

**FATORES CLÍNICO-PATOLÓGICOS E EXPRESSÃO  
IMUNOISTOQUÍMICA DE POTENCIAIS MARCADORES  
PREDITIVOS PARA METÁSTASE CERVICAL EM  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE INICIAL (T1-T2) DE  
LÍNGUA E ASSOALHO BUCAL**

**NATALIE KELNER DE QUEIROZ**

**Tese apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para a obtenção do título de Doutor  
em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**

**Co-Orientadora: Dra. Cláudia Malheiros  
Coutinho Camillo**

**Co-Orientador: Dr. Clóvis Antonio Lopes Pinto**

**São Paulo**

**2015**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Queiroz, Natalie Kelner de

**Fatores clínico-patológicos e expressão imunoistoquímica de potenciais marcadores preditivos para metástase cervical em carcinoma epidermóide inicial (T1-T2) de língua e assoalho bucal /**

Natalie Kelner de Queiroz - São Paulo; 2015.

126p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:  
Oncologia.

Orientador: Luiz Paulo Kowalski

Descritores: 1. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS/  
diagnóstico. 2. NEOPLASIAS DE CABEÇA E PESCOÇO.  
3. IMUNO-HISTOQUÍMICA. 4. GENES ERBB-1. 5. PROGNÓSTICO.

Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também  
sonhar; não apenas planejar, mas também acreditar.

Anatole France

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese:

Aos meus pais, Rejane Tandaitnik e Roberto Kelner, por tudo que  
plantaram em mim;

Ao meu marido, Antonio José Lima de Queiroz, minha fonte de apoio,  
respeito, amor e compreensão;

Às minhas filhas, Letícia e Larissa, por trazerem outra dimensão para  
minha vida e fazerem tudo valer a pena;

Às minhas avós, Fanny e Rosa, por todos os ensinamentos de vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À D'us pela minha vida.

Aos meus pais, Rejane e Roberto, por toda a educação e amor que me deram.

Ao meu marido, Antonio, e minhas filhas, Letícia e Larissa, pela paciência e amor durante esses 4 anos.

Ao Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski, meu orientador, obrigada pela oportunidade de desenvolver esse estudo, pela confiança e pelo incentivo em todos os momentos, e também pela oportunidade de crescimento ao participar de outros projetos do grupo.

A Dra. Cláudia Malheiros, minha co-orientadora, obrigado pela dedicação, auxílio, paciência e por ser prestativa em todos os momentos e situações.

Ao meu co-orientador, Dr. Clóvis Antonio Lopes Pinto, pelos ensinamentos, paciência e compreensão.

A toda minha família por estar ao meu lado, torcendo por mim.

Agradecimento especial para minha tia Liane e minha avó Fanny, por todo incentivo e ajuda nas correções dos meus trabalhos.

A Farley pela ajuda nas correções dos resumos e textos em inglês.

A todo o Departamento de Cirurgia de Cabeça e pescoço e Otorrinolaringologia.

A Rita Rodrigues por toda a ajuda durante esses 4 anos.

Ao Dr. José Guilherme, Aline Damasceno e Dr. Hugo Kholer pela ajuda nas análises estatísticas.

Ao Dr. Mauro Ikeda por todos os conselhos e conversas.

A todos do Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center, em especial ao Prof. Dr. Fernando Soares, Dr. Clovis Pinto, Dra. Maria Dirlei e Dra. Sílvia Lourenço.

Aos amigos e funcionários da Patologia Investigativa: Ivanildo Neves, Severino (Seven), Carlos Nascimento (Carlinhos), Liliane Cilento (Lili), Romulo, Suely Nonogaki e Marina pela participação fundamental neste trabalho.

À minha banca de acompanhamento, Dr. Fábio Daumas e Dr. Victor Pianna de Andrade, obrigado pela disponibilidade, pelas sugestões e correções ao longo do desenvolvimento deste projeto.

À toda equipe da Pós-Graduação Ana Maria Kuninari, Luciana Pitombeira, Vanuza Rodrigues e Carla pelo apoio para a realização desta tese.

À CAPES e à FAPESP pelo apoio financeiro (Processo FAPESP: 2011/03507-3).

A Suely Francisco e aos funcionários da Biblioteca pela eficiência e ajuda durante as pesquisas bibliográficas e formatações desse estudo.

Aos meus amigos da Estomatologia: Ana Paula Molina, Rodrigo Nascimento Lopes, Ana Lucia "Luzinha", Luana Bonfim, Paulo André, Graziella Jaguar, André Guollo, Gustavo Rodrigues, Juliana Verrone e Juscelino pelo apoio e companheirismo durante esta jornada.

Aos meus mestres da Patologia e Oncologia Oral: Jurema Freire Lisboa de Castro, Fabio de Abreu Alves, José Divaldo Prado, Danyel Elias da Cruz Perez, André Caroli por todos os conhecimentos compartilhados.

Aos colegas do CIPE: Michelle Baldoni, Alice Muglia, Beatriz, Ellen Alves, Katia Klug, Juliana Bartholo, Juliano Jampietro, Ana Costa, Frederico, Adriana, Elisangela, por toda ajuda e momentos de conversa.

Ao A.C. Camargo Cancer Center e seus pacientes.

Ao Arquivo da Patologia, em especial, ao Fabio e Emidia.

Aos funcionários do SAME.

A Gilmara Silva, Carla Furlani e Kelly Cristina do escritório de projetos do CIPE, que sempre me ajudaram com as compras e assuntos financeiros dos nossos projetos; sempre de bom humor e dispostas a ajudar.

A Dra. Luisa Lina Villa e Maria Antonieta Andreoli do Instituto da Santa Casa de São Paulo pela ajuda na parte experimental do HPV.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização desta tese, muito obrigada!!!

## RESUMO

Queiroz NK. **Fatores clínico-patológicos e expressão imunoistoquímica de potenciais marcadores preditivos para metástase cervical em carcinoma epidermóide inicial (T1-T2) de língua e assoalho bucal.** São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O carcinoma epidermóide (CEC) de boca é o câncer mais frequente na região de cabeça e pescoço. Apesar dos avanços no diagnóstico e no tratamento, o prognóstico dos pacientes portadores dessa neoplasia teve apenas discretas mudanças nas últimas décadas. O comprometimento dos linfonodos regionais, comprovado por exame histopatológico, continua sendo o fator mais importante no estabelecimento do prognóstico desses pacientes. A ocorrência de metástase regional no CEC de língua e assoalho bucal é alta, provavelmente devido à ampla rede vascular, linfática e sanguínea, presente nestas regiões. A incidência de metástases ocultas nos linfonodos cervicais de pacientes portadores de CEC de boca, estádios clínicos I e II varia de 14% a 45% e permanece como um forte argumento para a indicação do esvaziamento cervical eletivo. A identificação de moléculas que estão associadas ao processo metastático e a elucidação de seu papel neste processo podem ser importantes para diagnóstico precoce, avaliação prognóstica e padronização de novas estratégias terapêuticas. A seleção criteriosa de pacientes com CEC de boca com maior risco de desenvolverem metástases regionais, com base no conhecimento biológico tumoral, pode vir a ser usada para uma adequada e segura indicação do esvaziamento cervical eletivo. O objetivo do presente estudo foi avaliar a incidência de metástase linfonodal oculta, nos pacientes portadores de carcinoma inicial (T1-T2) de língua e assoalho bucal, submetidos ao esvaziamento cervical eletivo no A.C. Camargo Cancer Center e avaliar as características demográficas, clínicas e histopatológicas, bem como a expressão imunoistoquímica de marcadores biológicos potencialmente

associados ao risco de metástase linfonodal. Os fatores moleculares selecionados incluíram as proteínas p53, ciclina D1, Ki-67, EGFR, E-caderina,  $\beta$ -catenina, claudina-7, D2-40, MMP-9 e p16. A metodologia adotada foi a imunohistoquímica. Os dados clínicos, patológicos e a expressão das proteínas foram avaliados e comparados com a presença ou não da metástase linfonodal oculta. A incidência de metástase linfonodal oculta encontrada foi de 20,5%. Dos parâmetros histopatológicos avaliados, a espessura maior que 4mm, pT2 e o grau de diferenciação foram associados ao maior risco de desenvolvimento de metástases linfonodais ocultas. Os tumores com alta expressão de EGFR foram associados ao maior risco de desenvolvimento de metástase linfonodal, apresentaram características patológicas desfavoráveis e pior sobrevida. Nossos resultados indicam que os pacientes com tumores pT2 de língua e assoalho, com espessura maior que 4mm e pouco diferenciados apresentam um maior risco de desenvolverem metástase linfonodal oculta.



## SUMMARY

Queiroz NK. **[Clinical-pathological factors and biomarkers in the prediction of occult lymph node metastasis in early (T1-T2) oral tongue and floor of the mouth carcinoma]**. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most frequent cancer of the head and neck. Despite advances in diagnosis and treatment, prognosis of these patients has remained without any significant change in past decades. The spread to regional lymph nodes has been confirmed by histopathological examination and remains the most important factor in establishing the prognosis for these patients. The occurrence of regional metastasis in oral squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth is high, probably due to the rich vascular and lymphatic system in these regions. The incidence of cervical occult metastasis in patients with OSCC, clinical stages I and II, varies from 14% to 45% and remains a strong argument for the indication of elective neck dissection (END). The identification of molecules associated with metastasis and the elucidation of its role in this process is important in early diagnosis, prognostic evaluation and standardization of new therapeutic strategies. Careful selection of patients with OSCC, with greater risk of developing regional metastasis, based on the knowledge of tumor biology, can be used for an adequate and safe indication for elective neck dissection. The aim of this study was to evaluate the incidence of occult lymph node metastasis in patients with early carcinoma (T1 –T2) of the oral tongue and floor of the mouth who underwent elective neck dissection at A.C. Camargo Cancer Center and to evaluate demographic, clinical and histopathological characteristics and the immunohistochemical expression of the biological markers (biomarkers) with potential risk for developing lymph node metastasis in this set of patients. The molecular factors selected included p53, cyclin D1, Ki-67, EGFR, E-cadherin,  $\beta$ -catenin, claudin-7, D2-

40, MMP-9 and p16. The methodology used was immunohistochemistry. The clinical and pathological data and the expression of the proteins were analyzed and compared to the presence or absence of occult lymph node metastasis. The incidence of occult lymph node metastasis found was 20.5%. Among the histopathological parameters analyzed, thickness greater than 4mm, pT2 and the grade of differentiation were associated with a greater risk of developing occult lymph node metastasis. Tumors with high EGFR expression were associated with greater risk for developing lymph node metastasis, thereby exhibiting unfavorable pathological features and poorer survival. Our findings show that patients with pT2 tumor of the oral tongue and floor of the mouth, with a thickness greater than 4mm and poorly differentiated, present a greater risk for developing occult lymph node metastasis.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Grau de diferenciação histológica dos carcinomas epidermóides.....	28
<b>Figura 2</b>	Fotomicrografia ilustrando a marcação da espessura tumoral traçada com auxílio do software <i>Aperio's Image ScanScope</i> em amostras de carcinomas epidermóides.....	28
<b>Figura 3</b>	Carcinoma epidermóide apresentando padrão de invasão tipo “pushing”.....	29
<b>Figura 4</b>	Carcinoma epidermóide com padrão de invasão infiltrativo.....	29
<b>Figura 5</b>	Carcinoma epidermóide com padrão de invasão tipo dissociativo.....	30
<b>Figura 6</b>	Carcinoma epidermóide invadindo o tecido glandular.....	31
<b>Figura 7</b>	Equipamento Ventana BenchMark XT (Roche®).....	32
<b>Figura 8</b>	Exemplo da análise no sistema <i>Aperio ImageScope</i> com a geração da planilha com a percentagem e intensidade das células marcadas e o número total de células analisadas.....	35
<b>Figura 9</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% para testar a qualidade do DNA das amostras de carcinoma epidermóide de língua e assoalho bucal com $\beta$ -globina humana (amplicom 110 pb).....	45
<b>Figura 10</b>	Equipamento AUTOBLOT 3000 utilizado na genotipagem de HPV.....	47

<b>Figura 11</b>	Representa parte do diagrama que acompanha o Kit Inno-Lipa para a interpretação dos resultados de HPV.....	47
<b>Figura 12</b>	Fluxograma ilustrando os pacientes com carcinoma inicial de língua e- assoalho bucal estratificados de acordo com o estágio clínico do tumor (T).....	50
<b>Figura 13</b>	Tipo de esvaziamento cervical eletivo ao longo dos anos no A.C.Camargo Cancer Center.....	50
<b>Figura 14</b>	Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre sexo feminino e masculino em paciente com carcinoma epidermóide de língua e assoalho bucal (n=222), (p=0,004).....	53
<b>Figura 15</b>	Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os pacientes fumantes e não fumantes com carcinoma epidermóide de língua e assoalho bucal (n=215) (p=0,013).....	54
<b>Figura 16</b>	Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os pacientes com carcinoma epidermóide de língua e assoalho bucal que consomem álcool dos que não consomem (n=214) (p=0,016).....	54
<b>Figura 17</b>	Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os tumores cT1 e cT2 (n=222) (p=0,014).....	55
<b>Figura 18</b>	Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os pacientes com e sem metástase linfonodal oculta (n=161) (p=0,001).....	55

<b>Figura 19</b>	Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os pacientes com e sem metástase linfonodal oculta (n=161) (p=0,04).....	56
<b>Figura 20</b>	Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) dos grupos de observação e esvaziamento cervical eletivo (n=222) (p=0,09).....	56
<b>Figura 21</b>	Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) mostrando que não houve diferença estatística entre as curvas dos grupos de observação e esvaziamento cervical eletivo (n=222) (p=0,36)..	57
<b>Figura 22</b>	Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os pacientes com tumores de espessura menor ou maior que 5mm.....	62
<b>Figura 23</b>	Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os pacientes com tumores pT1 e pT2.....	62
<b>Figura 24</b>	Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os pacientes com e sem metástase linfonodal oculta.....	63
<b>Figura 25</b>	Expressão nuclear da proteína p53 em amostra de carcinoma epidermóide oral.....	64
<b>Figura 26</b>	Gráfico de barra de erros mostrando que não houve diferença na expressão de p53 entre os grupos com e sem metástase linfonodal oculta.....	65
<b>Figura 27</b>	Curvas de Sobrevida global da expressão da proteína p53 em pacientes com carcinoma epidermóide inicial de língua e assoalho bucal.....	66

<b>Figura 28</b>	Expressão nuclear da proteína Ki-67 em amostra de carcinoma epidermóide inicial de língua e assoalho bucal.....	66
<b>Figura 29</b>	Gráfico de barra de erros mostrando que não houve diferença entre as percentagens de Ki-67 no grupo com e sem metástase linfonodal.....	67
<b>Figura 30</b>	Expressão de ciclina D1 no núcleo das células em amostra de carcinoma epidermóide inicial de língua e assoalho bucal...	68
<b>Figura 31</b>	Expressão de EGFR (clone 3C6) na membrana de carcinoma inicial de língua e assoalho bucal.....	71
<b>Figura 32</b>	Fotomicrografias de dois casos considerados 3+ para EGFR, com a expressão completa em toda a membrana das células tumorais.....	71
<b>Figura 33</b>	Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os tumores com alta e baixa expressão de EGFR (clone 3C6).....	71
<b>Figura 34</b>	Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os tumores com alta e baixa expressão de EGFR (Clone EGFR.25).....	72
<b>Figura 35</b>	Curvas de sobrevida câncer específica mostrando os grupos cT-EGFR em pacientes com carcinoma epidermóide de língua e assoalho bucal.....	73
<b>Figura 36</b>	Expressão de p16 em carcinoma epidermóide oral.....	74
<b>Figura 37</b>	Expressão de E-caderina em carcinoma epidermóide oral.....	74

<b>Figura 38</b>	Gráfico de barra de erros mostrando a densidade de vasos e o desvio padrão dos vasos intratumorais dos grupos com e sem metástase linfonodal oculta.....	76
<b>Figura 39</b>	Marcação dos vasos linfáticos na região intratumoral com anticorpo D2-40 em amostra de carcinoma epidermóide.....	76
<b>Figura 40</b>	Gráfico de barra de erros mostrando a densidade de vasos linfáticos e o desvio padrão dos vasos peritumorais dos grupos com e sem metástase linfonodal.....	77
<b>Figura 41</b>	Marcação do vaso linfático peritumoral pelo anticorpo D2-40 em amostra de carcinoma epidermóide.....	77
<b>Figura 42</b>	Expressão de $\beta$ -catenina na membrana das células tumorais em amostra de carcinoma epidermóide.....	78
<b>Figura 43</b>	Fotomicrografia ilustrando um caso positivo para MMP-9 em amostra de carcinoma epidermóide.....	79
<b>Figura 44</b>	bloco tumorais positivos para a expressão de claudina-7. Observa-se marcação continuada e descontinuada da membrana no mesmo bloco tumoral.....	80
<b>Figura 45</b>	Imagem de FISH mostrando um exemplo de um caso não amplificado e outro com amplificação em cluster (vários pontos verdes no mesmo núcleo) em amostra de carcinoma epidermóide oral.....	83
<b>Figura 46</b>	curva de sobrevida câncer específica do HPV de alto risco (HPV-16) em pacientes com carcinoma epidermóide oral.....	84

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Proteínas do estudo.....	34
<b>Tabela 2</b>	Características clínico-patológicas dos pacientes por grupo (n=222).....	51
<b>Tabela 3</b>	Características clínico-patológicas de cada grupo (n=165).....	58
<b>Tabela 4</b>	Relação dos dados clínicos-patológicos e a presença ou não de metástase linfonodal oculta (n=129).....	60
<b>Tabela 5</b>	Expressão de EGFR (clones 3C6 e EGFR.25) e características patológicas, metástase linfonodal e recorrência regional.....	70
<b>Tabela 6</b>	Associação entre os aspectos clínico-patológicos com a expressão de claudina-7.....	81
<b>Tabela 7</b>	Associação entre as proteínas analisadas e a presença de metástase linfonodal oculta.....	82
<b>Tabela 8</b>	Relação entre a expressão de p16 e a genotipagem de HPV	85
<b>Tabela 9</b>	Relação entre a expressão de p16 e HPV 16.....	85



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AJCC</b>	American Joint Committee on Cancer
<b>CDK</b>	cyclin-dependent kinase
<b>CDKI</b>	cyclin-dependent kinase inhibitor
<b>CEC</b>	carcinoma epidermóide ou carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>cN0</b>	pescoço clinicamente negativo
<b>CT</b>	centro do tumor
<b>DAB</b>	diamino benzidina
<b>DAPI</b>	diamidino phenylindole
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>DP</b>	desvio padrão
<b>ECE</b>	esvaziamento cervical eletivo
<b>ECR</b>	esvaziamento radical
<b>ECRM</b>	esvaziamento cervical radical modificado
<b>ECS</b>	esvaziamento cervical seletivo
<b>ECSOH</b>	esvaziamento cervical supraomohiideo
<b>EDTA</b>	ácido etilendiamino tetra-acético, do inglês, ethylenediamine tetraacetic acid
<b>EGFR</b>	receptor de fator de crescimento epidérmico, do inglês, epidermal growth factor receptor
<b>FI</b>	Fronte de invasão
<b>FISH</b>	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente, do inglês Fluorescent <i>in situ</i> Hybridization
<b>HCl</b>	ácido clorídrico
<b>HE</b>	hematoxilina eosina
<b>HER</b>	Human Epidermal growth factor receptor-type 2
<b>HPV</b>	papiloma vírus humano, do inglês human papiloma virus
<b>IBGE</b>	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

<b>IHQ</b>	Imunoistoquímica
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Cancer
<b>INCT/HPV</b>	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia das doenças do HPV
<b>JO</b>	Junções ocludentes
<b>LVD</b>	lymphatic vessel density
<b>MB</b>	membrana basal
<b>MEC</b>	matriz extracelular
<b>MMP-9</b>	metaloproteinases de matriz-9
<b>MVD</b>	microvessel density
<b>OBS</b>	observação
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>Pb</b>	pares de bases
<b>PBS</b>	tampão fosfato-salino, do inglês phosphate buffered saline
<b>PCR</b>	reação em cadeia polimerase
<b>PET-CT</b>	Tomografia por emissão de pósitron
<b>pN+</b>	metástase linfonodal
<b>PP</b>	panela de pressão
<b>RI</b>	recidiva ipsilateral
<b>RM</b>	Ressonância Magnética
<b>RT</b>	radioterapia
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sódio
<b>SOH</b>	supraomohiideo
<b>T</b>	Tumor
<b>TC</b>	Tomografia Computadorizada
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>TNM</b>	tumor, linfonodo, metástase
<b>UICC</b>	Union for international cancer control

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1	Marcadores Moleculares estudados .....	7
1.1.1	p53 .....	7
1.1.2	Ciclina D1 .....	7
1.1.3	EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) .....	8
1.1.4	K1-67 .....	11
1.1.5	Moléculas de Adesão .....	11
1.1.6	Podoplanina.....	15
1.1.7	Metaloproteinase-9 (MMP-9).....	16
1.1.8	p16 .....	17
1.2	Papiloma Vírus Humano HPV .....	19
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>21</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>23</b>
4.1	População e Período do Estudo .....	23
4.2	Aspectos Éticos .....	23
4.3	Tipo de estudo.....	24
4.4	Pacientes.....	24
4.4.1	Critérios de inclusão .....	24
4.4.2	Critérios de exclusão .....	25
4.4.3	Grupos.....	25
4.4.4	Esvaziamento Cervical Eletivo (ECE).....	25
4.5	Metástase Linfonodal Oculta .....	26
4.6	Dados Patológicos.....	26
4.7	Imunoistoquímica .....	31
4.7.1	Proteínas .....	33

4.7.2	Interpretação das reações imunoistoquímicas .....	34
4.8	Hibridização Fluorescente In Situ (FISH) para EGFR .....	43
4.8.1	Avaliação do FISH.....	44
4.9	Genotipagem HPV.....	44
4.9.1	Extração de DNA.....	44
4.9.2	Método de Detecção e Genotipagem do HPV.....	46
4.10	Análises Estatísticas.....	48
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
5.1	Dados demográficos e clínico-cirúrgicos .....	49
5.2	Dados clínico-patológicos.....	57
5.3	Dados imunoistoquímicos.....	64
5.3.1	p53 .....	64
5.3.2	Ki-67 .....	66
5.3.3	Ciclina D1 .....	68
5.3.4	EGFR .....	69
5.3.5	p16 .....	73
5.3.6	E-caderina .....	74
5.3.7	Podoplanina (D2-40) .....	75
5.3.8	$\beta$ -catenina.....	78
5.3.9	MMP-9.....	79
5.3.10	Claudina 7 .....	79
5.3.11	Todos os marcadores analisados.....	81
5.4	Hibridização in situ Fluorescente (FISH) .....	83
5.5	Detecção e Genotipagem para HPV .....	84
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>105</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>106</b>

## **ANEXOS**

**Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

**Anexo 2** Ficha Clínica

**Anexo 3** Tabela de Interpretação da genotipagem do Kit Inno-Lipa  
HPV

**Anexo 4** Artigo publicado na British Journal Maxillofacial Surgery

**Anexo 5** Artigo aceito para publicação na revista Head and Neck

## 1 INTRODUÇÃO

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou para o Brasil, no ano de 2014, 11.280 casos novos de câncer de cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres. O câncer de boca é o quarto mais frequente em homens e o nono em mulheres, nas regiões sudeste e nordeste do Brasil (Ministério da Saúde 2014). O câncer de cavidade oral representa cerca de 3% de todas as neoplasias e a Organização mundial de saúde (OMS) descreve um aumento na incidência dessa neoplasia em todo o mundo (BETTENDORF et al. 2004; MASSANO et al. 2006).

