil no estagio da doença e na resposta à terapia (MBURU, 2006).



**FIGURA 1.** Modelo para a ativação autócrina do CCR7 mediada pelo NF-κB (MBURU, 2006)

TSUZUKI *et al.* (2006) investigaram a imunoexpressão do CCR7 em carcinomas de células escamosas de boca e orofaringe. Dos 90 casos estudados, 54 casos (60%) foram positivos para CCR7. O grupo CCR7-positivo teve uma incidência significativamente baixa de pacientes livres de doença e menor sobrevida global do que o grupo CCR7-negativo. Dentre os 35 pacientes que morreram de câncer, 28 pacientes (80%) foram positivos para CCR7. A expressão de CCR7 foi significativamente associada ao tamanho do tumor, metástase em linfonodos, estágio clínico, recorrência e morte pela doença. A expressão do CCR7 nos CCE metastáticos em linfonodos foi identificada. Observou-se correlação significativa de CCR7 nos CCE primários e nos CCE metastáticos. Os autores concluíram que a

investigação da expressão do CCR7 em CCE oral e orofaringe pode ser útil para prever o prognóstico dos pacientes.

SHANG *et al.* (2009) demonstraram através da técnica de imunohistoquímica que 56 dos 85 casos (65,9%) de CCEO apresentaram expressão positiva para CCR7. O citoplasma e a membrana plasmática das células tumorais foram positivamente marcadas, enquanto que o epitélio escamoso normal não foi marcado no citoplasma. A proteína CCR7 teve forte marcação observada em algumas células do infiltrado inflamatório. A expressão do CCR7 foi associada significativamente com a metástase em nódulos linfáticos cervicais ( $p = 0,015$ ). A expressão do CCR7 no câncer foi caracterizada pela metástase em nódulos linfáticos com frequência significativa. Havia igualmente diferenças no tamanho de tumor ( $p = 0,014$ ) e estágio clínico ( $p = 0,009$ ) entre os dois grupos. Dessa forma concluíram que a expressão positiva de CCR7 pode ter um papel crítico na metástase em nódulos linfáticos cervicais e influenciar, conseqüentemente, os resultados do tratamento.

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

HOPKEN *et al.* (2002) verificaram que o aumento da expressão de CCR7 associava-se com maior grau de disseminação de células neoplásicas para órgãos *linfoides*.

Ainda, TILL *et al.* (2002) encontraram uma maior expressão de CCR7 em pacientes com linfadenopatia, sugerindo a importância desta quimiocina como marcador de metástase para linfonodos.

TAKANAMI *et al.* (2003) investigaram a expressão de CCR7 em 71 pacientes com câncer de pulmão por RT-PCR e imuno-histoquímica. A expressão do CCR7 e CXCR4 foi significativamente associada com metástases linfonodais, estágio e invasão linfática. O mRNA de CCR7 foi expresso em 45/71 casos. Destes, 26 tinham comprometimento linfonodal (pN+), enquanto somente 3/26 casos, sem a expressão do mRNA de CCR7 eram pN+. A expressão do mRNA de CCR7 demonstrou ser um fator preditivo independente para metástases linfonodais, por análise multivariada ( $p=0,0117$ ).

CAMPOFIORITO (2006) verificou a associação entre a positividade de CCR7 e uma menor sobrevida global e livre de doença para pacientes com CCE. De forma semelhante, a associação entre a negatividade de CCR7 detectada por imuno-histoquímica e uma maior sobrevida global, também foi sugerida em estudos envolvendo 64 pacientes com carcinomas gástricos e 96 pacientes com carcinomas esofágicos (MASHINO *et al.*, 2002; DING *et al.*, 2003). Uma possível explicação para este fato é que nestes tipos de câncer, assim como em CCE de cabeça e pescoço, os pacientes em geral vêm a óbito por doença loco-regional e não por metástase à distância, e por isso CCR7 possa ser importante na sobrevida destes pacientes (CAMPOFIORITO, 2006).

Experimentos utilizando anticorpos bloqueadores demonstram que, em linhagens celulares de CCE de cabeça e pescoço, o CCR7 é funcional e uma alta expressão do seu mRNA foi observada pelo método de RT-PCR semi-quantitativa em linhagens celulares metastáticas (WANG *et al.*, 2004).

A tendência ao aumento de expressão de CCL21 nos linfonodos comprometidos pode indicar que esse ligante seja um grande candidato a guiar as células tumorais da cavidade oral que expressam CCR7 (CAMPOFIORITO, 2006)

Face ao exposto, foram formuladas as seguintes hipóteses:

1. A imunopositividade da proteína CCR7 em CCE de língua e assoalho de boca e linfonodos está diretamente associada com metástases em linfonodos cervicais.
2. A imunopositividade para a proteína CCR7 em CCE de língua e assoalho de boca e linfonodos está diretamente associada com a sobrevida dos pacientes.