Os principais fatores de risco para o câncer de boca são: tabagismo, etilismo e as infecções pelo papiloma vírus humano (HPV), principalmente os subtipos 16 e 18. Estudos mostram um risco muito maior de desenvolver câncer de boca em indivíduos tabagistas e etilistas do que na população em geral, evidenciando a existência de uma sinergia entre tabaco e álcool (NEVILLE e DAY 2002; PAI e WESTRA 2009; LEEMANS et al. 2011). A dieta parece exercer um papel importante na prevenção desse tipo de câncer. Alguns estudos reportam que o aumento da ingestão de frutas e vegetais contribui para a diminuição do risco de desenvolver essa neoplasia (FRANCO et al. 1989; WINN 1995).

O câncer de boca acomete mais frequentemente homens acima dos 40 anos. O tipo histológico mais comum é o carcinoma epidermóide ou espinocelular (CEC), correspondendo a 95% desses tumores. Entre as

localizações anatômicas intra-bucais, encontramos maior frequência em língua e assoalho bucal (SCULLY 2009).

O prognóstico dos pacientes com câncer de boca é baseado clinicamente no local da cavidade oral comprometida e no estadiamento (sistema de classificação TNM), onde a extensão do tumor, a presença de metástase regional e/ou a distância são avaliados (LEEMANS et al. 2011).

As lesões iniciais (estádios I e II) têm um prognóstico melhor em comparação com as lesões avançadas (estádios III e IV). De acordo com a classificação TNM da UICC/AJCC (7ª edição), os tumores de cavidade oral são considerados T1 quando seu maior diâmetro não ultrapassa 2cm e T2 quando apresentam um tamanho entre 2cm a 4cm.

A recomendação do melhor tratamento para o câncer de língua e assoalho bucal ainda é discutível. A taxa de cura para pacientes com doença avançada ainda é modesta, e o número de recorrências, mesmo em casos diagnosticados em estádios iniciais, é relativamente elevado. A proporção de pacientes com metástase cervical no momento do diagnóstico é elevada, cerca de 50%. As taxas de sobrevida em 5 anos (sobrevida global, câncer específica e livre de doença) para pacientes com essa neoplasia variam muito de acordo com diferentes modalidades de tratamento (SESSIONS et al. 2002; MÄKITIE et al. 2007).

A escolha do tratamento do câncer de boca depende da localização e estágio da doença além da condição de saúde do paciente (BETTENDORF et al. 2004). A excisão cirúrgica, com ou sem o esvaziamento cervical, é o tratamento preconizado para tumores em estágio inicial na maioria das

instituições. Para tumores com disseminação metastática regional, padrão de crescimento agressivo ou para doença mais avançada recomenda-se a combinação de cirurgia e radioterapia (BYERS et al. 1998; WOLFENBERGER et al. 2001; SESSIONS et al. 2002; BETTENDORF et al. 2004; KESKI-SÄNTTI et al. 2007; DUNKEL et al. 2013).

A disseminação metastática do câncer de boca geralmente ocorre via sistema linfático; os linfonodos dos níveis I e II são os mais envolvidos (SHAH et al. 1990; WOOLGAR 1997; HUANG et al. 2008; KELNER et al. 2014). A metástase cervical é a principal causa de falha no tratamento desses tumores. O sistema de estadiamento (TNM) apenas não é capaz de prever os pacientes com maior risco de desenvolvimento de metástases (SPIRO et al. 1986).

A indicação do esvaziamento cervical pode ser classificada em: terapêutica, de oportunidade ou eletiva. O esvaziamento cervical eletivo (ECE) é indicado quando os linfonodos não tiveram comprovação de comprometimento clínico e/ou de imagem, porém o risco da metástase linfonodal oculta é maior que o risco associado ao procedimento cirúrgico e suas morbidades (KOWALSKI e SANABRIA 2007).

O ECE remove os linfonodos com maior risco de desenvolvimento de metástases microscópicas além de fornecer informações definitivas a respeito do status patológico dos linfonodos, ajudando a direcionar o uso adequado da terapia adjuvante (KOWALSKI e SANABRIA 2007; KESKI-SÄNTTI et al. 2007; D'CRUZ et al. 2009; GANLY et al. 2012).



A incidência de metástase linfonodal oculta do carcinoma epidermóide de boca estádios clínicos I e II varia de 14% a 45%, sendo esta maior nos tumores de língua e assoalho bucal (KLIGERMAN et al. 1994; OKAMOTO et al. 2002; AMARAL et al. 2004; FAUSTINO et al. 2008; THIELE et al. 2012). A presença da metástase linfonodal é o fator prognóstico mais importante, que reduz significativamente o controle da doença, diminuindo a sobrevida dos pacientes (SPIRO et al. 1986; LEEMANS et al. 1994; KLIGERMAN et al. 1994; DIAS et al. 2001; LIM et al. 2004; FERLITO et al. 2006; CHONE e CRESPO 2008; GANLY et al. 2012). Entre os vários métodos usados para detectar metástases cervicais, incluindo tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (RM), ultrassonografia e tomografia por emissão de pósitron (PET-CT), nenhum é capaz de detectar todas as micrometástases nos linfonodos cervicais (LIM et al. 2004; KOWALSKI e SANABRIA 2007).

A alta incidência de metástase cervical é o argumento mais importante para se indicar o esvaziamento cervical eletivo nos pacientes com tumores estádios I e II de língua e assoalho bucal. Os efeitos funcionais e estéticos indesejáveis, a morbidade e o custo causados pelo procedimento, todavia, são argumentos contra a indicação do ECE (KOWALSKI 2002).

A conduta tradicional para o tratamento do pescoço no carcinoma oral fundamenta-se em estudos de risco epidemiológicos; a indicação do esvaziamento cervical para os casos sem evidência clínica de acometimento linfático (N0) permanece controversa (STABENOW et al. 2007). Preconiza-se o esvaziamento cervical eletivo para todos os casos com risco de

metástase estimado em 20% ou mais (KOWALSKI e MEDINA 1998; LIM et al. 2004; CHONE e CRESPO 2008).

Determinar se o esvaziamento cervical eletivo será benéfico ou não ao paciente continua sendo um dilema para os cirurgiões de cabeça e pescoço. A identificação de fatores associados ao risco de metástase linfonodal facilitaria a seleção dos pacientes de alto risco, candidatos à realização do esvaziamento cervical eletivo (KOWALSKI e MEDINA 1998; KOWALSKI 2002; AMARAL et al. 2004).

Algumas características clínicas e patológicas do tumor são relacionadas à ocorrência de metástase linfonodal como localização e tamanho do tumor, grau de diferenciação, espessura e profundidade de invasão, margens comprometidas, infiltrado inflamatório, invasão vascular, invasão perineural (BYERS et al. 1998; KOWALSKI e MEDINA 1998; STABENOW et al. 2007; KESKI-SÄNTTI et al. 2007; CHONE e CRESPO 2008; LIAO et al. 2010) e infiltração muscular (AMARAL et al. 2004). Estes fatores relacionados ao comprometimento dos linfonodos regionais e presença de metástase à distância podem influenciar diretamente no prognóstico e sobrevida dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide oral (TEIXEIRA et al. 1996; TODD et al. 1997; AL-RAJHI et al. 2000; AMARAL et al. 2004).

Diversos estudos têm demonstrado participação de diferentes genes e proteínas associadas ao potencial mais agressivo ou metastático do carcinoma epidermóide de boca (MÉNDEZ et al. 2007). Esses marcadores

podem ser úteis para selecionar os pacientes que potencialmente serão mais beneficiados com tratamentos mais agressivos.

A metástase é um processo complexo e é considerado um evento tardio na carcinogênese. As células proliferam, perdem contato com células vizinhas, migram através da matriz intersticial, invadem vasos linfáticos e sanguíneos e crescem novamente em linfonodos e órgãos distantes. Genes expressos nessas etapas podem ser usados como marcadores preditivos de metástases linfonodais, porém ainda não se sabe quais marcadores são preditivos para metástase de linfonodos cervicais clinicamente negativos em pacientes portadores de carcinoma inicial de boca (LIM et al. 2004).

A melhoria das técnicas de biologia molecular tem permitido a proliferação de estudos em que a importância preditiva de fatores moleculares relacionados ao tumor, no que diz respeito ao processo de metastatização, tem sido pesquisada (CORTESINA e MARTONE 2006).

A imunohistoquímica (IHQ) é uma ferramenta globalmente disponível que complementa a análise histopatológica pela detecção da expressão do gene a nível protéico. IHQ pode ser realizada em espécimes embebidos em parafina, fixados em formol, que podem ser armazenados durante um longo período de tempo, permitindo assim estudos retrospectivos de uma grande população (WERNER et al. 2005).

## **1.1 MARCADORES MOLECULARES ESTUDADOS**

### **1.1.1 p53**

O p53 é uma proteína bem reconhecida que regula o “check-point” do ciclo celular e é responsável por manter a integridade do genoma. A mutação do gene p53 é uma das mais conhecidas e mais frequentes alterações genéticas identificadas em tumores malignos (GASCO e CROOK 2003; MASSANO et al. 2006; PAI e WESTRA 2009; SARKIS et al. 2010; GRÖBE et al. 2014).

O aumento da expressão de p53 está associada ao maior número de metástases e está correlacionada com prognóstico ruim (OLIVEIRA et al. 2007, 2008). Contrariamente a esses achados, o estudo de KEUM et al. (2006) mostrou que a expressão de p53 e PCNA não foram marcadores preditivos para metástase linfonodal oculta nos pacientes portadores de carcinoma de língua clinicamente N0. No estudo de GRÖBE et al. (2014) a expressão de p53 não teve relação com os parâmetros clínico-patológicos avaliados nem impacto no prognóstico dos pacientes com carcinomas de boca.

### **1.1.2 Ciclina D1**

A ciclina D1 é uma molécula reguladora do ciclo celular, no controle da fase G1 para fase S, e tem sido associada ao aumento do risco de metástases linfonodais em câncer de língua (BOVA et al. 1999) e boca, além de ser um fator prognóstico e marcador útil para determinar tratamento

apropriado (CARLOS DE VICENTE et al. 2002; MASSANO et al. 2006).

O p53, a ciclina D1 e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) são marcadores moleculares que regulam o ciclo celular ou crescimento celular e desempenham um papel importante no desenvolvimento e progressão tumoral. SHIRAKI et al. (2005) examinaram o impacto da expressão imunoistoquímica destes marcadores na progressão tumoral de 140 casos de carcinoma epidermóide de boca. Esses autores identificaram uma associação significativa entre a expressão combinada dessas proteínas e o padrão de crescimento tumoral invasivo, presença de metástase linfonodal e sobrevida global desfavorável. Sugerindo que a expressão combinada destes marcadores pode ser um indicador útil na identificação de pacientes de baixo e alto risco.

### **1.1.3 EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico)**

O gene do EGFR (ErbB1 ou HER1) situa-se na região cromossômica 7p12 e codifica uma glicoproteína transmembrana que atua como um receptor do fator de crescimento celular. A proteína pertence à família do EGFR subgrupo dos RTK (receptor de tirosina-quinase) também incluindo ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3), e ERBB4 (HER4). A união com seus ligantes específicos, tais como fator de crescimento epidérmico (EGF) e fator de crescimento transformador- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ), promove a homo ou heterodimerização com outros membros da família (ERBB2, ERBB3 e ERBB4) e subsequente auto-fosforilação iniciando as vias de sinalização. A alta expressão do EGFR em tumores tem sido correlacionada com a proliferação

celular, invasão, angiogênese, metástases, migração e a inibição da apoptose. O EGFR é superexpresso em muitas neoplasias malignas epiteliais, sendo considerado um alvo interessante para a terapia (SZABÓ et al. 2011; HUANG et al. 2012; BERNARDES et al. 2013).

Os estudos clínicos sugerem uma atividade importante dos inibidores de EGFR como um tratamento para tumores de cabeça e pescoço (HUANG et al. 2012). No entanto, algumas questões precisam ser abordadas, como a melhor forma de avaliar a expressão de EGFR ou se existe uma correlação entre a expressão de EGFR e o prognóstico do paciente. A superexpressão de EGFR tem sido relatada em 30-90% dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço (ULANOVSKI et al. 2004; SZABÓ et al. 2011; HUANG et al. 2012; MONTEIRO et al. 2010, 2012), e a incidência da amplificação do gene foi demonstrada em cerca de 15-31% (BERNARDES et al. 2013). Alguns autores constataram que a superexpressão de EGFR e amplificação tiveram relação com a diferenciação tumoral e pior prognóstico nos tumores de cabeça e pescoço (ULANOVSKI et al. 2004; HUANG et al. 2012; SZABÓ et al. 2011).

A técnica de hibridização “in situ” fluorescente (FISH) é projetada para detectar a amplificação gênica. A amplificação do gene EGFR é, frequentemente observada em neoplasias sólidas. O número de cópias do EGFR identificado por FISH é utilizado para avaliação prognóstica das neoplasias. No câncer de pulmão não pequenas células, o aumento do número de cópia do EGFR, avaliado por FISH, foi correlacionada com a evolução clínica significativamente melhor em pacientes tratados com

inibidores de EGFR, sugerindo que o número de cópias do gene pode ser um ótimo preditor prognóstico e de resposta ao tratamento. No entanto, esta associação ainda não foi claramente demonstrada nos tumores de cabeça e pescoço (BERNARDES et al. 2013).

Além disso, existem vários relatos conflitantes sobre a associação entre a expressão da proteína EGFR por imunohistoquímica e sobrevida nos tumores de cabeça e pescoço. Muitos estudos têm indicado que a superexpressão da proteína EGFR é significativamente correlacionada com a sobrevivência em diversos tumores, incluindo cavidade oral (LAIMER et al. 2007; SZABÓ et al. 2011), enquanto outros não encontraram essa associação (ULANOVSKI et al. 2004; BERNARDES et al. 2013). Além disso, dados conflitantes foram reportados em relação ao número de cópias do EGFR e a sobrevida e entre a associação do número de cópias e a expressão da proteína EGFR por imunohistoquímica. Essas discrepâncias podem resultar de diferenças na localização e padrão histológico do tumor, números de pacientes, heterogeneidade e os métodos utilizados para avaliar o número de cópias.

A associação entre a alteração no número de cópias do EGFR e a expressão dessa proteína é importante para determinar qual é o mais confiável como indicador prognóstico no carcinoma epidermóide de boca.

#### **1.1.4 Ki-67**

O Ki-67 é um marcador de proliferação celular, altamente expresso na maioria dos tumores, que identifica um antígeno expresso nas fases G1, S e G2 do ciclo celular. O aumento de sua expressão foi associado à presença de metástase linfonodal (COUTINHO-CAMILLO et al. 2010) e seu índice tem sido correlacionado com alto risco de recorrência (SILVA et al. 2008) e pior prognóstico em pacientes com CEC de língua (XIE et al. 1999; SILVA et al. 2008) e boca (MYOUNG et al. 2006; COUTINHO-CAMILLO et al. 2010).

#### **1.1.5 Moléculas de Adesão**

No tecido epitelial o espaço entre as células vizinhas precisa estar bem selado, impedindo que o fluido extracelular extravase. Também é importante que a união entre essas células suporte tensões sem se romper. Como as células de um tecido atuam de modo integrado, é importante que haja comunicação e cooperação metabólica entre elas (ALBERTS et al. 2004).

Os complexos juncionais intercelulares são estruturas importantes para a arquitetura e funções fisiológicas dos organismos multicelulares. As junções celulares são áreas especializadas da membrana plasmática que são classificadas em três grupos, de acordo com a função que desempenham:

- Junções bloqueadoras ou ocludentes: selam as células adjacentes em uma camada epitelial, impedindo a passagem de substâncias entre o epitélio;



- Junções aderentes ou de ancoragem: conectam mecanicamente as células adjacentes e a matriz extracelular por meio do citoesqueleto;
- Junções comunicantes: permitem a passagem de sinais elétricos ou químicos entre as células adjacentes, formando junções conhecidas como “*gap*” ou fenda.

As Junções Ocludentes (JO) são os componentes mais apicais dos complexos juncionais e têm o papel no controle da polaridade epitelial e endotelial e agem como uma barreira paracelular no transporte de íons, água e proteínas. Acredita-se que as JO também estejam envolvidas na sinalização das cascatas que controlam o crescimento e a diferenciação celular (ALBERTS et al. 2004). Essas junções são compostas por várias proteínas de membrana e periféricas: ocludinas, claudinas e as zonas ocludentes 1 2 e 3.

- **Claudinas**

As claudinas, descobertas em 1998, são as principais proteínas de vedação da JO e parecem ser importantes na montagem e estabilização de cordões da JO. Elas estão ligadas à actina do citoesqueleto e participam na sinalização intracelular (FURUSE et al. 1999; TSUKITA e FURUSE 1999).

Alterações na expressão de claudinas têm sido detectadas em tumores e parecem estar correlacionadas com a sua progressão. No estudo de LOURENÇO et al. (2010) os padrões de expressão de claudinas mostrou uma forte correlação com o grau histológico de carcinomas orais. A expressão foi reduzida em áreas de invasão e negativa em tumores pouco

diferenciados. Este padrão pode estar relacionado com a evolução e o prognóstico destes tumores, especialmente o da claudina-7 que parece estar associada a um prognóstico reservado. Segundo BELLO et al. (2008) a análise da expressão de claudina-7 em carcinoma de língua pode ser útil para prever o comportamento do tumor e o prognóstico do paciente.

- **E-Caderina e  $\beta$ -catenina**

A adesividade célula-célula é geralmente reduzida em vários cânceres humanos. As células tumorais são dissociadas das massas tumorais, perdem sua polaridade celular e infiltram-se no estroma, levando a eventos metastáticos subsequentes. Este processo é um passo crucial para a progressão do tumor e a supressão da adesividade célula-célula pode desencadear a liberação de células tumorais dos “ninhos” do tumor primário conferindo propriedades invasivas a esse tumor (HIROHASHI 1998).

As moléculas de adesão intercelular são importantes no desenvolvimento do tumor, na invasividade e no aparecimento de metástases (MASSANO et al. 2006). Elas pertencem a quatro famílias de proteínas importantes: caderinas, integrinas, selectinas e imunoglobulinas. Essas proteínas interagem com as moléculas da membrana basal e regulam as interações espaciais e metabólicas, célula-célula e célula-matriz extracelular (CORTESINA e MARTONE 2006).

As moléculas de E-caderinas são expressas por todos os epitélios normais e mediam a adesão celular (CORTESINA e MARTONE 2006). O estudo de CHOW et al. (2001) demonstrou redução na expressão de E-

caderina e cateninas em carcinoma epidermóide de língua. Neste mesmo estudo, a E-caderina foi considerada fator prognóstico significativo de recorrência e sobrevida, o que indica que a baixa regulação de E-caderina foi um marcador genético importante para disseminação de células tumorais para invasão e metástase nos casos analisados (CHOW et al. 2001).

O sistema E-caderina e  $\beta$ -catenina está intimamente relacionado à invasão tumoral e metástase. Os resultados da análise multivariada do estudo de LIM et al. (2004) mostrou que a perda da expressão da E-caderina foi o único marcador imunohistoquímico associado à metástase cervical tardia. UEDA et al. (2006) mostrou que a redução na expressão de  $\beta$ - e  $\gamma$ -cateninas em carcinomas orais podem ser usadas como marcadores potenciais de risco para metástase linfonodal e mau prognóstico, sugerindo que estes pacientes com tumores apresentando nenhuma ou redução na expressão de  $\beta$ - e  $\gamma$ -cateninas deveriam ser selecionados para tratamentos mais agressivos.

Outro estudo evidenciou que a análise individual da expressão de  $\beta$ -catenina não representou um bom critério para predizer o risco de metástase em carcinomas epidermóides de língua, uma vez que, não houve diferença significativa na expressão entre os grupos com e sem metástases (FREITAS et al. 2010).

### 1.1.6 Podoplanina

A entrada de células tumorais em vasos linfáticos é um dos primeiros passos para a metástase linfática. A linfangiogênese ao redor de tumores sólidos pode promover metástase linfática, proporcionando uma rota de escape das células tumorais do sítio primário (SUGIURA et al. 2009; ZHANG et al. 2011).

O anticorpo D2-40 detecta um marcador seletivo para endotélio linfático, permitindo a identificação dos vasos linfáticos em tecidos fixados em formalina e incorporados em parafina, e diferenciando-os dos vasos sanguíneos (XUAN et al. 2005; MIYAHARA et al. 2007). Um elevado índice de densidade linfática (LVD, do inglês, lymphatic vessel density) e densidade de microvasos (MVD, do inglês, microvessel density) foram relacionados a metástase linfonodal e baixa taxa de sobrevida (MIYAHARA et al. 2007; ZHANG et al. 2011).

Pacientes com elevados valores de densidade linfática podem ter um risco aumentado de metástase linfonodal, corroborando com a idéia que a LVD é responsável pela predominância de disseminação linfática no câncer de boca. Biópsias pré-operatórias seguidas de coloração adicional para D2-40 e CD105 podem ser importantes indicadores prognósticos para progressão da doença e podem ser cruciais para decidir as estratégias terapêuticas para pacientes com câncer de boca (MIYAHARA et al. 2007).

A densidade linfática, usando o anticorpo D2-40 para detectar vasos linfáticos, foi significativamente relacionada à metástase linfonodal ( $p < 0.001$ ) em carcinoma epidermóide de boca no estudo de SUGIURA et al. (2009) e

foi um fator de risco independente para metástase linfonodal em carcinomas de língua no estudo de ZHANG et al. (2011).

### **1.1.7 Metaloproteinase-9 (MMP-9)**

Um acontecimento fundamental para o processo de invasão é a migração das células epiteliais neoplásicas rompendo o limite com o tecido conjuntivo. Para que esse fenômeno ocorra são necessárias alterações nas interações entre as células neoplásicas e a matriz extracelular (MEC) e o aumento na secreção das enzimas degradadoras da MEC. Dentre essas enzimas, destacam-se as metaloproteinases da matriz (MMP). Os níveis das MMP nos tecidos saudáveis são baixos ou praticamente indetectáveis, entretanto, sua expressão é substancialmente aumentada na maioria das neoplasias malignas, apresentando importante ação proteolítica nos processos de invasão e metástase. Neste aspecto, as MMP-2 e MMP-9 têm um papel crucial na progressão tumoral, atuando diretamente sobre os componentes da membrana basal (MB), que é essencialmente constituído por colágeno do tipo IV (FAN et al. 2012). Atualmente, é aceito que a MB, a qual separa o epitélio do tecido conjuntivo, representa a primeira estrutura a ser degradada durante o processo de invasão das células epiteliais neoplásicas (VICENTE et al. 2005).

As expressões de membros da família MMP em carcinomas orais são relatados amplamente; no entanto, a correlação dessas expressões com as características clínico-patológicas ainda é controversa. Alguns estudos demonstraram que as expressões MMP-9 está correlacionada com grau

histológico, estadiamento clínico, metástase linfonodal e à distância e pior prognóstico (KATAYAMA et al. 2004; APARNA et al. 2014).

### **1.1.8 p16**

A proteína p16, codificada pelo gene CDKN2A (INK4A), um gene supressor de tumor localizado no cromossomo 9p21, inativa a função do complexo de ciclina D CDK4- e CDK6. A progressão do ciclo celular é dependente da ação dos complexos Ciclinas-CDKs. A inibição deste processo é realizada por um grupo de proteínas que agem modulando a ação desse complexo chamado Proteínas Inibitórias dos Complexos Ciclinas-CDKs (CKIs); dentre elas destaca-se a proteína p16. A perda funcional do gene da p16 pode estar associada ao desenvolvimento e progressão de uma variedade de neoplasias malignas. Em situação normal de divisão celular controlada, a proteína p16 funciona como um regulador negativo do ciclo celular, pois bloqueia sua progressão na fase G1. Acredita-se que a perda desse mecanismo de controle negativo da divisão celular favorece a ocorrência dos primeiros passos necessários para a cancerização.

O estudo de PANDE et al. (1998) correlacionou a expressão imunohistoquímica do p16 com os dados clínicos (idade, sexo, TNM, uso do tabaco/betel) dos pacientes com carcinoma epidermóide de boca. Os autores observaram relação com o estadiamento do tumor, progressão e consumo de tabaco/betel.

No estudo de TSAI et al. (2001) houve uma correlação entre as

alterações do gene p16 e a presença de metástase linfonodal regional nos pacientes com carcinoma de boca.

O p16 é considerado um marcador imunoistoquímico para avaliação da infecção pelo HPV de alto risco em tumores de orofaringe. A alta expressão do p16 é altamente correlacionada com a positividade da PCR para HPV de alto risco, sendo uma alternativa ao PCR, por ser um teste tecnicamente simples e amplamente disponível (KLAES et al. 2001; KLUSSMAN et al. 2003; THOMAS e PRIMEAUX 2012; CHEN et al. 2012; DUNCAN et al. 2013; LINGEN et al. 2013).

A perda da expressão de p16 por deleção, mutação ou hipermetilação é comum em tumores de cabeça e pescoço. Porém, a inativação funcional do pRb pela proteína E7 HPV resulta em superexpressão de p16, o que faz o p16 um marcador indicativo para infecção pelo HPV. Do mesmo modo, a proteína E6 HPV pode inativar a p53, levando a uma baixa incidência de mutação da p53 em tumores HPV positivos (KUMAR et al. 2008).

A superexpressão do p16 está frequentemente relacionada a infecções por HPV de alto risco em tumores de orofaringe, razão do uso da expressão imunoistoquímica do p16 como um marcador substituto para a presença desse vírus. Os tumores relacionados com o HPV têm uma biologia distinta e muitas vezes evidenciam melhores respostas ao tratamento, o que torna a identificação do HPV importante nos cânceres de boca e orofaringe (EL-NAGGAR e WESTRA 2012).

Vários autores propõem a expressão imunoistoquímica do p16 como uma triagem inicial, seguida pela detecção do HPV com testes mais

específicos nos tumores positivos para o p16. Embora não existam normas internacionais para a detecção do HPV no câncer de cabeça e pescoço, dois algoritmos de diagnóstico têm sido propostos, o primeiro utiliza imunistoquímica para detectar p16, seguida pela PCR para os HPV de alto risco; o segundo também utiliza a técnica de imunistoquímica, seguido de hibridação “in situ” para detectar DNA viral (SMEETS et al. 2007; SINGHI e WESTRA 2010; EL-NAGGAR e WESTRA 2012; CANTARUTTI et al. 2014).

## **1.2 PAPILOMA VÍRUS HUMANO (HPV)**

Os tradicionais fatores de risco como o tabaco e o consumo de álcool continuam sendo os responsáveis pela maioria dos tumores de cabeça e pescoço. Porém, a infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) é hoje considerado um fator etiológico de um grupo de tumores de orofaringe, especialmente os localizados nas tonsilas (FAKHRY et al. 2008; NICHOLS et al. 2009; PAI e WESTRA 2009).

A prevalência dos tumores de cabeça e pescoço positivos para HPV varia de 20-60%. Os vários métodos de detecção contribuem para essa ampla variação. Estudos epidemiológicos mostram que os tumores associados ao HPV ocorrem mais frequentemente em orofaringe, em pacientes mais jovens, do gênero masculino, com condições sócio-econômicas mais favoráveis e estão expostos a mais parceiros sexuais e sexo oral comparados aos pacientes com tumores HPV negativos (SMITH et al. 2004).



Os tumores HPV positivos são clínica e molecularmente distintos dos HPV negativos e apresentam prognósticos diferentes (FAKHRY et al. 2008; NICHOLS et al. 2009; HENNESSEY et al. 2009; PAI e WESTRA 2009).

O papiloma vírus humano (HPV) é um importante fator etiológico do câncer de orofaringe e relaciona-se com o aumento da incidência deste tipo de tumor, principalmente em pacientes jovens (KUMAR et al. 2008). Porém seu papel no câncer de boca ainda não está bem esclarecido. DUNCAN et al. (2013) acredita ser o HPV de alto risco um fator causal no câncer oral. Já para LINGEN et al. (2013) o HPV não desempenha papel importante na etiologia do câncer de boca; apenas a presença do DNA do HPV não comprova uma associação causal do ponto de vista molecular.

## 2 JUSTIFICATIVA

Embora as metástases linfonodais sejam pouco frequentes nos tumores iniciais, quando presentes se relacionam com significativa piora no prognóstico. O cirurgião de cabeça e pescoço deve avaliar o risco de metástases ocultas e a possível indicação de um esvaziamento cervical eletivo. Considerando que a avaliação clínico-patológica e a expressão de algumas proteínas nos carcinomas epidermóides de boca em pacientes com exame da região cervical clinicamente negativos (cN0) podem estar relacionadas à ocorrência de metástase linfonodal oculta (pN+), estes potenciais marcadores poderiam ser úteis na identificação de tumores com maior risco de disseminação metastática e assim clinicamente serem utilizadas para selecionar pacientes candidatos a serem submetidos ao esvaziamento cervical eletivo.

### 3 OBJETIVOS

- Avaliar a incidência de metástases cervicais ocultas em pacientes com carcinoma inicial de língua e assoalho bucal submetidos ao esvaziamento cervical eletivo;
- Comparar os resultados tardios de diferentes abordagens terapêuticas (esvaziamento cervical eletivo versus observação) nos pacientes com tumores iniciais e pescoço clinicamente negativo;
- Analisar os fatores de risco para ocorrência de metástase cervical oculta em pacientes com pescoço clinicamente negativo;
- Avaliar a expressão imunoistoquímica de potenciais marcadores associados ao risco de metástase cervical em carcinomas epidermóides iniciais (T1-T2) de língua e assoalho bucal. Os fatores moleculares selecionados incluíram: p53, ciclina D1, Ki-67, EGFR, E-caderina,  $\beta$ -catenina, claudina-7, D2-40, MMP-9 e p16;
- Associar os fatores clínicos, patológicos e imunoistoquímicos com a sobrevida dos pacientes com tumores iniciais de língua e assoalho bucal.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 POPULAÇÃO E PERÍODO DO ESTUDO**

Do universo de pacientes atendidos pelo Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do A.C.Camargo Cancer Center, no período de 1980 a 2010, foram selecionados para compor a amostra do presente estudo, os pacientes portadores de carcinoma epidermóide de língua e assoalho bucal, estádios clínicos I e II, que foram submetidos ao tratamento cirúrgico como terapia inicial.

### **4.2 ASPECTOS ÉTICOS**

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center sob o protocolo de nº 1528/11 (Anexo 1). Todas as informações coletadas dos prontuários médicos e os dados anátomo-patológicos foram colhidos, analisados e serão publicados preservando-se o sigilo e anonimato dos pacientes elegíveis para o estudo.

### **4.3 TIPO DE ESTUDO**

Estudo de coorte retrospectivo. Através desse estudo procuramos avaliar: a incidência de metástase linfonodal oculta; os fatores clínicos, patológicos e imunoistoquímicos relacionados ao risco de metástase oculta e prognóstico dos pacientes; assim como, indiretamente avaliar intervenções terapêuticas ou preventivas para os pacientes com maior risco de desenvolverem a metástase cervical oculta.

### **4.4 PACIENTES**

Um total de 222 pacientes foram elegíveis para o estudo. Foram analisados os dados demográficos, cirúrgicos e clínico-patológicos dos pacientes (Anexo 2). Os casos foram estudados nos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico Estatístico (SAME) do A.C.Camargo Cancer Center. Da consulta realizada no arquivo de anatomia patológica, foram selecionados 150 blocos de parafina referentes aos pacientes estudados para a realização das reações de imunoistoquímica, extração de DNA e genotipagem de HPV e hibridização “in situ” fluorescente (FISH).

#### **4.4.1 Critérios de inclusão**

Foram incluídos os pacientes portadores de carcinoma epidermóide primário, estádios clínico I e II, ou seja, cT1N0M0 e cT2N0M0, localizados em língua e/ou assoalho bucal, submetidos à cirurgia no A.C.Camargo

Cancer Center como tratamento inicial, no período de 1980 a 2010, com seguimento clínico mínimo de 2 anos ou até o seu óbito.

#### **4.4.2 Critérios de exclusão**

Foram excluídos os pacientes cujas amostras não apresentaram representação adequada da neoplasia no bloco de parafina; os pacientes sem informações necessárias nos prontuários; os pacientes que foram submetidos à quimioterapia ou radioterapia previamente à cirurgia; os pacientes que apresentaram metástase cervical e/ou à distância no momento da admissão para o tratamento e os pacientes com tumores localizados em base de língua.

#### **4.4.3 Grupos**

Os pacientes do estudo foram separados em dois grupos de acordo com o tratamento do pescoço clinicamente negativo: o grupo dos pacientes submetidos ao esvaziamento cervical eletivo (ECE) e o grupo dos pacientes que foram submetidos a observação do pescoço.

#### **4.4.4 Esvaziamento Cervical Eletivo (ECE)**

Foram considerados do grupo do esvaziamento cervical eletivo os pacientes que foram submetidos ao tratamento cirúrgico do tumor associado ao esvaziamento eletivo dos linfonodos do pescoço no mesmo ato cirúrgico ou em um segundo momento após as características da peça cirúrgica

indicarem um alto risco de metástase oculta. Normalmente o segundo ato cirúrgico foi realizado após 3-4 semanas da primeira cirurgia.

#### **4.5 METÁSTASE LINFONODAL OCULTA**

A metástase linfonodal oculta foi considerada quando o pescoço, ao exame clínico e de imagem, foi considerado negativo para neoplasia, porém houve o envolvimento do linfonodo cervical pelo tumor confirmado através do exame anátomo-patológico; apenas nos pacientes submetidos ao esvaziamento cervical eletivo. Por tratar-se de um estudo retrospectivo, foram usados os cortes histológicos convencionais (não seriados) para as análises dos linfonodos esvaziados.

#### **4.6 DADOS PATOLÓGICOS**

Foram preparadas as lâminas dos blocos selecionados da peça cirúrgica e coradas com hematoxilina e eosina (HE). Todas as lâminas foram revisadas pela pesquisadora juntamente com o patologista colaborador do estudo para confirmação do diagnóstico, revisão e análise dos dados patológicos a serem utilizados na pesquisa. Nesta etapa conseguimos um total de 165 casos para análise.

Os dados patológicos analisados foram: grau de diferenciação histológica, espessura tumoral, tipo de invasão, infiltrado inflamatório, reação

desmoplásica, embolização vascular/linfática, invasão perineural, invasão muscular e invasão glandular.

Os critérios usados para definir as variáveis anatomo-patológicas foram:

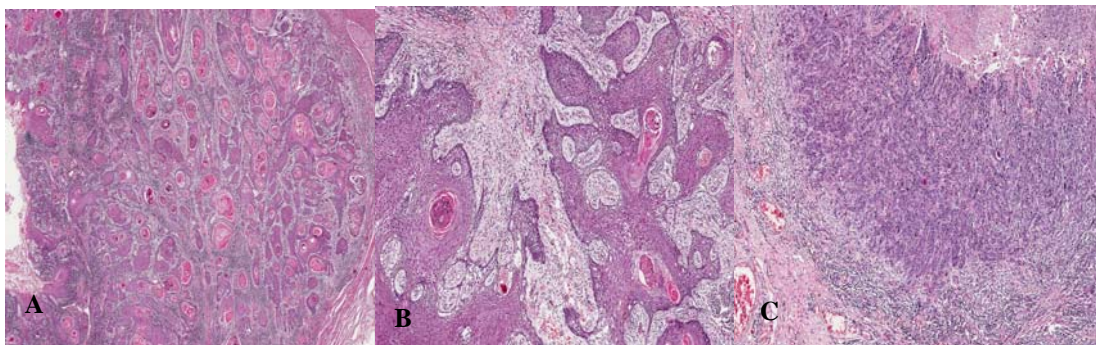
a) Grau de diferenciação histológica

Para o grau histológico foi utilizado os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), em que os tumores são classificados em: bem diferenciados ou grau I, moderadamente diferenciados ou grau II e pouco diferenciados ou grau III (Figura 1).

- I) Grau 1 (bem diferenciados): Caracterizados pela presença de células poligonais estratificadas, numerosas e visíveis pontes intercelulares, pouca mitose, pequeno grau de anaplasia, evidente queratinização, com visíveis e numerosas pérolas córneas.
- II) Grau 2 (moderadamente diferenciados): Caracterizados pela presença de células poligonais estratificadas, poucas pontes intercelulares, mitoses numerosas e atípicas, pleomorfismo nuclear evidente e com pérolas córneas escassas ou ausentes.
- III) Grau 3 (pouco diferenciados): Caracterizados pela raridade de células poligonais, com difícil visualização de pontes intercelulares. Predomínio de células pequenas alongadas e indiferenciadas, acentuado pleomorfismo e hiper cromasia nuclear com mitoses numerosas e atípicas.

Os tumores com diferentes características histológicas foram classificados segundo o aspecto predominante.



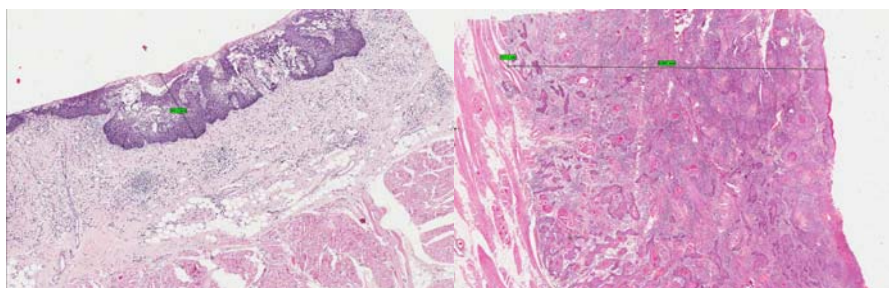


**Figura 1** - Grau de diferenciação histológica dos carcinomas epidermóides.

A: tumor bem diferenciado ou grau 1; B: tumor moderadamente diferenciado ou grau 2; C: tumor pouco diferenciado ou grau 3.

b) Espessura do tumor:

Para a análise de espessura tumoral foi traçada um linha reta começando da mucosa normal adjacente e realizada a medição até a porção mais invasiva do tumor (HUANG et al. 2009). Essa etapa teve o auxílio do software *Aperio's Image ScanScope*, em que as medidas são geradas com maior precisão (Figura 2). Para as análises estatísticas foram utilizados os “*cut-offs*” de 3mm, 4mm e 5mm.



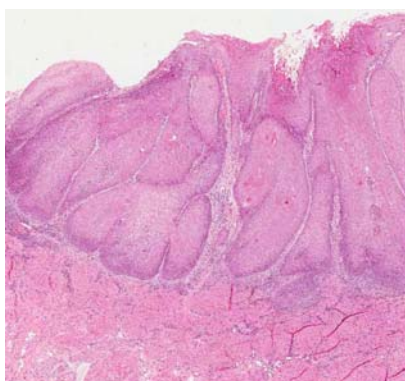
**Figura 2** - Fotomicrografia ilustrando a marcação da espessura tumoral traçada com auxílio do software *Aperio's Image ScanScope* em amostras de carcinomas epidermóides

c) Tipo de invasão tumoral

Padrão estabelecido segundo critérios modificados de ANNEROTH et al. (1987) e BRYNE et al. (1989).

- Padrão de infiltração tipo Deslocamento (“pushing”):

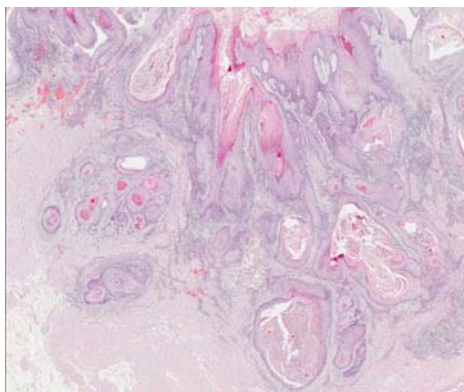
Caracterizado quando as células tumorais invadem em grandes blocos celulares com interface tumor-hospedeiro bem delimitada.



**Figura 3** - Carcinoma epidermóide apresentando padrão de invasão tipo “pushing”

- Padrão de infiltração tipo Infiltrante (“infiltrating”):

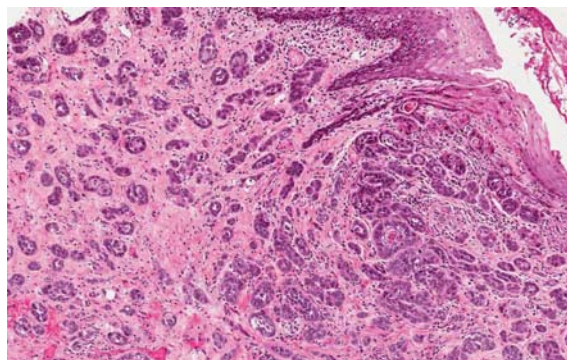
Caracterizado por invasão em blocos/bandas de cordões sólidos de células tumorais que infiltram amplamente o estroma do órgão.



**Figura 4** - Carcinoma epidermóide com padrão de invasão infiltrativo

- Padrão de infiltração dissociativo (“dissociation”):

Dissociação celular espalhada e pronunciada, pequeno grupo de células tumorais e/ou em células individuais infiltrando amplamente o estroma.



**Figura 5** - Carcinoma epidermóide com padrão de invasão tipo dissociativo

- d) Infiltrado inflamatório

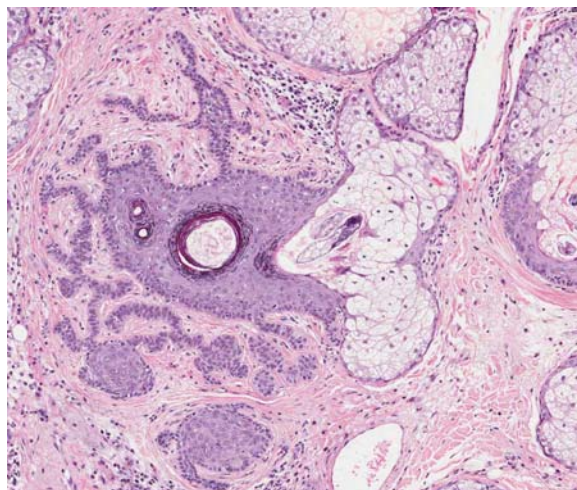
A presença do infiltrado inflamatório foi dividida em ausente, leve, moderado ou severo.

- e) Reação desmoplásica

A reação desmoplásica foi dividida em ausente, leve, moderada ou severa.

- f) Invasões vasculares, linfáticas, perineural, muscular e glandular

As invasões foram classificadas em ausente ou presente. Caso houvesse célula ou grupo de células tumorais invadindo francamente o tecido em questão.



**Figura 6** - Carcinoma epidermóide invadindo o tecido glandular

#### **4.7 IMUNOISTOQUÍMICA**

Todas as amostras em blocos de parafina foram cortadas em 3 $\mu$ m de espessura utilizando técnicas histológicas convencionais e foram transferidas para lâminas (StarFrost®, Waldemar Knittel, Germany).

As reações de imunistoquímica foram realizadas de forma automatizada, utilizando o equipamento Ventana BenchMark XT (ROCHE® Diagnostics, Mannheim, Alemanha). As reações foram sempre acompanhadas de um controle positivo conforme recomendação do fabricante.

As reações de imunistoquímica automatizadas seguem um protocolo estabelecido de acordo com os resultados obtidos por padronização prévia: o processo de desparafinização é realizado sem a necessidade do uso de xilol utilizando o reagente EZPrep (ROCHE®) e sucessivas lavagens com ReactionBuffer (ROCHE®). A recuperação antigênica é realizada utilizando-

se a solução Cell Conditioner (ROCHE®) por 30 minutos, 60 minutos ou 90 minutos a temperaturas pré-definidas. As lâminas são lavadas com Reaction Buffer, o bloqueio de proteínas inespecíficas é feito com UV INHIBITOR (ROCHE®). Após o bloqueio e séries de lavagens com Reaction Buffer, o anticorpo primário específico é incubado por um determinado tempo, que neste estudo variou de 16, 32 ou 60 minutos. Segue-se a etapa de revelação das marcações, submetendo-se as lâminas as soluções UV HRP UNIV MULT (ROCHE®), UV DAB (ROCHE®), UV DAB H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ROCHE®), UV COPPER (ROCHE®), todas intercaladas por lavagens com Reaction Buffer. A contra coloração é feita com HEMATOXYLIN II (ROCHE®) e BLUING REAGENT (ROCHE®). As lâminas foram retiradas do equipamento e submetidas a processos de desidratação e montagem também de forma automatizada, no equipamento *Tissue-Tek® Prisma®/Film®* (SAKURA).



**Figura 7** - Equipamento Ventana BenchMark XT (Roche®)

#### 4.7.1 Proteínas

As reações de imunistoquímica para p53, Ki-67, ciclina D1, E-caderina, EGFR, Podoplanina (D2-40),  $\beta$ -catenina, claudina-7 e p16 foram realizadas seguindo o protocolo da automação, mencionado acima, utilizando as proteínas conforme Tabela 1.

Para os anticorpos MMP-9 e EGFR (clone EGFR.25) foi utilizado o protocolo não automatizado. As lâminas preparadas foram desparafinizadas em estufa por 24 horas a 60°C, seguida de 2 banhos de xilol por 20 minutos. O tecido foi reidratado em banhos de etanol (100%, 85% e 75%) e as lâminas lavadas em água. A recuperação antigênica é um processo que aumenta a reatividade e foi realizada por tratamento com calor na presença de tampão de citrato 10mM pH 6.0, utilizando-se panela de pressão (PP) (Solar, Rapid Express, Tramontina<sup>®</sup>). Após a recuperação antigênica foi feito o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio 3% em 4 banhos de 5 minutos cada. Foi feita a lavagem em água corrente e destilada e com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10mM pH 7.4. As lâminas foram então incubadas com os anticorpos primários por 18 horas a 4°C com o anticorpo específico em câmara úmida na titulação de 1:50. Foi utilizado o Post Primary Block (NovoLink Max Polymer cod # RE7260-k, Reino Unido) por 30 minutos a 37°C e o kit NovoLink Polymer por 30 minutos a 37°C. As lâminas foram então incubadas em solução DAB e a contra coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.



**Tabela 1 - Proteínas do estudo**

Proteína	Marca	Clone	Diluição	Automação/Protocolo Ventana*	Padrão de marcação
p53	Dako	D0-7	1:1000	60CC1/32AB	Núcleo
Ki-67	Ventana/Roche	30-9	ready-to-use	60CC1/16AB	Núcleo
Ciclina D1	Ventana/Roche	SP4-R	ready-to-use	30CC1/32AB	Núcleo
E-caderina	BD	36	1:2000	60CC1/32AB	Membrana
$\beta$ -catenina	Cell Marque	14	ready-to-use	30CC1/32AB	Núcleo e membrana
Claudina-7	Invitrogen	5D10F3	1:500	60CC1/60AB	Membrana
EGFR	Ventana/Roche	3C6	ready-to-use	30CC1/32AB	Membrana
EGFR	Novocastra/Leica	EGFR.25	1:50	PP**/citrato/pH 6.0	Membrana
Podoplanina	Cell Marque	D2-40	ready-to-use	30CC1/32AB	Vaso linfático
MMP-9	Calbiochem	56-2A4	1:50	PP**/citrato/pH 6.0	Citoplasma
p16	Ventana/Roche	E6H4 <sup>TM</sup>	ready-to-use	30CC1/32AB	Núcleo e citoplasma

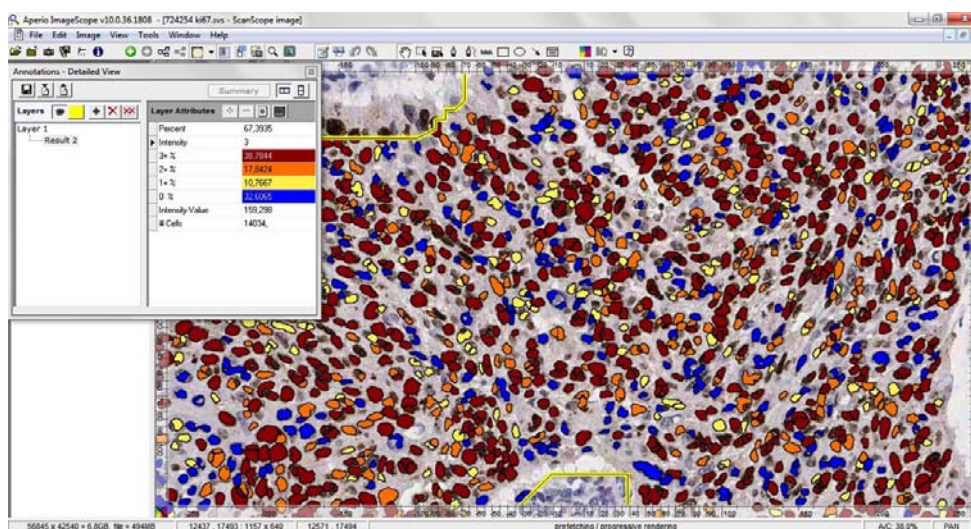
Tempo utilizado para o CC1 e para incubação do anticorpo primário, por exemplo: 60CC1/32AB- 60minutos do CC1 e 32 minutos da incubação do anticorpo primário.

\*\* PP: Panela de Pressão

#### 4.7.2 Interpretação das reações imunoistoquímicas

A avaliação dos resultados do estudo imunoistoquímico das proteínas p53, Ki-67, ciclina D1 e  $\beta$ -catenina foi realizada, quantitativamente e de forma automatizada, por meio do sistema *Aperio ImageScope® systems XT*, da Aperio (Vista, CA, EUA), que é composto por um microscópio digital automatizado (*escaneador* de lâminas) com lentes objetivas de 20x, com capacidade de reconhecer o tecido e dar foco automaticamente, acoplado a uma câmera com resolução de 50.000 *pixels* por polegada (0,5  $\mu$ m *per pixel*) e a um software de computador que analisa as lâminas de acordo com parâmetros pré-estabelecidos. O sistema de análise do *Aperio* constitui-se de algoritmos para núcleo, membrana, quantificação da intensidade de coloração, entre outros, que são baseados em métodos de processamento da morfologia da imagem. O software fornece informações da percentagem

de células que apresentaram marcação, da diferença de intensidade das marcações encontradas e o número total de células marcadas analisadas (Figura 8).



**Figura 8** - Exemplo da análise no sistema *Aperio ImageScope* com a geração da planilha com a percentagem e intensidade das células marcadas e o número total de células analisadas. As células coradas em vermelho representam as células com intensidade de coloração forte (3+); as coradas em laranja representam as com intensidade de coloração moderada (2+); as amarelas, com intensidade fraca (1+) e as em azul são as células que não apresentaram marcação do anticorpo em análise (0).

As lâminas de imunohistoquímica foram digitalizadas e as imagens capturadas e analisadas. Como as proteínas p53, Ki-67 e ciclina D1 têm sua expressão no núcleo, o algoritmo *NuclearV1* foi utilizado para suas respectivas análises. No caso da  $\beta$ -catenina foi utilizado tanto o algoritmo nuclear como o de membrana (*MembraneV1*). As expressões de imunohistoquímica para esses anticorpos foram contadas com base tanto na intensidade da coloração e também na proporção (porcentagem) de células



positivas, gerando quatro grupos de tumores. Esses resultados obtidos foram arquivados em uma planilha de Excel para a avaliação estatística.

A positividade nuclear para p53, ciclina D1 e Ki-67 foram avaliadas nas áreas do fronte de invasão tumoral, com um mínimo de 1000 células tumorais selecionadas para análise. A percentagem de células do tumor imunorreativas para p53, ciclina D1 e Ki-67 foi pontuada de 0 a 3: (0)= <1% de células tumorais positivas, (1)= 1-10% das células tumorais positivas, (2)=11-50% células tumorais positivas, (3)= > 50% das células tumorais positivas.

#### **A p53**

Para análise estatística da imunexpressão da proteína p53 e para a análise de sobrevida foram considerados casos positivos aqueles com mais de 10% de células tumorais marcadas (scores 2 e 3). Segundo HASEBE et al. (1994), para avaliação da imunexpressão da p53, o limite de 10% pode ser indicado para a separação de bom e mau prognóstico e este valor tem sido utilizado na maioria dos artigos publicados (YUEN et al. 2001; CHOI et al. 2002; CARLOS DE VICENTE et al. 2004; LIM et al. 2004; KEUM et al. 2006).

#### **B Ciclina D1**

Baseado no estudo de LIM et al. (2004), os tumores que expressaram menos de 40% de ciclina D1 foram considerados de baixa expressão e os que expressaram mais de 40% foram considerados de alta expressão.

### **C Ki-67**

Para análise estatística do Ki-67, foi realizada uma média da porcentagem de expressão de todos os casos e consideramos a média como um “*cut-off*” para definição de baixa e alta expressão. Foi utilizado um outro “*cut-off*”, de 30%, para definir alta e baixa expressão de Ki-67 baseado no estudo de LIM et al. (2004).

### **D $\beta$ -catenina**

Para a expressão de  $\beta$ -catenina, uma coloração específica na membrana e/ou núcleo foi definida como coloração positiva. A porcentagem de células marcadas no núcleo e membrana foram avaliadas separadamente com os seus respectivos algoritmos (*nuclearV1* e *membraneV1*).

A coloração de  $\beta$ -catenina na membrana foi pontuada como se segue: os tumores mostrando imunopositividade em >50% na membrana das células foram classificados como positivos, enquanto que aqueles tumores que mostram a imunocoloração de <50% das células tumorais foram classificados como negativos (CHOW et al. 2001; LIM et al. 2004).

Para a coloração nuclear de  $\beta$ -catenina, os tumores foram pontuados como se segue: (0)= <10% de células tumorais mostrando imunorreatividade, (1)= 10-30% de células tumorais que mostram imunorreatividade, (2)= 31-50 % de células tumorais mostrando imunorreatividade; (3)= >50% das células tumorais mostrando imunorreatividade. Para análise estatística consideramos os tumores

positivos os que apresentaram expressão em mais de 10% dos núcleos das células tumorais (scores 1, 2 e 3).

As proteínas E-caderina, claudina-7, podoplanina (D2-40), metaloproteinases de matriz-9 (MMP-9), p16 e EGFR foram avaliadas através do microscópio óptico, de forma não automatizada, pela pesquisadora em conjunto com o patologista colaborador do estudo, sem o conhecimento da evolução clínica no momento da análise. No caso da podoplanina foi realizada a contagem dos vasos linfáticos intra e peritumorais.

## **E E-caderina**

Para avaliação da E-caderina tanto o Centro do Tumor (CT) como o Fronte de Invasão (FI) foram avaliados. Porém, para análise estatística somente o FI foi levado em consideração.

Os critérios utilizados para a avaliação foram baseados nos critérios de FAN et al. (2013) e CHENG et al. (2013):

A distribuição/intensidade de coloração:

- Marcação negativa em algum “ninho” tumoral no fronte de invasão (“hot spot”) (= 0),
- Marcação indefinida com irregularidade na marcação do anticorpo em membrana (= 1),
- Marcação definida, porém com descontinuidade na marcação (= 2)
- Marcação positiva e definida na membrana (nenhuma perda) (= 3)

Porcentagem de células positivas:

- amostras com “hot spot” negativo foram consideradas 0,
- amostras com 1-10% de células positivas (= 1),
- 11-75% positivas (= 2),
- >75% (= 3).

Após essa análise semi-quantitativa, um score foi gerado. Onde os casos com distribuição de perda 0 e 1 foram considerados negativos e os casos com marcação definida e nenhuma perda (2 e 3), com percentagem de células >10%, foram consideradas positivas.

- Score 0- expressão negativa para E-caderina em algum ninho tumoral
- Score 1- marcação indefinida e irregular de E-caderina
- Score 2- marcação definida e descontínua de E-caderina
- Score 3- não houve perda na expressão de E-caderina

## **F Claudina-7**

As seguintes pontuações foram atribuídas para avaliação da claudina-7:

- Score 0-para menos do que 10% de positividade,
- Score 1-para a positividade detectada entre 10-50% na membrana das células do tumor,
- Score 2-para a positividade detectada em mais de 50% na membrana das células tumorais.

Para a análise estatística, os casos foram reagrupados como negativo (até 10% de células positivas) e positivo (mais do que 10% de células positivas). As glândulas salivares foram consideradas como controle interno da amostra (LOURENÇO et al. 2010).

## **G Podoplanina**

Para contagem dos vasos linfáticos, as áreas de tumor invasivo que contém o maior número de vasos linfáticos foram examinadas por microscopia óptica de luz. Os vasos subjacentes ao epitélio de revestimento não foram considerados na contagem dos vasos. No entanto, estes vasos serviram como controle interno na avaliação da qualidade de coloração para o D2-40. As áreas peri e intra-tumorais foram avaliadas separadamente. Os vasos individuais marcados com D2-40 foram contados em 5 campos de 400x (ou seja, 40x lente objetiva e 10x lente ocular). Cada contagem foi expressa como o maior número de vasos identificados dentro do campo de 400x (WEIDNER et al. 1991).

Foi calculada a média de vasos linfáticos nos cinco campos. Essa média da contagem dos vasos dos 5 campos analisados foi considerada a densidade de vasos linfáticos (LVD) e foi comparada entre os grupos com presença ou ausência de metástase linfática. Também efetuamos a contagem total dos vasos nos 5 campos gerando um total de vasos peritumoral e outro total de vasos intratumoral.

## **H MMP-9**

O score gerado para MMP-9 foi baseado na percentagem e intensidade das células tumorais marcadas, sendo a intensidade graduada em (0) nenhuma marcação, (1) marcação fraca, (2) marcação moderada, (3) marcação forte. A percentagem foi dividida em (0) <10% das células tumorais marcadas (1) entre 10-50% e (2) >50% das células tumorais marcadas (FRANCHI et al. 2002; BARROS et al. 2011). Foi realizada a somatória da intensidade e percentagem e gerando um score de 0-5. Os tumores com score entre 0-3 foram considerados negativos e de 4-5 positivos.

## **I p16**

A expressão de p16 foi avaliada de acordo com a marcação do núcleo e/ou citoplasma das células do tumor. A expressão de p16 foi avaliada de acordo com os parâmetros de KLAES et al. (2001) como se segue:

- negativo (<1% das células foram positivas);
- esporádicos (células isoladas foram positivas, mas <5%);
- focal (pequeno grupo de células focais positivas, entre 5 a 25% das células);
- difuso (>25% das células foram positivas).

Os resultados de p16 foram classificados em positivos ou negativos. Consideramos como positivos todos os casos com >5% das células tumorais marcadas (focal ou difuso) incluindo a marcação no núcleo, no citoplasma ou em ambos.

## J EGFR

Para avaliação da expressão de EGFR somente a marcação da membrana foi considerada. A expressão de EGFR foi avaliada de acordo com uma escala de quatro pontos previamente definidos com base na imunomarcação das membranas das células do tumor da seguinte forma: (0)-sem marcação ou marcação em <10% das células tumorais, (1)-marcação fraca, homogênea ou desigual em >10% das células tumorais, (2)-marcação moderada, homogênea ou desigual em >10% das células tumorais, (3)-marcação intensa, homogênea em toda membrana celular em >10% das células tumorais. Esta escala foi subsequentemente agrupada em duas categorias: negativo (0 ou 1) e positivo (2 ou 3) (MONTEIRO et al. 2010, 2012; BERNARDES et al. 2013).

Diante dos poucos casos considerados positivos na imunoistoquímica utilizando o anticorpo contra EGFR, clone 3C6 (Ventana Medical System, Inc.), que é um anticorpo monoclonal de camundongo dirigido contra o domínio extracelular da proteína de EGFR humano, nós realizamos novas reações de imunoistoquímica contra EGFR utilizando um outro clone de anticorpo, agora dirigido contra o domínio intracelular da proteína (clone EGFR.25 Novocastra, Leica), que foi realizado utilizando a metodologia não automatizada, numa titulação 1:50. A avaliação deste novo anticorpo seguiu os mesmos parâmetros utilizados com o clone anterior.

#### **4.8 HIBRIDIZAÇÃO FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH) PARA EGFR**

De acordo com os dados encontrados a partir da imunoistoquímica para o EGFR, foi realizada a *hibridização in situ fluorescente* (FISH), método considerado “padrão-ouro” para verificar a amplificação do gene EGFR nos casos considerados positivos na imunoistoquímica. A hibridização “in situ” fluorescente é uma técnica de custo elevado e requer equipamento e técnica especializados, com microscópio de luz fluorescente e avaliação das lâminas em campo escuro.

As lâminas com cortes convencionais dos casos de carcinoma de língua e assoalho bucal positivos na imunoistoquímica para EGFR foram desparafinizadas por banhos em xilol e álcool, lavagens em água destilada e um banho em 0,2N HCl, por 20 minutos à temperatura ambiente. Os cortes receberam um pré-tratamento em tampão citrato, pH6.0, a 80°C, em banho maria por 1 hora. A digestão enzimática foi feita com pepsina (ready-to-use, DAKO) por 8 minutos à temperatura ambiente, seguida por lavagens em solução 2x SSC. As lâminas foram desidratadas em banhos seguidos de álcool nas concentrações de 75%, 80% e 100%. Após secagem ao ar, a sonda para EGFR (ZytoLight® SPEC EGFR/CEN 7 Dual Color Probe, Zytovision) foi aplicada. A incubação ocorreu no Hibridizador (Hibridyzer, DAKO), por 10 minutos a 75°C para desnaturação do DNA, e então por 44 horas a 37°C para hibridização da sonda.

As lâminas foram colocadas em solução pré-aquecida a 45°C em



banho maria por 30 minutos com uréia 1,5M e 0,1xSSC, e lavadas em solução 2xSSC. Após desidratação em banhos em etanol 75%, 80% e 100% e secagem das lâminas ao ar, foram aplicados 15µL de DAPI e foi colocada a lamínula para montagem das lâminas.

#### **4.8.1 Avaliação do FISH**

Os cortes foram avaliados em microscópio de fluorescência. Casos apresentando dois sinais de cada sonda foram considerados sem alteração e casos com mais de três sinais de cada sonda foram considerados polissômicos. Os casos com uma razão maior que 2 com relação gene/centrômero (mais de 5 sinais do gene em comparação com os sinais do centrômero do cromossomo) avaliados em mais de 20 núcleos foram considerados amplificados.

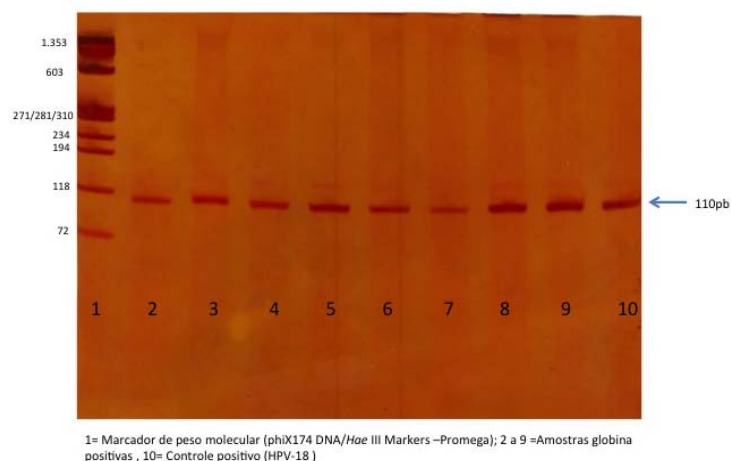
### **4.9 GENOTIPAGEM HPV**

Para testar se a expressão imunoistoquímica de p16<sup>INK4a</sup> nas amostras positivas está ou não associada à presença do DNA do Papiloma vírus humano (HPV), foram realizadas a detecção e genotipagem destes casos.

#### **4.9.1 Extração de DNA**

Para a investigação da infecção pelo HPV, foram coletados 96 amostras da nossa casuística embebidos em parafina. Foram realizados

cortes seriados dos blocos de tumor, com 4 um de espessura, confirmados previamente por HE e os cortes intermediários montados em lâminas de vidro para extração de DNA. Esses tecidos foram raspados com lâminas de bisturi estéreis (uma para cada caso) e transferidos para tubos de polipropileno de 1,7ml estéreis. Para a extração de DNA utilizou-se solução de proteinase K 0,1% em SDS (Dodecilsulfato de sódio) e em TE (tris-EDTA) pH 9, seguido de precipitação com sulfato de amônia (2,5mM) e etanol 100%. Os DNAs foram recuperados através de centrifugação a 4<sup>o</sup>C e lavados duas vezes com etanol 70%. Em seguida, foram quantificados no Nanodrop (Thermon Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA). As concentrações dos DNAs foram padronizadas para 50ng/ul e a qualidade confirmadas através da PCR utilizando iniciadores de  $\beta$ -globina humana PCO3/PCO4 (amplicom 110pb) (SAIKI et al. 1985) analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 8% (Figura 9) (SAMBROOK et al. 1989).

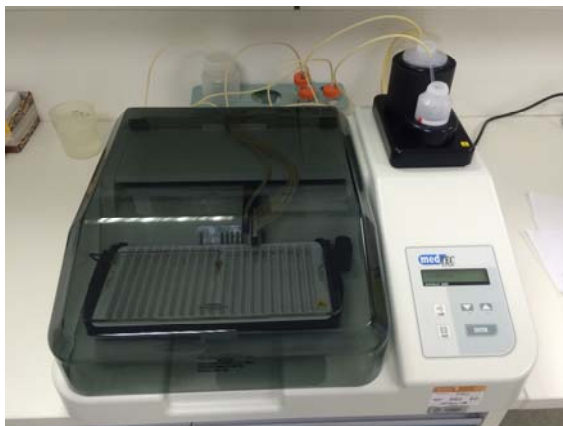


**Figura 9** - Eletroforese em gel de poliacrilamida 8% para testar a qualidade do DNA das amostras de carcinoma epidermóide de língua e assoalho bucal com  $\beta$ -globina humana (amplicom 110 pb).

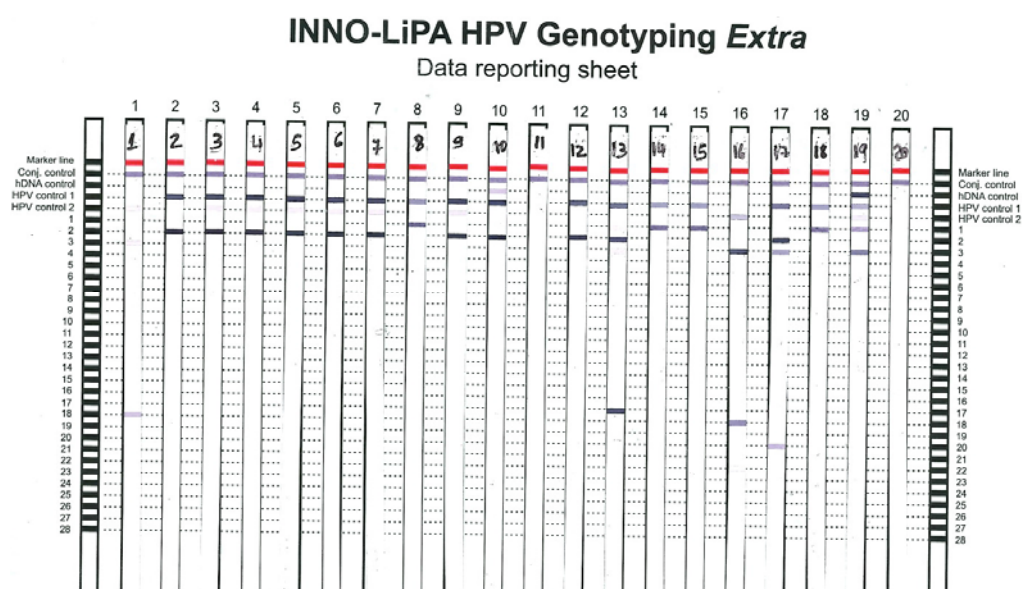
#### **4.9.2 Método de Detecção e Genotipagem do HPV**

Para detecção e genotipagem do HPV foi utilizado o kit Inno-Lipa (Innogenetics, Gent, Bélgica), que amplifica a região mais conservada do genoma de HPV (L1) utilizando iniciadores SPF10 biotinilados seguido de hibridização reversa em linhas. O teste consiste em uma amplificação inicial para detecção de HPV seguido de teste de hibridização para genotipagem. Este kit identifica 28 genótipos diferentes do HPV. O ensaio abrange genótipos de HPV de alto risco (16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 66, 68, 73, 82), baixo risco (6, 11, 40, 43, 44, 54, 70) e alguns tipos adicionais (69, 71, 74).

As etapas de detecção e genotipagem de HPV foram realizadas em colaboração com o Instituto Nacional de Ciências e Tecnologia das Doenças do HPV/Instituto de Pesquisa da Santa Casa de São Paulo (INCT/HPV). As reações foram realizadas, seguindo o protocolo do fabricante, de forma automatizada, utilizando o equipamento AUTO BLOT 3000 (MEDTEC Inc., Chapel Hill, NC) (Figura 10). A incubação com o cromógeno produz na fita um precipitado na cor púrpura (Figura 11) e os resultados são interpretados visualmente com auxílio da tabela de interpretação do Kit (Anexo 3).



**Figura 10** - Equipamento AUTOBLOT 3000 utilizado na genotipagem de HPV



**Figura 11** - Representa parte do diagrama que acompanha o Kit Inno-Lipa para a interpretação dos resultados de HPV. Do número 1 a 18- amostras do estudo 19- controle positivo e 20- No DNA (controle negativo).

#### 4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

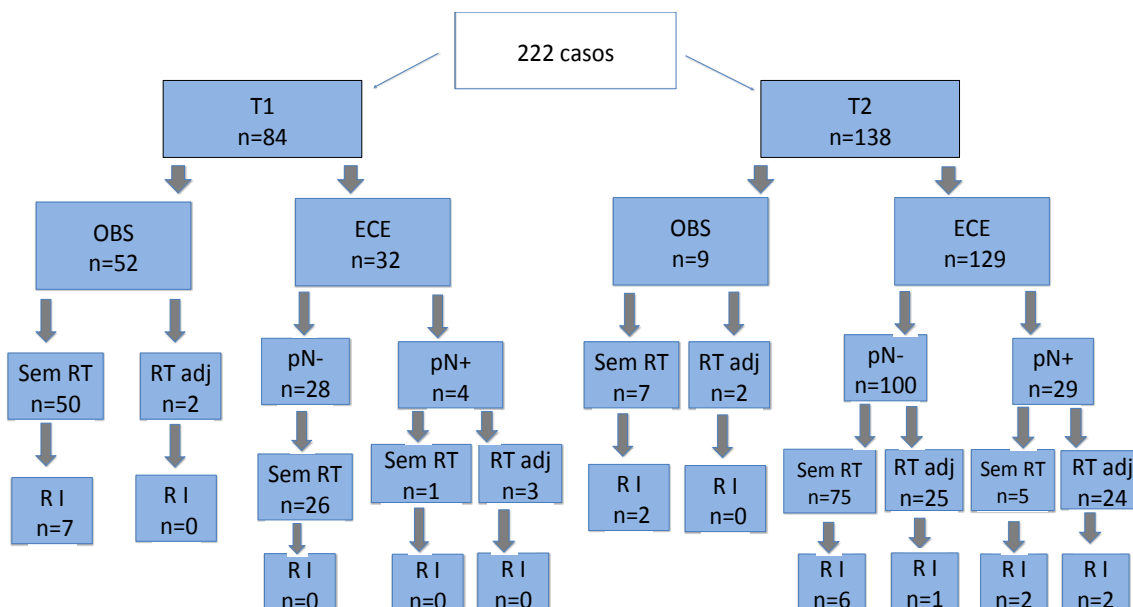
Os dados foram avaliados usando o software estatístico SPSS, versão 20 (IBM SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). A associação entre a presença de metástase linfonodal oculta e as variáveis clínico-patológicas e imunoistoquímicas foram analisadas utilizando os testes de qui-quadrado e/ou Exato de Fisher. A sobrevida global foi calculada usando os dados a partir da data da cirurgia até a data da última informação objetiva de seguimento ou óbito. A sobrevida câncer específica foi calculada a partir da data da cirurgia até a data do óbito pelo câncer de língua e/ou assoalho de boca. Para as curvas de sobrevida foi utilizando o método de Kaplan-Meier e estas foram comparadas pelo teste de long-rank. Para todos os testes, o erro  $\alpha$  foi estabelecido como 5%, isto é, os testes foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

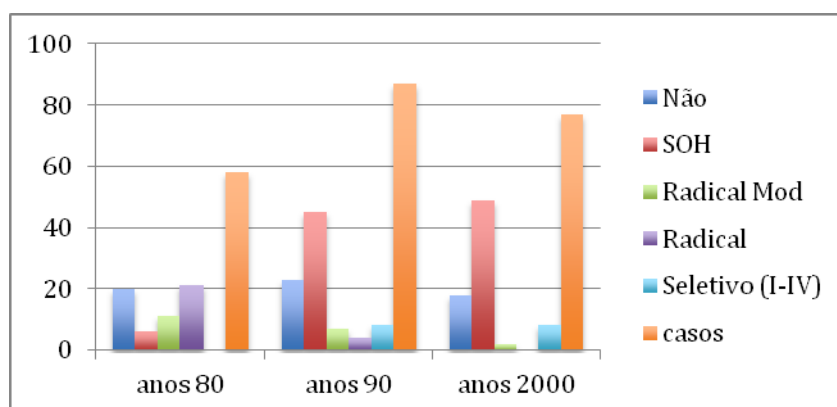
### 5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICO-CIRÚRGICOS

Um total de 222 pacientes foram elegíveis para o estudo clínico, incluindo 161 homens (72,5%) e 61 mulheres (27,5%). A idade variou de 21 a 85 anos, com uma média de 58 anos. De acordo com estágio clínico, 84 eram tumores T1 (37,8%) e 138 T2 (62,2%). A localização do tumor foi a língua em 168 casos (75,7%) e o assoalho bucal em 54 casos (24,3%). Cento e sessenta e três pacientes (73,4%) eram ou são fumantes e 148 (66,7%) fazem ou faziam a ingestão de bebidas alcoólicas e 140 (63%) apresentavam os dois hábitos nocivos associados (fumo + álcool).

Com relação ao tratamento do pescoço, os pacientes foram divididos em dois grupos, os que foram submetidos ao esvaziamento cervical eletivo (ECE) e os que tiveram somente o tumor primário ressecado e foi realizada a observação do pescoço (OBS). O esvaziamento cervical eletivo foi realizado em 161 pacientes (32 T1 e 129 T2) e a conduta de observação foi realizada em 61 casos (52 T1 e 9 T2) (Figura 12). Com relação ao tipo de esvaziamento cervical eletivo, houve variação ao longo dos anos (Figura 13), mostrando-se a tendência de substituir o esvaziamento cervical radical ou radical modificado por esvaziamento seletivo supra-omo-hióideo (SOH).



**Figura 12** - Fluxograma ilustrando os pacientes com carcinoma inicial de língua e assoalho bucal estratificados de acordo com o estágio clínico do tumor (T), tratamento do pescoço-observação (OBS) ou esvaziamento cervical eletivo (ECE), status patológico do linfonodo (pN), radioterapia adjuvante (RT) ou não e recidiva cervical ipsilateral (RI).



**Figura 13** - Tipo de esvaziamento cervical eletivo ao longo dos anos no A.C. Camargo Cancer Center (\*SOH-esvaziamento supra-homo-hióideo; Radical Mod-radical modificado)

As características dos pacientes nos diferentes grupos de conduta do pescoço estão listadas na Tabela 2.

**Tabela 2** - Características clínico-patológicas dos pacientes por grupo (n=222)

Características	Grupo OBS	Grupo ECE	Total	p
Nº de pacientes	61	161	222	
<b>Idade</b>				
Média (anos)	58.49	57.85	58	0,742
<b>Gênero</b>				
Homem	41	120	161	0,275
Mulher	20	41	61	
<b>Fumo</b>				
Sim	41	122	163	0,371
Não	17	35	52	
Ignorado	3	4	7	
<b>Álcool</b>				
Sim	36	112	148	0,32
Não	22	44	66	
Ignorado	3	5	8	
<b>Local do Tumor</b>				
Língua	53	115	168	0,017
Assoalho bucal	8	46	54	
<b>T clínico</b>				
cT1	52	32	84	<0,001
cT2	9	129	138	
<b>Espessura</b>				
<3mm	22	22	44	<0,001
>=3mm	17	107	124	
Ignorado	22	32	54	
<b>Grau Histológico</b>				
Grau 1	37	71	108	<0,001
Grau 2	14	66	80	
Grau 3	2	22	24	
Ignorado	8	2	10	
<b>Invasão Perineural</b>				
Sim	7	42	49	0,007
Não	31	87	118	
Ignorado	23	32	55	
<b>Tipo de ECE (n=161)</b>				
ECSOH (I-III)	-	100	100	-
ECRM	-	20	20	
ECR	-	25	25	
ECS (I-IV)	-	16	16	
pN-	-	128	128	-
pN+	-	33	33	

**OBS** - observação, ECE- Esvaziamento Cervical Eletivo, ECSOH- esvaziamento cervical supraomohiideo, ECRM- esvaziamento cervical radical modificado, ECR- esvaziamento cervical radical, ECS- esvaziamento cervical seletivo.



A taxa de metástases linfonodais ocultas (pN+) nos pacientes submetidos ao esvaziamento cervical eletivo foi de 20,5% (33/161). Dos 33 pacientes com pN+ 29 (87,8%) eram portadores de tumores T2 e 4 (12,2%) de tumores T1. As taxas de metástase linfonodal oculta foram de 12,5% (4/32) nos casos T1 e 22,5% (29/129) nos casos T2. A maioria dos casos de pN+ tiveram comprometimento no nível II (57,6%) ou nível I (24,3%), apenas 1 paciente teve comprometimento do nível III (3%) e 5 pacientes tiveram metástases nos níveis I e II ao mesmo tempo (15,2%).

Com relação a presença de recidivas, a recidiva local apenas foi a mais comum (32 pacientes) e a recaída regional apenas, o segundo local mais comum (13 pacientes). A presença de metástase à distância foi encontrada em 5 pacientes, e desses, todos foram a óbito pela doença.

A taxa de recorrência regional ipsilateral foi de 14,8% (9 de 61 pacientes) no grupo observacional, muito maior que no grupo submetido ao esvaziamento cervical eletivo, que foi de apenas 6,8% (11 de 161 pacientes) ( $p=0.061$ ). Dos 9 pacientes com recorrência regional do grupo observacional, 8 casos foram submetidos a cirurgia de resgate (esvaziamento cervical).

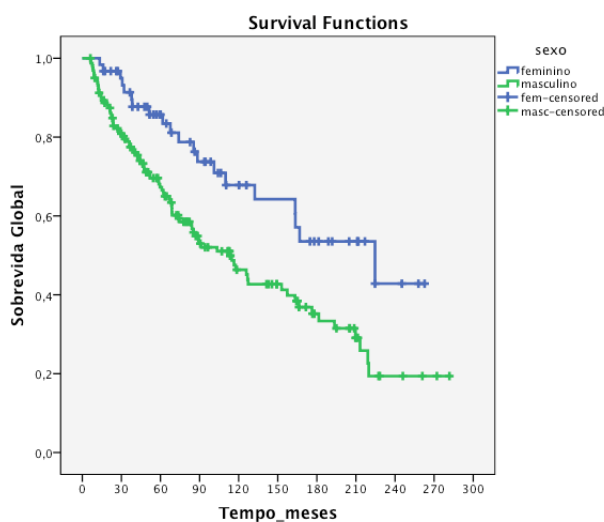
Setenta e cinco pacientes morreram de causas não relacionadas ao câncer, enquanto que trinta e um pacientes foram a óbito pela doença, 110 pacientes estavam vivos na última avaliação objetiva de seguimento e 6 pacientes foram perdidos de seguimento.

Com relação a sobrevida global e os dados clínicos houve diferenças estatisticamente significativas entre os fatores: sexo feminino e sexo

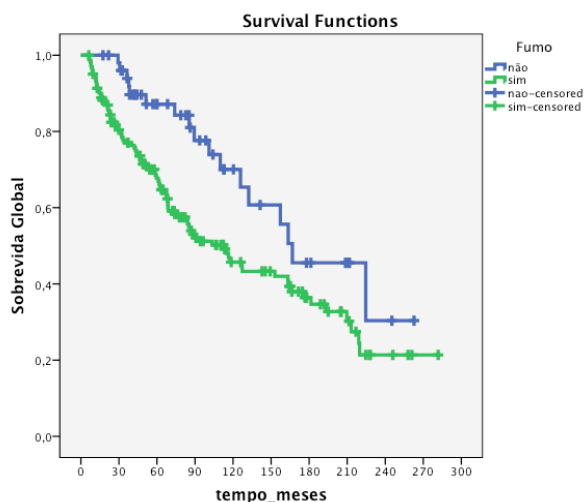
masculino ( $p=0.004$ ), entre os não fumantes e fumantes ( $p=0.013$ ) e entre os que consomem álcool dos que não consomem ( $p=0.016$ ) (Figuras 14 15 e 16). A sobrevida câncer específica em 5 anos dos pacientes com tumores T1 foi maior que a naqueles com tumores T2 (94,3% vs 84,4%, respectivamente), com diferença estatisticamente significativa ( $p=0.014$ ) (Figura 17).

A presença da metástase linfonodal oculta comprometeu a sobrevida câncer-específica e a global. A sobrevida câncer-específica em 5 anos nos pacientes sem metástase foi de 90%, já a dos pacientes com metástase oculta foi de 65% ( $p=0,001$ ) (Figuras 18 e 19).

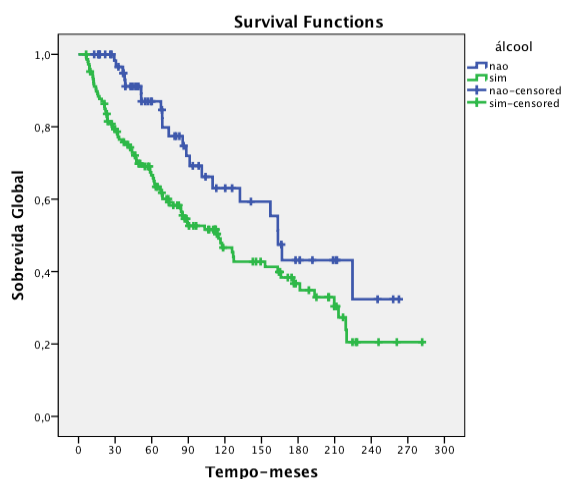
Não houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevidas global e câncer-específica entre os pacientes dos grupos de observação e esvaziamento cervical eletivo (Figuras 20 e 21).



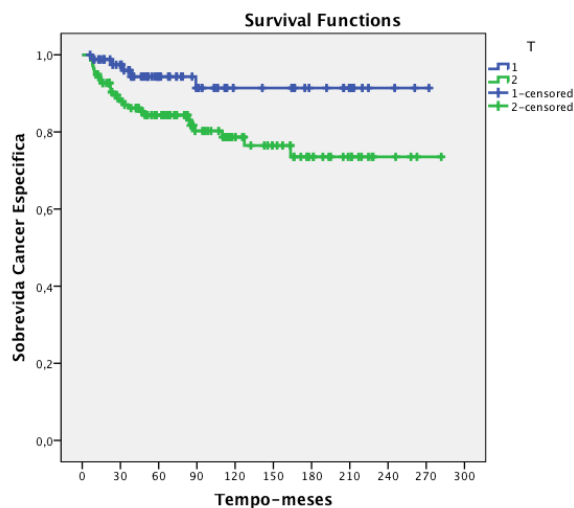
**Figura 14** - Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre sexo feminino e masculino em paciente com carcinoma epidermóide de língua e assoalho bucal ( $n=222$ ), ( $p=0,004$ ).



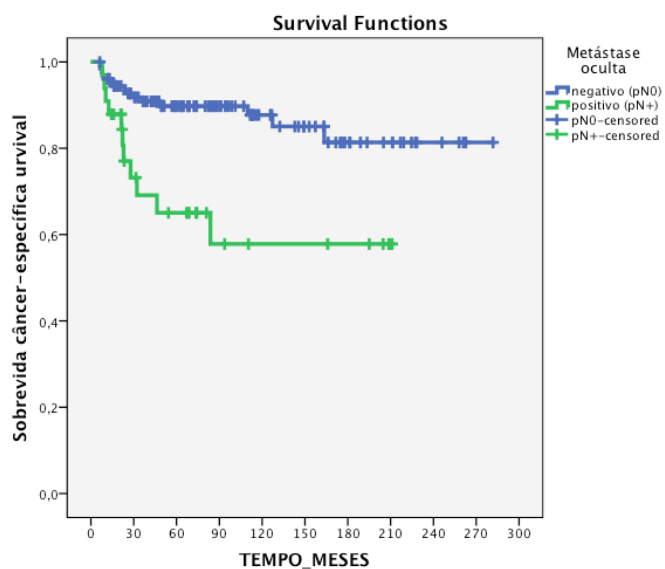
**Figura 15** - Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os pacientes fumantes e não fumantes com carcinoma epidermóide de língua e assoalho bucal (n=215) (p=0,013).



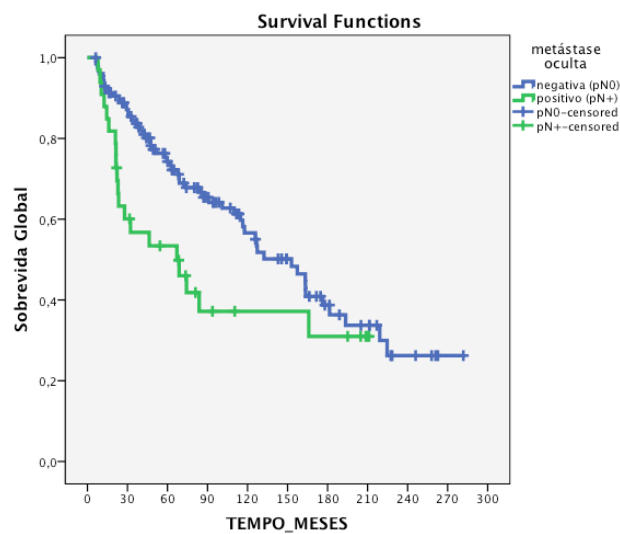
**Figura 16** - Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os pacientes com carcinoma epidermóide de língua e assoalho bucal que consomem álcool dos que não consomem (n=214) (p=0,016).



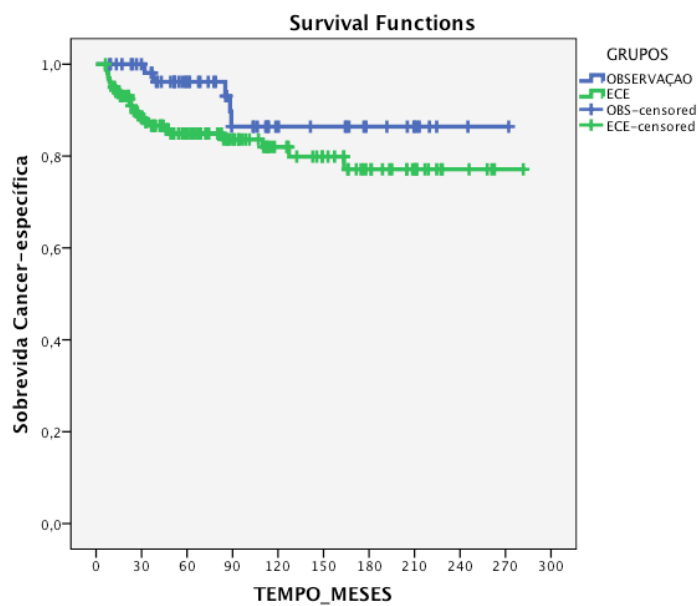
**Figura 17** - Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os tumores cT1 e cT2 (n=222) ( $p=0,014$ ).



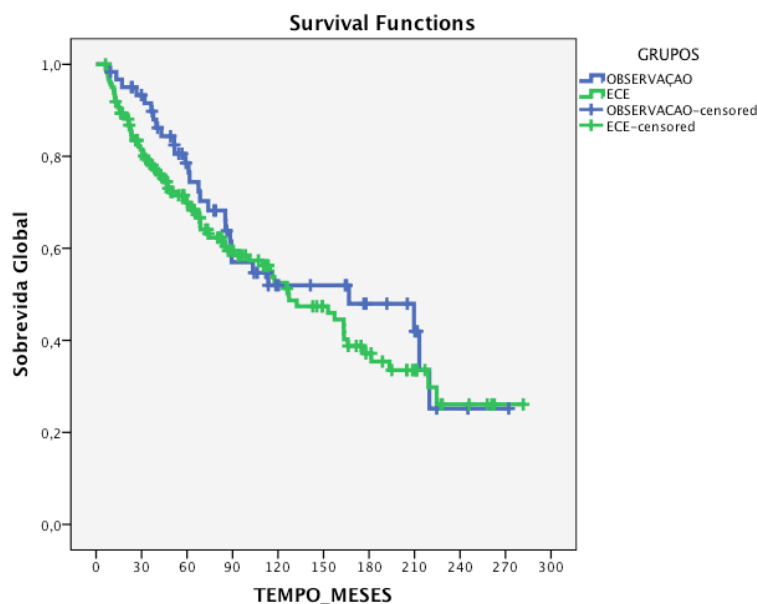
**Figura 18** - Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os pacientes com e sem metástase linfonodal oculta (n=161) ( $p=0,001$ ).



**Figura 19** - Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os pacientes com e sem metástase linfonodal oculta (n=161) ( $p=0,04$ ).



**Figura 20** - Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) dos grupos de observação e esvaziamento cervical eletivo (n=222) ( $p=0,09$ ).



**Figura 21** - Curva de sobrevida global (Kaplan-Meier) mostrando que não houve diferença estatística entre as curvas dos grupos de observação e esvaziamento cervical eletivo (n=222) (p=0,36).

## 5.2 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

Para análise dos dados clínico-patológicos 165 pacientes foram elegíveis para o estudo, sendo 115 homens (69,7%) e 50 mulheres (30,3%), com idades variando de 21 a 85 anos de idade (média, 58 anos). Com relação a localização do tumor primário 123 casos (74,5%) foram localizados na língua e 42 (25,5%) no assoalho bucal; 56 casos foram estadiados como T1 (34%) e 109 como T2 (66%). Dos 165 pacientes 129 foram submetidos ao esvaziamento cervical eletivo (Tabela 3).

A metástase linfonodal oculta (pN+) foi detectada em 29 pacientes dos 129 que foram submetidos ao esvaziamento cervical eletivo (22,4%).

**Tabela 3** - Características clínico-patológicas de cada grupo (n=165)

Característica	Grupo OBS	Grupo ECE	Total	p
Nº de pacientes	36	129	165	
<b>Idade, anos</b>				
Mediana	59.00	57.00		
Média	59.47	57.60		
<b>Gênero</b>				
Masculino	24	91	115	0.39
Feminino	12	38	50	
<b>Tabaco</b>				
Sim	26	93	119	0.57
Não	8	33	41	
Ignorado	2	3	5	
<b>Alcool</b>				
Sim	19	85	104	0.28
Não	15	41	56	
Ignorado	2	3	5	
<b>Local do tumor</b>				
Lingua	30	93	123	0.12
Assoalho de boca	6	36	42	
<b>cT</b>				
cT1	31	25	56	<0.001
cT2	5	104	109	
<b>pT</b>				
pT1	32	54	86	<0.001
pT2	4	69	73	
Ignorado	0	6	6	
<b>Espessura</b>				
<3mm	22	25	47	<0.001
>=3mm	12	101	113	
Ignorado	2	3	5	
<b>Espessura</b>				
<4 mm	28	39	67	
>=4 mm	6	87	93	<0.001
Ignorado	2	3	5	
<b>Grau Histológico</b>				
Grau 1	24	52	76	
Grau 2	10	57	67	0.017
Grau 3	2	20	22	
<b>Invasão Perineural</b>				
Sim	7	42	49	0.09
Não	29	87	116	
<b>Esvaziamento cervical (n=161)</b>				
ECSOH (I-III)	-	79	79	
ECRM	-	16	16	-
ECR	-	22	22	
ECS (I-IV)	-	12	12	
<b>Status Patológico do linfonodo (n=161)</b>				
pN-	-	129	129	-
pN+	-	29	29	

**Abreviações:** OBS-observação; ECE-esvaziamento cervical eletivo; ECSOH-esvaziamento cervical supraomohioideo; ECRM-esvaziamento cervical radical modificado; ECR-esvaziamento cervical radical; ECS-esvaziamento cervical seletivo.

Todos os dados clínicos e patológicos dos 129 casos submetidos ao esvaziamento cervical foram cruzados com o risco de metástase linfonodal oculta. A espessura do tumor maior ou igual a 4mm, o pT e o grau histológico foram associados com um alto risco de desenvolvimento de metástase oculta (Tabela 4). Com relação a espessura do tumor, dos 126 casos avaliados, 38 (30,2%) tinham espessura menor ou igual a 4mm e 88 (69,8%) tinham espessura maior que 4mm. Com relação o pT, dos 123 casos avaliados, 54 casos (43,9%) eram pT1 e 69 (56,1%) eram pT2. Com relação ao grau histológico, 52 eram bem diferenciados, 57 eram moderadamente diferenciados e 20 casos eram pouco diferenciados.



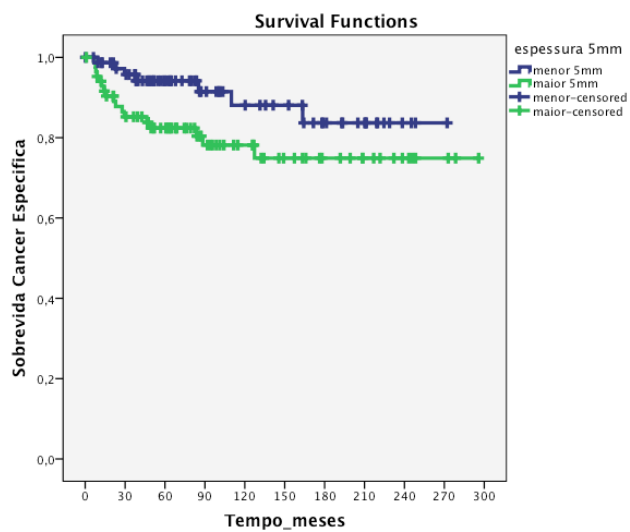
**Tabela 4** - Relação dos dados clínicos-patológicos e a presença ou não de metástase linfonodal oculta (n=129)

Dados Patológicos	Metástase Linfonodal Oculta (pN+)			total	P
	não	sim			
Sexo	feminino	32 (84,2%)	6 (15,8%)	38	p=0,23
	masculino	68 (74,7%)	23 (25,3%)	91	
	total	100	29	129	
Idade	<40 anos	8 (61,5%)	5 (38,5%)	13	p=0,16
	>40 anos	92 (79,3%)	24 (20,7%)	116	
	total	100	29	129	
Local	língua	71 (76,3%)	22 (23,7%)	93	p=0,6
	soalho boca	29 (80,6%)	7 (19,4%)	36	
	total	100	29	129	
Tabaco	não	27 (81,8%)	6 (18,2%)	33	p=0,44
	sim	70 (75,3%)	23 (24,7%)	93	
	total	97	29	126	
cT	cT1	22 (88%)	3 (12%)	25	p=0,16
	cT2	78 (75%)	26 (25%)	104	
	total	100	29	129	
Espessura 3mm	igual ou menor	21 (91,3%)	2 (8,7%)	23	p= 0,08
	maior	78 (75%)	26 (25%)	104	
	total	99	28	127	
Espessura 4mm	igual ou menor	35 (92%)	3 (8%)	38	p= 0,01
	maior	63 (71,6%)	25 (28,4%)	88	
	total	98	28	126	
Espessura 5mm	igual ou menor	43 (91,5%)	4 (8,5%)	47	p= 0,004
	maior	55 (69,6%)	24 (30,4%)	79	
	total	98	28	126	
Grau Histológico	I	42 (80,8%)	10 (19,2%)	52	p=0,03
	II	47 (82,5%)	10 (17,5%)	57	
	III	11 (55%)	9 (45%)	20	
	total	100	29	129	
T patológico	pT1	48 (89%)	6 (11%)	54	p=0,008
	pT2	48 (69,6%)	21 (30,4%)	69	
	total	96	27	123	
Tipo de invasão	pushing	5 (71,4%)	2 (28,6%)	7	p=0,21
	infiltrativo	55 (83,3%)	11(16,7%)	66	
	dissociativo	40 (71,4%)	16 (28,6%)	56	
	total	100	29	129	
Embolização linfática	não	92 (79,3%)	24 (20,7%)	116	p=0,16
	sim	8 (61,5%)	5 (38,5%)	13	
	total	100	29	129	

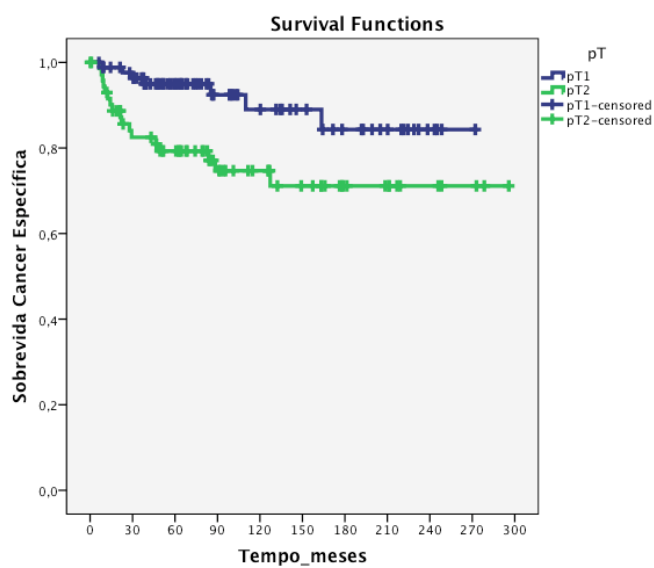
Cont/ Tabela 4

Dados Patológicos	Metástase Linfonodal Oculta (pN+)			P		
	não	sim	total			
Invasão perineural	não	66 (75,9%)	21 (24,1%)	87	p=0,65	
	sim	34 (81%)	8 (19%)			42
		100	29	129		
Invasão glandular	não	87 (77,7%)	25 (22,3%)	112		p=0,75
	sim	12 (75%)	4 (25%)	16		
	total	99	29	128		
Invasão muscular	não	27 (84,4%)	5 (15,6%)	32	p=0,33	
	sim	72 (75%)	24 (25%)	96		
		99	29	128		
Reação desmoplásica	ausente	13 (76,5%)	4 (23,5%)	17		p=0,93
	leve	33 (80,5%)	8 (19,5%)	41		
	moderado	27 (77,1%)	8 (22,9%)	35		
	severo	27 (75%)	9 (25%)	36		
		100	29	129		
Infiltrado inflamatório	ausente	1 (100%)	0	1	p=0,83	
	leve	18 (75%)	6 (25%)	24		
	moderado	43 (75,4%)	14 (24,6%)	57		
	severo	38 (80,9%)	9 (19,1%)	47		
		100	29	129		

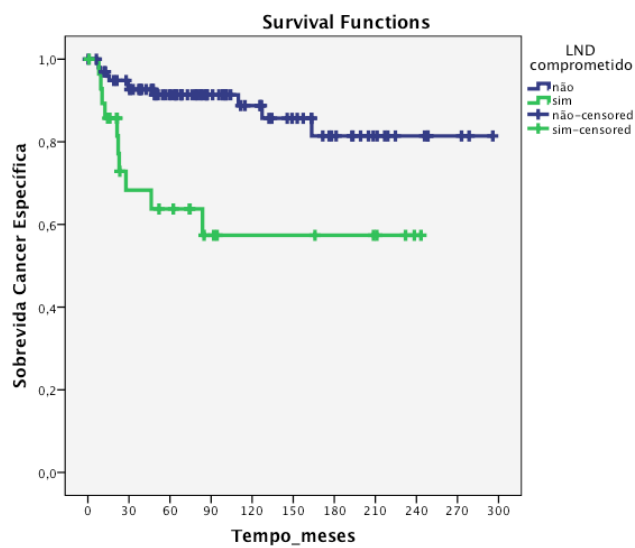
Com relação as análises de sobrevida e de fatores patológicos, houve diferença estatística na sobrevida câncer específica entre os grupos: com espessura tumoral menor e maior que 5mm (p=0.05), pT1 e pT2 (p=0.009) e com e sem linfonodos comprometidos (p=0.001) (Figuras 22, 23 e 24).



**Figura 22-** Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os pacientes com tumores de espessura menor ou maior que 5mm.



**Figura 23 -** Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os pacientes com tumores pT1 e pT2.

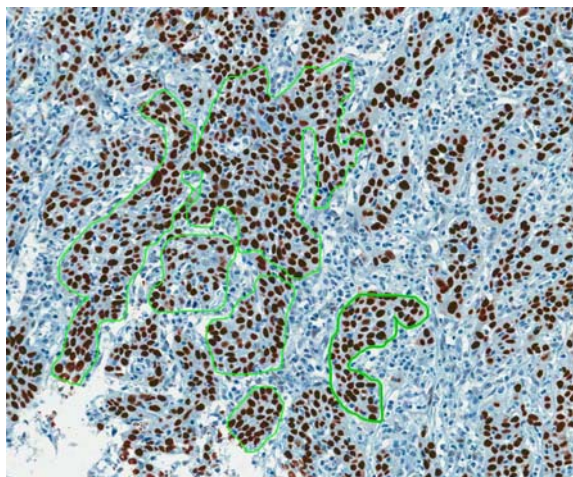


**Figura 24** - Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os pacientes com e sem metástase linfonodal oculta.

## 5.3 DADOS IMUNOISTOQUÍMICOS

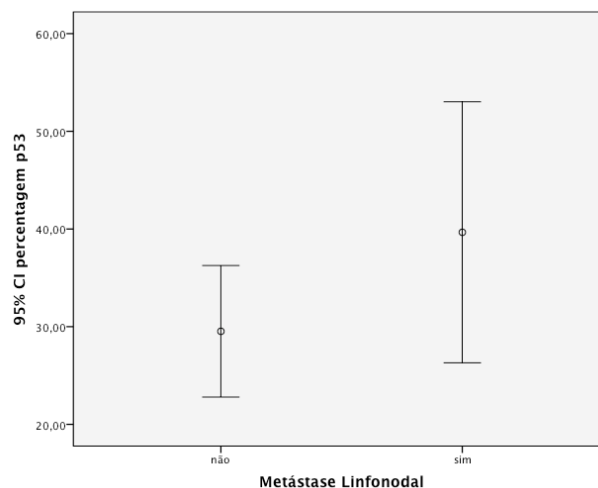
### 5.3.1 p53

A expressão imunoistoquímica de p53 pôde ser avaliada em 133 casos. O índice de marcação variou entre 0% e 91,92%, com uma média de 31,84% e uma mediana de 26,63%. Um score 3 para p53 (>50%) foi encontrada em 46 de 133 (34,5%) tumores.



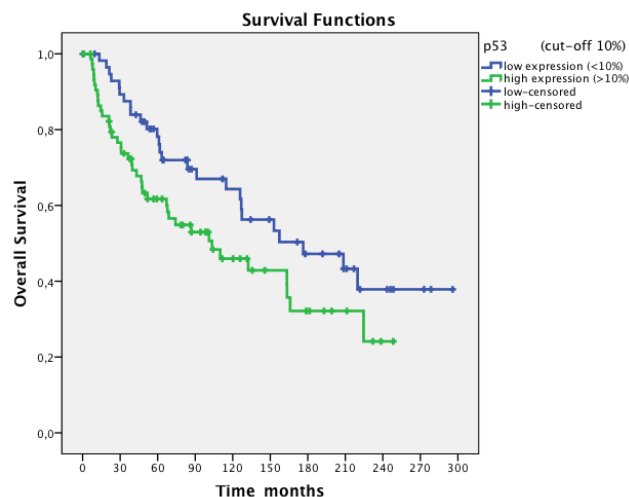
**Figura 25** - Expressão nuclear da proteína p53 em amostra de carcinoma epidermóide oral

Em relação a expressão de p53 e os parâmetros clínico-patológicos, nenhuma correlação significativa foi detectada entre p53 e sexo, T-clínico, pT, grau histológico de diferenciação, espessura, tipo de invasão, invasão perineural, embolização vascular, metástase linfonodal oculta ( $p=0.36$ ) e recidiva.



**Figura 26** - Gráfico de barras de erros mostrando que não houve diferença na expressão de p53 entre os grupos com e sem metástase linfonodal oculta.

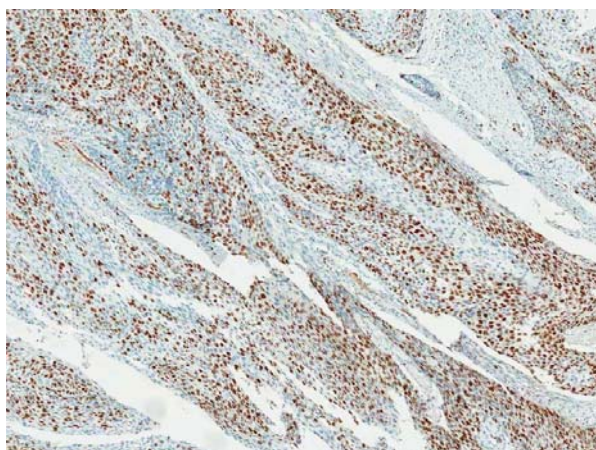
Em relação à sobrevida global de todos os 133 casos, houve diferença estatisticamente significativa entre os casos p53-positivos (>10%) e p53-negativo (<10%) ( $p=0.05$ ), sendo a sobrevida global em 5 anos dos casos p53-negativos 78,1% e dos casos p53-positivos 61,7% e em 10 anos, 64,3% e 45,9% respectivamente (Figura 27). Porém, em relação à sobrevida câncer específica, não houve diferença entre os casos p53-positivos (>10%) e p53-negativo (<10%) ( $p=0.14$ ), sendo em 5 anos 92,3% nos casos p53-negativos e 82,3% nos casos p53-positivos e em 10 anos, 89,2% e 78,2% respectivamente.



**Figura 27** - Curvas de Sobrevida global da expressão da proteína p53 em pacientes com carcinoma epidermóide inicial de língua e assoalho bucal

### 5.3.2 Ki-67

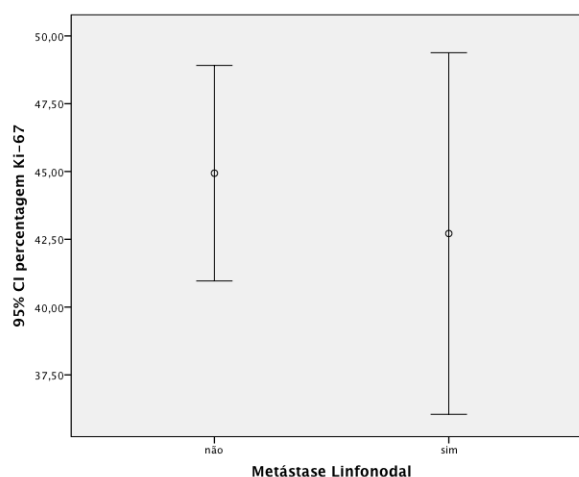
A expressão imunohistoquímica de Ki-67 pôde ser avaliada em 135 casos e foi observada em 100% dos tumores. Um score 3 para Ki-67 (>50%) foi encontrado em 53 de 135 (39.2%) tumores. Apenas 1 caso teve o score 1 (expressão entre 1-10%). A percentagem de expressão variou entre 8-91% com uma média de 44,8% e uma mediana de 43% (desvio padrão 17.3).



**Figura 28** - Expressão nuclear da proteína Ki-67 em amostra de carcinoma epidermóide inicial de língua e assoalho bucal

Não houve relação entre a presença de metástase linfonodal oculta e a alta e baixa expressão de Ki-67 pela média ( $p=0.63$ ). Com relação a sobrevidas global e câncer-específica, não houve diferença entre os grupos com alta e baixa expressão ( $p=0.65$  e  $p=0.57$ ). Sendo a sobrevida global em 5 anos 69% nos tumores de baixa expressão e 69% nos de alta expressão e em 10 anos, 59,7% e 51,7%, respectivamente. A sobrevida câncer-específica foi de 86.3% nos tumores com baixa expressão de Ki-67 e 89,7% nos de alta expressão.

Utilizando o cut-off de 30%, 31 casos (23%) tiveram baixa expressão de Ki-67 (menos de 30% do núcleo das células tumorais) e 104 casos (77%) tiveram alta expressão de Ki-67. Não houve diferença entre a alta e a baixa expressão de Ki-67 com a presença ou não de metástase linfonodal oculta ( $p=0.82$ ), nem com as sobrevidas global ( $p=0.14$ ) e câncer-específica ( $p=0.07$ ).

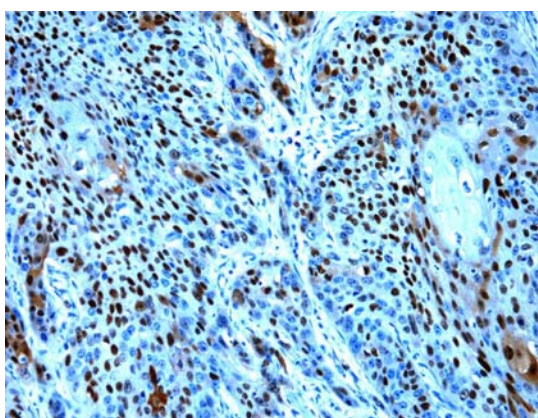


**Figura 29** - Gráfico de barra de erros mostrando que não houve diferença entre as percentagens de Ki-67 no grupo com e sem metástase linfonodal.



### 5.3.3 Ciclina D1

A expressão de ciclina D1 foi avaliada em 137 casos. A porcentagem de expressão de ciclina D1 variou de 0,37 a 87,9% com uma média de 29,35% e uma mediana de 28%. Apenas 2 casos (1.5%) não expressaram ciclina D1. Utilizando o *cut-off* de 40% para baixa e alta expressão de ciclina D1 106 casos tiveram baixa expressão de ciclina D1 e 31 casos tiveram alta expressão (acima de 40%).



**Figura 30** - Expressão de ciclina D1 no núcleo das células em amostra de carcinoma epidermóide inicial de língua e assoalho bucal

Com relação a sobrevida global, não houve diferença entre os grupos com alta e baixa expressão de ciclina D1 ( $p=0.87$ ). Sendo a sobrevida global em 5 anos de 70,1% nos tumores de baixa expressão e 70,1% nos de alta expressão. Com relação a sobrevida câncer-específica, não houve diferença entre os grupos com alta e baixa expressão de ciclina D1 ( $p=0.86$ ). A sobrevida câncer-específica em 5 anos foi de 86,9% nos tumores com baixa expressão de ciclina D1 e 88,1% nos de alta expressão. Também não houve diferença entre a alta e baixa expressão de ciclina D1 com a presença de metástase linfonodal oculta ( $p=0.92$ ).

#### 5.3.4 **EGFR**

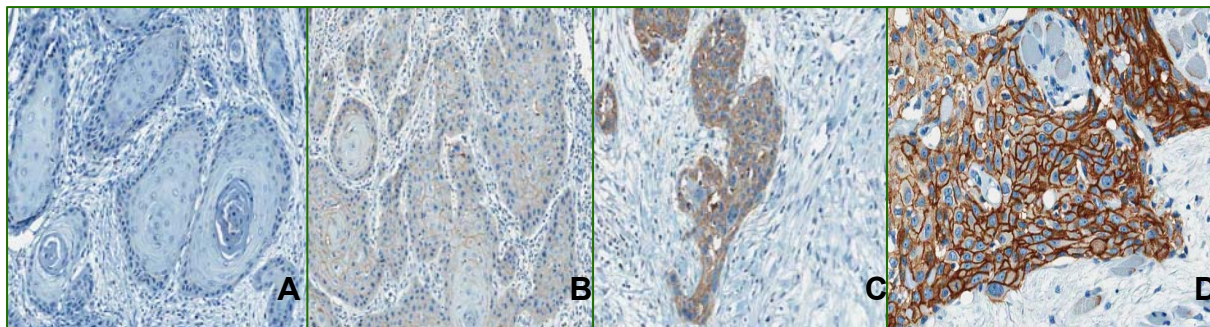
A expressão de EGFR (clone 3C6) foi avaliada em 142 casos. Desses 124 foram considerados negativos e 18 casos considerados positivos (scores 2 e 3). Só foi considerada a expressão da proteína na membrana das células tumorais. A superexpressão do EGFR foi encontrada em 18 casos (12,7%) e foi significativamente associada com pT ( $p = 0.009$ ), espessura superior a 4 mm ( $p=0.017$ ), invasão muscular ( $p=0.04$ ), reação desmoplásica ( $p=0.04$ ), infiltrado inflamatório ( $p = 0.03$ ), embolização linfática ( $p=0.02$ ), modo de invasão ( $p=0.03$ ) e invasão perineural ( $p=0.006$ ). A superexpressão de EGFR também foi associada com metástase linfonodal ( $p=0.03$ ) e recidiva regional ( $p=0.02$ ) (Tabela 5). A sobrevida câncer-específica em 5 anos diminuiu de 89,4% no grupo sem expressão EGFR para 75,3% no grupo com superexpressão de EGFR ( $p=0.023$ ) (Figura 33).

A expressão de EGFR (clone EGFR.25) foi avaliada em 140 casos, sendo 97 casos (69,3%) considerados negativos (score 0 e 1) e 43 (30,7%) positivos. A superexpressão (score 2 e 3) foi associada a pT ( $p=0.002$ ), espessura maior que 4mm ( $p=0.01$ ), modo de invasão ( $p=0.007$ ), invasão muscular ( $p=0.006$ ), metástase linfonodal oculta ( $p=0.02$ ) e presença de metástase linfonodal ( $p=0.005$ ) (Tabela 5). A superexpressão teve impacto significativo na sobrevida câncer-específica dos pacientes, sendo em 5 anos 92,1% no grupo negativo e 79,2% no grupo que superexpressou o EGFR (clone EGFR.25) ( $p=0.026$ ) (Figura 34).

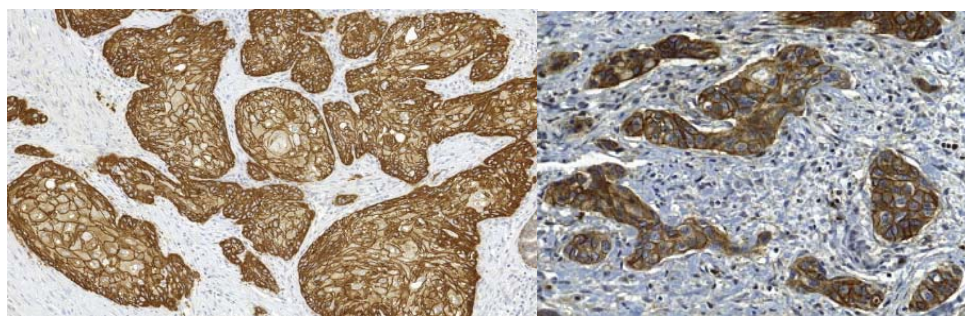
Todos os 18 casos positivos para o EGFR (clone 3C6) foram também positivos no clone EGFR.25.

**Tabela 5** - Expressão de EGFR (clones 3C6 e EGFR.25) e características patológicas, metástase linfonodal e recorrência regional.

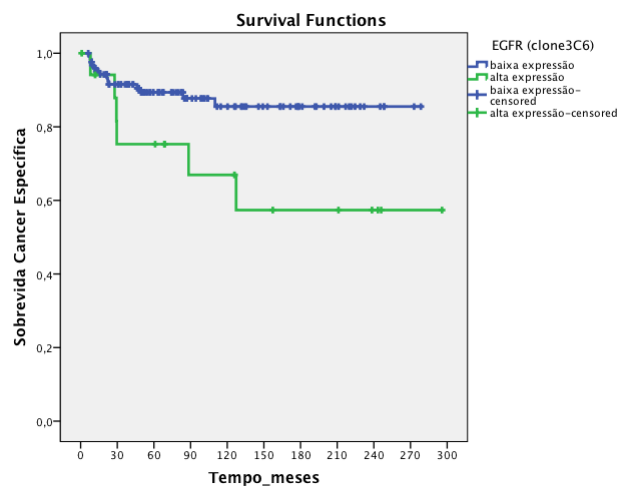
Características histológicas	categoria	EGFR - (3C6)	EGFR + (3C6)	total	p	EGFR - (EGFR.25)	EGFR + (EGFR.25)	Total	p
Grau Histológico	grau 1	54	6	60	0.31	41	18	59	0.72
	grau 2	49	7	56		40	15	55	
	grau 3	17	5	22		14	8	22	
Espessura tumoral	≤ 4mm	49	2	51	0.01	42	9	51	0.019
	> 4mm	67	16	83		51	31	82	
pT	pT1	67	4	71	0.009	58	12	70	0.002
	pT2	50	13	63		36	26	62	
Modo de invasão	pushing	6	0	6	0.03	5	1	6	0.007
	infiltration	67	5	72		57	14	71	
	dissociativo	47	13	60		33	26	59	
Invasão perineural	não	86	7	93	0.006	68	24	92	0.16
	sim	34	11	45		27	17	44	
Invasão muscular	não	33	1	34	0.04	30	4	34	0.006
	sim	86	17	103		64	37	101	
Infiltrado Inflamatório	não	0	1	1	0.03	0	1	1	0.09
	leve	24	7	31		18	12	30	
	moderado	52	4	56		37	18	55	
	intenso	44	6	50		40	10	50	
Reação desmoplásica	não	23	0	23	0.04	19	4	23	0.29
	leve	37	6	43		28	15	43	
	moderado	32	3	35		25	8	33	
	intenso	28	9	37		23	14	37	
Embolização linfática	não	111	13	124	0.02	86	36	122	0.63
	sim	9	5	14		9	5	14	
Metástase linfonodal oculta	não	75	10	85	0.23	62	23	85	0.02
	sim	23	6	29		14	14	28	
Metástase Linfonodal	não	97	10	107	0.03	80	26	106	0.005
	sim	27	8	35		17	17	34	
Recorrência Regional	não	110	12	122	0.02	87	34	121	0.09
	sim	14	6	20		10	9	19	



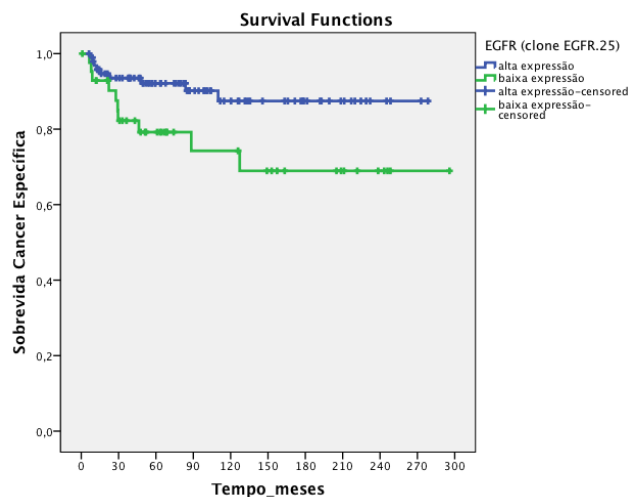
**Figura 31** - Expressão de EGFR (clone 3C6) na membrana de carcinoma inicial de língua e assoalho bucal. A: score 0; B: score 1; C: score 2; D: score 3.



**Figura 32** - Fotomicrografias de dois casos considerados 3+ para EGFR, com a expressão completa em toda a membrana das células tumorais.

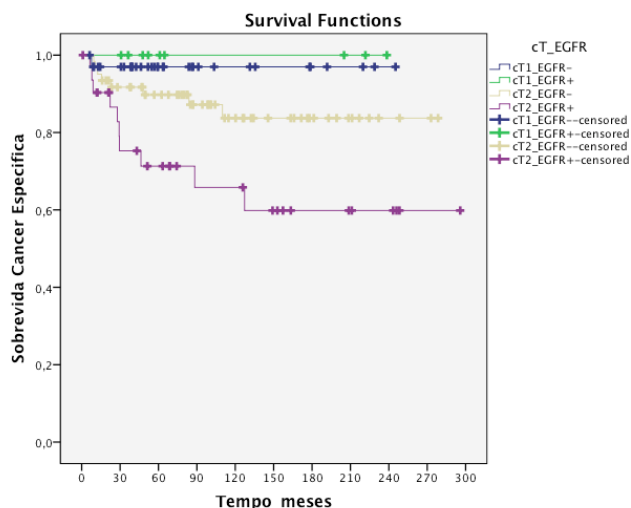


**Figura 33** - Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os tumores com alta e baixa expressão de EGFR (clone 3C6).



**Figura 34** - Curva de sobrevida câncer-específica (Kaplan-Meier) mostrando a diferença entre os tumores com alta e baixa expressão de EGFR (Clone EGFR.25).

Quando agrupamos a expressão de EGFR (clone EGFR.25) com o estadiamento clínico tumoral (cT), observamos diferenças nas curvas de sobrevida câncer-específica (Figura 33). O grupo dos tumores cT1 com EGFR negativo ou positivo tiveram uma sobrevida câncer-específica em 5 anos de 97% e 100% respectivamente, enquanto que o grupo dos tumores cT2 com alta expressão de EGFR apresentou em 5 anos uma sobrevida de 71%, esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0.006$ ).



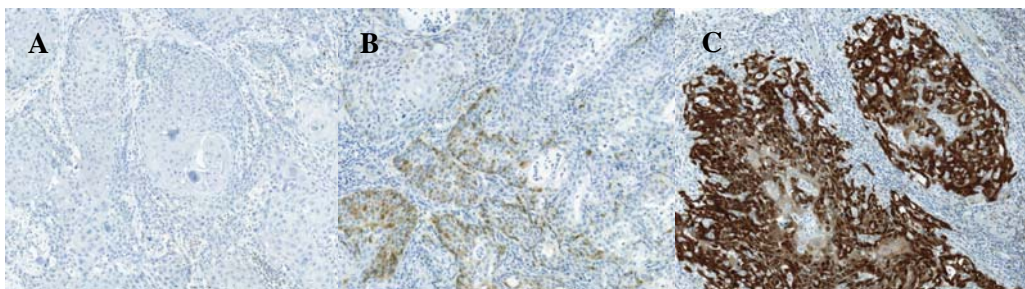
**Figura 35** - Curvas de sobrevida câncer específica mostrando os grupos cT-EGFR em pacientes com carcinoma epidermóide de língua e assoalho bucal

### 5.3.5 p16

A expressão de p16 foi avaliada em 138 casos; 27 (19,5%) foram positivos para p16, sendo 20 (74%) do tipo difuso e 7 (26%) do tipo focal.

Não houve relação entre o sexo, a presença de metástase linfonodal oculta, cT, pT, espessura tumoral, grau histológico e tipo de invasão com a expressão de p16. Com relação as sobrevidas global e câncer-específica, não houve diferença entre os grupos com expressão de p16 ( $p=0.53$  e  $p=0.79$ ). Sendo a sobrevida global em 5 anos de 71,8% nos tumores sem expressão de p16 e 57,7% nos com expressão de p16 e em 10 anos, 57,6% e 42,3%, respectivamente. E a sobrevida câncer-específica em 5 anos, 87% nos tumores sem expressão de p16 e 88,1% nos casos positivos para p16.

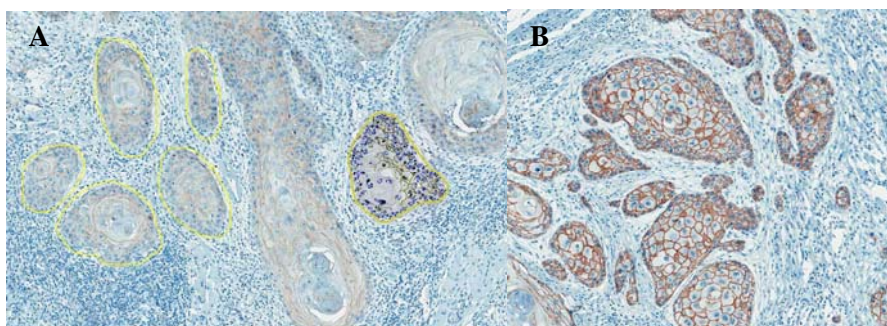




**Figura 36** - Expressão de p16 em carcinoma epidermóide oral. A: não houve expressão de p16 (negativo), B: expressão de p16 no citoplasma de mais de 5% das células tumorais (positivo focal), C: expressão forte de p16 no núcleo e citoplasma da absoluta maioria das células tumorais (positivo tipo difuso).

### 5.3.6 E-Caderina

Dos 140 casos analisados para E-caderina, apenas 4 (2,9%) tiveram “perda total” de E-caderina em algum “ninho” tumoral (score 0). 30 casos (21,4%) foram classificados como score 1, 86 casos (61,4%) foram classificados como score 2 e 20 casos (14,3%) não tiveram perda da expressão (score 3). Não houve diferença entre os grupos com perda (scores 0 e 1) e sem perda (scores 2 e 3) com relação a presença de metástase linfonodal oculta ( $p=0.45$ ), recaída ( $p=0.90$ ) e sobrevidas global ( $p=0.60$ ) e câncer específica ( $p=0.66$ ).



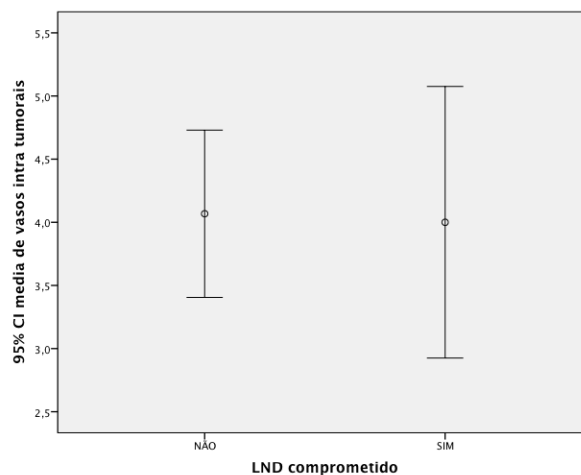
**Figura 37** - Expressão de E-caderina em carcinoma epidermóide oral. A: perda quase total de E-caderina em blocos tumorais no fronte de invasão. B: Expressão de E-caderina na membrana dos blocos tumorais no fronte de invasão.

Se agruparmos os pacientes com score 0 1 e 2 como “perda” de E-caderina (<75%) e analisarmos em comparação com os 20 casos com score 3, sem perda de E-caderina, não houve associação com a presença de metástase linfonodal oculta ( $p=0.75$ ) nem com as sobrevidas global ( $p=0.79$ ) e câncer específica ( $p=0.96$ ).

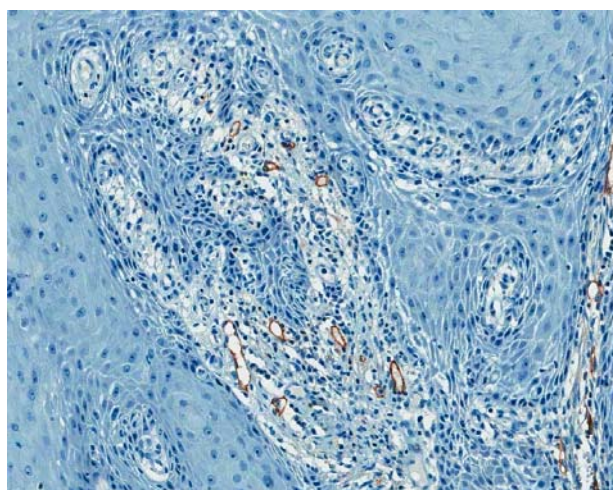
### **5.3.7 Podoplanina (D2-40)**

Foram analisados os vasos intratumorais em 119 casos. A densidade de vasos linfáticos (média de vasos intratumorais em 5 campos) foi 4.08 e a mediana 3.80, sendo o mínimo 0 e o máximo 15.8. Não houve diferença nas densidades de vasos linfáticos entre os grupos sem metástase linfonodal oculta (média 4.10 DP 2.85) e com metástase linfonodal oculta (média 4.03 DP 2.48). A média do total de vasos intratumorais (soma dos 5 campos avaliados) foi de 20.41, sendo o mínimo 0 e o máximo 79. Não houve diferença entre a média dos totais de vasos intratumorais entre o grupo de pacientes sem metástase linfonodal oculta (20.5 DP 14.32) e o grupo de pacientes com metástase linfonodal oculta (20.17 DP 12.44).





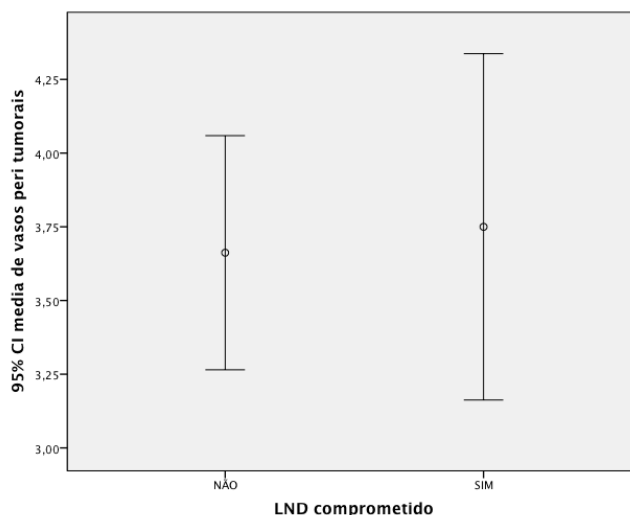
**Figura 38** - Gráfico de barra de erros mostrando a densidade de vasos e o desvio padrão dos vasos intratumorais dos grupos com e sem metástase linfonodal oculta



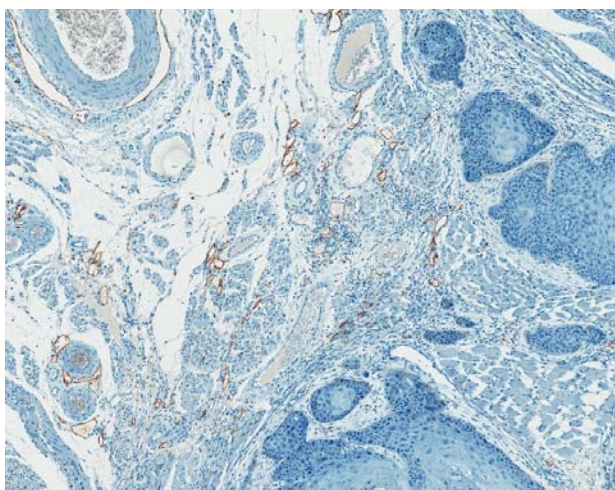
**Figura 39** - Marcação dos vasos linfáticos na região intratumoral com anticorpo D2-40 em amostra de carcinoma epidermóide

Foram avaliados os vasos peritumorais em 120 casos. A densidade dos vasos peritumorais foi de 3.66 e a mediana, 3.70 sendo o mínimo 0 e o máximo 7.40. Não houve diferença das densidades entre os grupos sem metástase linfonodal oculta (3.65 DP 1.65) e o com metástase linfonodal oculta (3.73 DP 1.41). A média do total de vasos peritumorais (soma dos 5

campos avaliados) foi de 18.33, a mediana 18.50, sendo o mínimo 0 e o máximo 37. Não houve diferença entre a média do total de vasos entre os grupos com metástase linfonodal (18.26 DP 8.26) e com metástase linfonodal (18.67 DP 7.05).



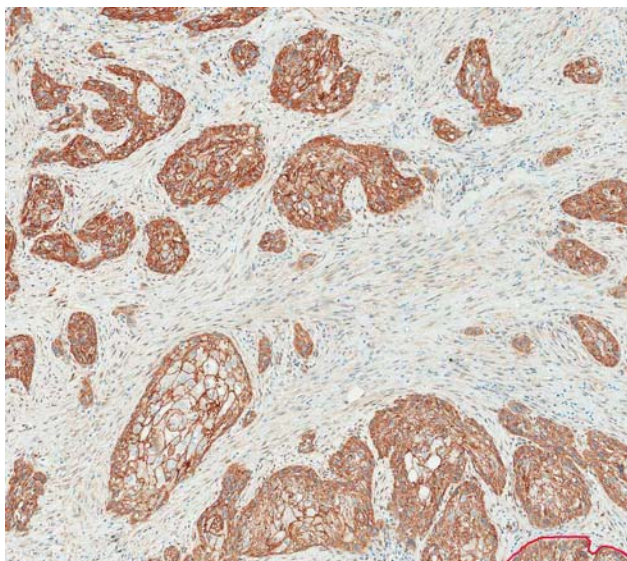
**Figura 40** - Gráfico de barra de erros mostrando a densidade de vasos linfáticos e o desvio padrão dos vasos peritumorais dos grupos com e sem metástase linfonodal



**Figura 41** - Marcação do vaso linfático peritumoral pelo anticorpo D2-40 em amostra de carcinoma epidermóide

### 5.3.8 $\beta$ -catenina

Das 136 lâminas avaliadas para  $\beta$ -catenina, 34 casos (25%) expressaram menos de 50% de  $\beta$ -catenina na membrana e 102 casos (75%) expressaram mais de 50% na membrana das células tumorais.



**Figura 42** - Expressão de  $\beta$ -catenina na membrana das células tumorais em amostra de carcinoma epidermóide

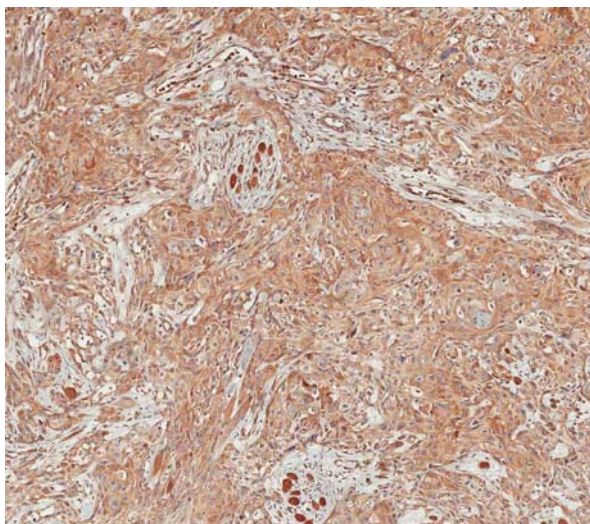
Não houve diferença na expressão de  $\beta$ -catenina na membrana entre o grupo com e sem metástase linfonodal oculta ( $p=0.80$ ) nem nas sobrevidas câncer-específica e global ( $p=0.45$  e  $p=0.18$ ).

Com relação a expressão de  $\beta$ -catenina no núcleo, das 136 lâminas avaliadas, a percentagem de núcleos marcados variou de 0,02 a 33,42% com uma média de 6,71%. 107 casos (78,7%) tiveram score 0 (<10% de marcação) e 29 casos (21,3%) tiveram marcação em mais de 10% no núcleo das células tumorais. Não houve diferença da expressão da  $\beta$ -catenina no núcleo em relação aos grupos com e sem metástase linfonodal

oculta ( $p=0.59$ ) e nem em relação as sobrevidas câncer-específica e global ( $p=0.89$  e  $p=0.94$ ).

### **5.3.9 MMP-9**

A expressão de MMP-9 foi avaliada em 141 casos, sendo 74 (52,5%) casos considerados negativos e 67 (47,5%) considerados positivos. Não houve associação entre a expressão de MMP-9 e a presença de metástase linfonodal oculta ( $p=0.59$ ), nem com a presença de recorrência ( $p=0.85$ ) e nem com as sobrevidas global ( $p=0.10$ ) e câncer-específica ( $p=0.57$ ).



**Figura 43** - Fotomicrografia ilustrando um caso positivo para MMP-9 em amostra de carcinoma epidermóide

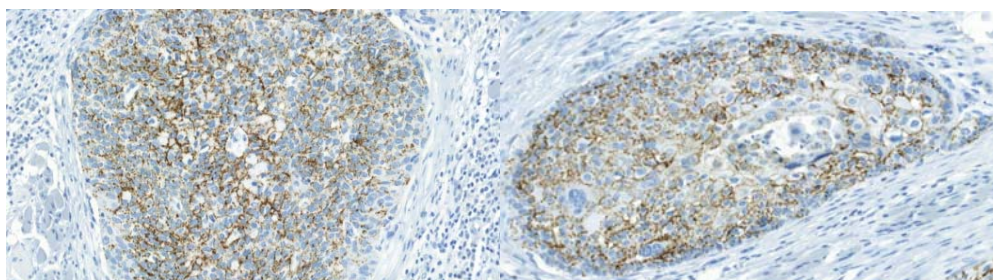
### **5.3.10 Claudina 7**

O padrão de marcação da claudina-7, quando positiva, apresentou-se como uma marcação descontínua da membrana da maioria das células ou de forma continuada em algumas células. Em alguns casos, haviam blocos tumorais positivos e outros negativos (Figura 44).



Utilizando o cut-off de 10% 108 casos (80,6%) foram considerados score 0 (<10% de marcação em membrana) e 26 casos (19,4%) foram considerados score 1 (>10%). Quando subdividimos em scores 0 1 e 2 (acima de 50% de marcação em membrana). Obtivemos 108 casos score 0 14 casos (10,4%) score 1 (entre 10-50%) e 12 casos (9%) score 2.

As sobrevidas global e a câncer-específica foram semelhantes entre os grupos com e sem perda de claudina-7 ( $p=0.35$  e  $p=0.93$ ). Não houve associação entre a presença de metástase linfonodal oculta e a expressão de claudina-7 ( $p=0.28$ ). Com relação a expressão de claudina-7 e os parâmetros clínico-patológicos, houve associação entre cT, a espessura tumoral, o grau histológico, pT e embolização linfática.



**Figura 44** - Bloco tumorais positivos para a expressão de claudina-7. Observa-se marcação continuada e descontinuada da membrana no mesmo bloco tumoral.

**Tabela 6** - Associação entre os aspectos clínico-patológicos com a expressão de claudina-7.

Aspectos clínico-patológicos	Claudina 7 -	Claudina 7 +	Total	p
<b>cT</b>				
cT1 (<2cm)	39	2	41	
cT2 (2-4cm)	69	24	93	
Total	108	26	134	0.004
<b>Grau histológico</b>				
Grau 1	53	5	58	
Grau 2	39	13	52	
Grau 3	14	7	21	
Total	106	25	131	0.014
<b>Espessura tumoral</b>				
<4mm	44	3	47	
>4mm	60	21	81	
Total	104	24	128	0.009
<b>pT</b>				
pT1	59	8	67	
pT2	44	16	60	
Total	103	24	127	0.042
<b>Modo de invasão</b>				
Pushing	6	0	6	
Infiltrating	55	12	67	
Dissociation	45	13	58	
Total	106	25	131	0.51
<b>Embolização linfática</b>				
Não	98	19	117	
Sim	8	6	14	
Total	106	25	131	0.027

### 5.3.11 Todos os marcadores analisados

A seguir segue tabela com a relação entre todas as proteínas analisadas no estudo e a presença de metástase linfonodal oculta.

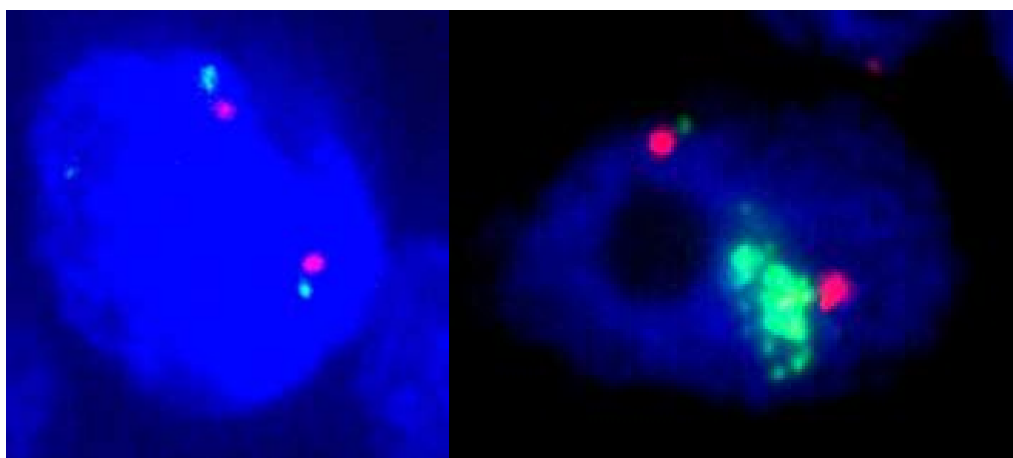
**Tabela 7** - Associação entre as proteínas analisadas e a presença de metástase linfonodal oculta.

Proteínas		Metástase Linfonodal Oculta (pN+)		total	p
		não	sim		
<b>p53</b>	negativo (<10%)	37 (80,4%)	9 (19,6%)	46	0.36
	positivo (>10%)	44 (71%)	18 (29%)	62	
<b>Ki-67</b>	baixa expressão (<44.8%)	45 (72,6%)	17 (27,4%)	62	0.63
	alta expressão (>44.8%)	36 (76,6%)	11 (23,4%)	47	
<b>Ki-67</b>	baixa expressão (<30%)	19 (76%)	6 (24%)	25	0.82
	alta expressão (>30%)	62 (73,8%)	22 (26,2%)	84	
<b>ciclina D1</b>	baixa expressão (<40%)	63 (75%)	21 (25%)	84	0.92
	alta expressão (>40%)	20 (74.1%)	7 (25,9%)	27	
<b>EGFR (3C6)</b>	baixa expressão	75 (77,3%)	23 (22,7%)	98	0.23
	alta expressão	10 (62,5%)	6 (37,5%)	16	
<b>EGFR (EGFR.25)</b>	baixa expressão	62 (81,6%)	14 (18,4%)	76	0.025
	alta expressão	23 (62,2%)	14 (37,8%)	37	
<b>p16</b>	negativo (<5%)	64 (71,9%)	25 (28,1%)	89	0.34
	positivo (>5%)	18 (81,8%)	4 (18,2%)	22	
<b>E-caderina</b>	perda	23 (82,1%)	5 (17,9%)	28	0.45
	não perda	61 (72,6%)	23 (27,4%)	84	
<b>β-catenina (membrana)</b>	baixa expressão (<50%)	22 (78,6%)	6 (21,4%)	28	0.63
	alta expressão (>50%)	63 (74,1%)	22 (25,9%)	85	
<b>β-catenina (núcleo)</b>	baixa expressão (<10%)	68 (76,4%)	21 (23,6%)	89	0.59
	alta expressão (>10%)	17 (70,8%)	7 (29,2%)	24	
<b>MMP-9</b>	negativo	42 (72,4%)	16 (27,6%)	58	0.59
	positivo	43 (76,8%)	13 (23,2%)	56	
<b>claudina-7</b>	negativo (<10%)	65 (77,4%)	19 (22,6%)	84	0.28
	positivo (>10%)	16 (66,7%)	8 (33,3%)	24	

#### 5.4 HIBRIDIZAÇÃO IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

Foram feitas as reações de hibridização em todas as 43 amostras positivas na imunohistoquímica para EGFR (clone EGFR.25). Dez casos apresentaram amplificação do EGFR, 18 casos não estavam amplificados e em 15 casos a reação não funcionou.

Dos 28 casos analisados, a sobrevida global em 5 anos do grupo sem amplificação foi de 60,6% e no grupo com amplificação foi de 40,9% ( $p=0.50$ ). A sobrevida câncer-específica em 5 anos no grupo sem amplificação foi melhor que a do grupo com amplificação, 87,2% versus 62,5% ( $p=0.26$ ).

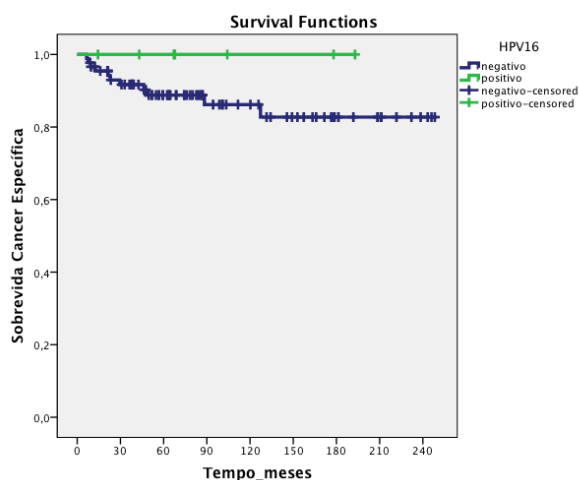


**Figura 45** - Imagem de FISH mostrando um exemplo de um caso não amplificado e outro com amplificação em cluster (vários pontos verdes no mesmo núcleo) em amostra de carcinoma epidermóide oral



## 5.5 DETECÇÃO E GENOTIPAGEM PARA HPV

Das 96 amostras testadas, 13 casos foram positivos para HPV (13,5%), sendo 6 casos (6%) positivos para HPV 16 (alto risco), 1 caso com infecção múltipla 16 e 35, 1 caso positivo para HPV 74 e 5 casos positivos para HPV 6 (baixo risco). Sete casos foram positivos para HPV de alto risco (7,3%). Com relação a sobrevida, os 13 casos positivos apresentaram melhor prognóstico (100% em 15 anos), dos 83 casos negativos, 11 morreram da doença (figura 46). Dos 7 pacientes positivos para HPV 16 nenhum morreu da doença.



**Figura 46** - Curva de sobrevida câncer-específica do HPV de alto risco (HPV-16) em pacientes com carcinoma epidermóide oral

Dos 13 casos positivos para HPV, 5 (38,5%) mostrou expressão de p16 e dos 82 casos HPV negativos, 70 (85,4%) não expressaram p16 e essa associação foi estatisticamente significativa ( $p=0.05$ ). Com relação apenas

ao HPV de alto risco (HPV16), dos 78 casos p16 negativos, 70 eram HPV negativos ( $p=0.10$ ) (Tabelas 8 e 9).

**Tabela 8** - Relação entre a expressão de p16 e a genotipagem de HPV

	HPV -	HPV +	Total
p16 -	70 (89,7%)	8 (10,3%)	78
p16 +	12 (70,6%)	5 (29,4%)	17
Total	82	13	95

**Tabela 9** - Relação entre a expressão de p16 e HPV 16

	HPV 16 -	HPV 16 +	Total
p16 -	74 (94,9%)	4 (5,1%)	78
p16 +	14 (82,4%)	3 (17,6%)	17
Total	88	7	95

Não houve relação entre a infecção pelo HPV e idade (< ou > 40 anos), pT, espessura tumoral, grau histológico e metástase linfonodal oculta.

## 6 DISCUSSÃO

O câncer de boca acomete mais frequentemente indivíduos do sexo masculino, acima de 40 anos de idade, tabagistas e etilistas (NEVILLE e DAY 2002; SCULLY 2009). Dentre os 222 pacientes com carcinoma epidermóide inicial (cT1-T2N0) de língua e assoalho bucal incluídos nesta pesquisa, 72,5% eram do sexo masculino, 73,4% foram ou são fumantes. Apesar do aumento da incidência dessa neoplasia em adultos jovens, abaixo dos 40 anos (MYERS et al. 2000; SHIBOSKI et al. 2005; PATEL et al. 2011), nesse estudo a incidência foi de apenas 9,4% (21 casos).

Os pacientes do sexo masculino, fumantes e que consumiam álcool apresentaram uma sobrevida global pior, corroborando com outros estudos (FRANCO et al. 1993; RIBEIRO et al. 2003; DE AGUIAR et al. 2007). Segundo dados do IBGE, a expectativa de vida do sexo feminino é melhor que a do sexo masculino, e os pacientes fumantes e alcoolistas morrem de outras causas relacionadas ao tabaco e álcool, como embolia pulmonar, doenças cardiovasculares e câncer no pulmão.

O planejamento terapêutico para pacientes com CEC de boca baseia-se principalmente na localização e estágio clínico do tumor, sem considerar ainda os aspectos moleculares que possam estar envolvidos na carcinogênese. Pacientes com tumores em local e estadiamento similares são tratados da mesma maneira. No entanto, existem grandes variações na resposta ao tratamento e no prognóstico. Alguns desses pacientes

apresentam sobrevida prolongada enquanto outros morrem dentro de um curto espaço de tempo devido à metástase regional e/ou à distância (KESKI-SÄNTTI et al. 2006, 2007; DE AGUIAR et al. 2007; MONTERO et al. 2014).

O prognóstico dos pacientes com carcinoma de boca é fortemente influenciado pelo estadiamento da doença no momento do diagnóstico, particularmente com a presença da metástase linfonodal, que representa o fator prognóstico mais importante, diminuindo as chances de cura em até 50% (LEEMANS et al. 1994; DIAS et al. 2001; LIM et al. 2004; FERLITO et al. 2006; CHONE e CRESPO 2008; GANLY et al. 2012). A presença da metástase linfonodal oculta (pN+) nesse estudo reduziu a taxa de sobrevida câncer específica após 5 anos de 91,3% para 63,4% e a taxa de sobrevida global após 5 anos de 78,5% para 49,7%.

Ainda existem controvérsias a respeito do tratamento do pescoço em pacientes com linfonodos clinicamente negativos e tumores primários iniciais (T1-T2). De acordo com a literatura, a incidência de metástases ocultas no pescoço varia de 15% a mais de 60% (AMARAL et al. 2004; EL-NAAJ et al. 2011; GANLY et al. 2012; THIELE et al. 2012). Em nosso estudo, essa incidência foi de 20,5% (33 casos dos 161 submetidos ao esvaziamento cervical eletivo), similar a outros estudos como os de KLIGERMAN et al. (1994) (21%), AMARAL et al. (2004) (23%), CAPOTE et al. (2007) (26,8%) e GANLY et al. (2012) (28%). Dos 33 pacientes com pN+ 29 (87,8%) eram portadores de tumores T2 e 4 (12,2%) de tumores T1. As taxas de metástase linfonodal oculta foram de 12,5% (4/32) nos casos T1 e 22,5% (29/129) nos casos T2.

Os exames de imagem, como ultrassonografia, tomografia computadorizada, ressonância magnética, aspiração com agulha fina guiada por ultrassonografia e o PET-CT, são técnicas que auxiliam na detecção de metástases nos linfonodos (VAN DEN BREKEL et al. 1998; VAN DEN BREKEL e CASTELIJNS 1999; CASTELIJNS e VAN DEN BREKEL 2002; LIM et al. 2004; KOWALSKI e SANABRIA 2007). Porém, algumas lesões, as vezes menores de 5mm, podem passar despercebidas. Por mais sofisticada que seja a técnica, ela pode não ser capaz de revelar a metástase oculta (FERLITO e RINALDO 2000).

Existem 3 estratégias de manejo do pescoço clinicamente negativo nos tumores iniciais: o esvaziamento cervical eletivo, a biópsia do linfonodo sentinela ou a observação do pescoço, com o tratamento voltado para a recorrência (KLIGERMAN et al. 1994; CASTELIJNS e VAN DER BREKEL 2002; LIM et al. 2004; KOWALSKI e SANABRIA 2007; HUANG et al. 2009; KELNER et al. 2014).

O esvaziamento cervical eletivo serve tanto para diagnóstico como para tratamento; fornecendo informações sobre o estágio patológico dos linfonodos cervicais, contribuindo assim para determinar a necessidade de terapias adjuvantes, além de remover metástases clinicamente indetectáveis (D'CRUZ et al. 2009; FERRIS e KRAUS 2012).

A incidência da metástase oculta varia de acordo com o tamanho, localização e espessura do tumor primário. A incidência é maior nos tumores localizados na parte inferior da boca (língua e assoalho bucal) (KOWALSKI e MEDINA 1998; BYERS et al. 1998; FERLITO et al. 2002; CAPOTE et al.

2007; EL-NAAJ et al. 2011). O risco de metástase linfonodal oculta é o argumento mais importante para a indicação do esvaziamento cervical eletivo. O critério normalmente indicado para o ECE é para pacientes com risco maior que 20% (WEISS et al. 1994; KOWALSKI e MEDINA 1998).

Algumas Instituições continuam indicando a política da observação para evitar as morbidades causadas pelo esvaziamento cervical, como disfunções no ombro, cicatrizes não estéticas, além do aumento do custo do procedimento, tendo em vista alguns estudos mostrarem uma sobrevida similar para ambas as modalidades de tratamento (VANDENBROUCK et al. 1980, FAKIH et al. 1989; KESKI-SÄNTTI et al. 2006; YUEN et al. 2009). Porém, as metástases ocultas no grupo observacional podem desenvolver características desfavoráveis como extravasamento capsular ou envolvimento de múltiplos linfonodos, se o seguimento não for adequado.

No estudo em pauta, avaliamos o resultado do tratamento cirúrgico com ou sem o esvaziamento cervical eletivo nos pacientes com tumores iniciais (T1-T2) tratados no A.C. Camargo Cancer Center e constatamos que as sobrevidas global e câncer-específica foram similares para ambos os tratamentos, corroborando com os achados de VANDENBROUCK et al. (1980), FAKIH et al. (1989), KESKI-SÄNTTI et al. (2006) e YUEN et al. (2009) e contrariando os achados de KLIGERMAN et al. (1994). No entanto, a maioria dos pacientes no grupo de observação (85%) tinham tumores em estágio clínico T1, enquanto a maioria dos pacientes no grupo do esvaziamento cervical eletivo (81%) tinham tumores estágio T2; um viés de seleção, o que é previsível em uma série retrospectiva. Os grupos do

presente estudo foram bem selecionados e os critérios de elegibilidade eram restritos. Os pacientes do grupo de observação foram altamente seletos, apresentando características clínico-patológicas favoráveis, e, portanto, tinham um melhor prognóstico, com maiores chances de sobrevida e menores de recorrências. Portanto, para pacientes com baixo risco, um acompanhamento rigoroso, com maiores chances de detectar precocemente uma possível recorrência e indicar uma cirurgia de resgate, é essencial (KELNER et al. 2014). O rigoroso acompanhamento clínico e radiológico nesses pacientes reflete as sobrevidas semelhantes neste estudo.

A política de observação pode ser considerada para pacientes adequadamente selecionados e que tenham condições de serem bem acompanhados por um longo período. O período de seguimento é essencial para detecção precoce de uma possível recorrência (KESKI-SÄNTTI et al. 2006; YUEN et al. 2009; KELNER et al. 2014).

Alguns parâmetros patológicos são descritos como preditivos para o risco de metástase linfonodal oculta, o que ajuda na decisão de esvaziar eletivamente. A espessura tumoral, o grau histológico, o tamanho do tumor (pT), a presença de invasão linfática, vascular, perineural e muscular são alguns desses parâmetros (KOWALSKI e MEDINA 1998; AMARAL et al. 2004; KOWALSKI e SANABRIA 2007). Nosso estudo confirmou o valor de alguns desses fatores, mostrando uma forte associação entre os tumores com espessura maior que 4mm, pouco diferenciados e pT2 com o maior risco de desenvolvimento de metástase linfonodal oculta.

A espessura tumoral, a terceira dimensão do tumor, tem se mostrando como um importante fator para a predição de metástase linfonodal em vários estudos (YUEN et al. 2002; KESKI-SÄNTTI et al. 2007; HUANG et al. 2009; GANLY et al. 2012) e foi confirmada nesse estudo. Apesar de haver um consenso da importância da espessura tumoral na predição de metástase oculta e/ou prognóstico, o valor do ponto de corte ideal ainda não foi decidido. A meta-análise de HUANG et al. (2009) sugere que o ponto de corte para a espessura tumoral com maior risco de predizer a metástase linfonodal cervical é o de 4mm.

O valor da espessura tumoral servindo como um guia para o tratamento é particularmente importante nos tumores T1 e T2, onde o tratamento mais agressivo deve ser indicado quando a espessura tumoral alcança certo valor. A maioria dos estudos, incluindo o nosso, mostra que os tumores com espessura maior que 4mm têm um maior risco de desenvolvimento de metástase oculta (KUROKAWA et al. 2002; LIM et al. 2004; HUANG et al. 2009). No nosso estudo, a ocorrência de metástase oculta nos tumores com espessura maior que 4mm foi de 28,4% contra os 8% nos tumores menos espessos.

Nós concordamos com HUANG et al. (2009) e MELCHERS et al. (2012) em recomendar o esvaziamento cervical eletivo para tumores pT1cN0 com espessura maior que 4mm. Além do risco de metástase oculta, em nosso estudo, os tumores com espessura maior que 5mm apresentaram pior sobrevida câncer-específica ( $p=0.05$ ). Assim como em outros estudos, a



espessura tumoral é um preditor para metástase oculta e sobrevida (YUEN et al. 2002; WOOLGAR 2006; HUANG et al. 2009; LARSEN et al. 2009).

O tamanho do tumor primário afeta tanto a escolha como o resultado do tratamento. Ele é um fator importante na determinação da capacidade do cirurgião em obter margens livres de tumor. Tumores maiores ao diagnóstico estão associados a um aumento do risco de recidiva local, metástases em linfonodos cervicais e baixa sobrevivência (WOOLGAR 2006). A alta incidência de metástases ocultas nos pacientes com tumores pT2 22,5% no presente estudo, e em outros estudos (YUEN et al. 2002; KESKI-SÄNTTI et al. 2006, 2007; HUANG et al. 2008; THIELE et al. 2012; EBRAHIMI et al. 2012) enfatiza a importância da indicação do esvaziamento cervical eletivo nesse grupo de pacientes. Além do risco de metástases oculta, o tamanho do tumor também influencia na sobrevida dos pacientes. No presente estudo, a sobrevida câncer específica em 5 anos dos pacientes com tumores T1 foi maior que a naqueles com tumores T2, com diferença estatisticamente significativa, 94,3% vs 84,4%, respectivamente.

Algumas características patológicas do tumor, como a espessura e o grau histológico, são indicadores de agressividade (LARSEN et al. 2009). No estudo de LARSEN et al. (2009), esses parâmetros mostraram impacto na ocorrência de metástase linfonodal e na sobrevida câncer-específica. No estudo de AMARAL et al. (2004), o grau histológico mais agressivo (II/III) nos tumores de assoalho de boca e nos tumores T2, tiveram maior risco de desenvolvimento de metástase oculta. Os tumores pouco diferenciados

(grau III), da nossa amostra, mostraram maior risco de desenvolver metástases ocultas.

Nos últimos anos, progressos significativos têm sido feitos na identificação e compreensão de biomarcadores preditivos de metástase oculta e prognóstico no câncer de boca (CORTESSINA e MARTONE 2006; LEEMANS et al. 2011). Na oncologia de cabeça e pescoço a histopatologia continua sendo o “padrão ouro” para a maioria das decisões de diagnóstico e tratamento (WOOLGAR 2006). O sistema de classificação TNM não prediz as características biológicas de células tumorais e, por conseguinte, é incapaz de individualizar o prognóstico (DE AGUIAR et al. 2007; MONTERO et al. 2014). A avaliação de alguns biomarcadores importantes no carcinoma oral no momento do diagnóstico pode permitir a identificação de um subgrupo de pacientes que necessitam de um tratamento mais agressivo.

A imunohistoquímica (IHQ) é uma ferramenta globalmente disponível que complementa a análise histopatológica, podendo ser realizada em espécimes embebidos em parafina, permitindo assim estudos retrospectivos de uma grande população. A técnica de IHQ envolve 3 etapas, todas importantes e, há uma grande variação nas metodologias e na padronização empregadas por diferentes laboratórios. Utilizamos a automação das reações de IHQ na tentativa de diminuir a variação metodológica porém, essa técnica também pode sofrer influências do operador, do equipamento e na padronização.

Diversos tipos de biomarcadores tumorais têm sido estudados: genes supressores de tumor, oncogenes, marcadores de proliferação celular,

marcadores de angiogênese, moléculas de adesão celular, entre outros. Um painel de imunohistoquímica usando vários biomarcadores moleculares poderia fornecer informações úteis para a identificação de pacientes com tumores de alto risco à metástase oculta ou pior prognóstico. O objetivo deste estudo foi identificar, como vários outros estudos, através de um extenso grupo de proteínas, os principais biomarcadores imunohistoquímicos que têm sido associados significativamente com metástase linfonodal oculta e prognóstico do CEC de língua e assoalho bucal.

A proteína p53 é uma fosfoproteína nuclear que inibe a progressão do ciclo celular e induz à apoptose, ambas reguladas por vários genes alvo. Funciona como um gene supressor de tumor, que pode induzir, em resposta a estímulos mitogênicos, uma parada na transição das fases G1-S. No câncer de cabeça e pescoço, os dados da literatura mostram evidências conflitantes a respeito da correlação entre a expressão da p53 e a maioria dos parâmetros clínico-patológicos. Baseado em outros estudos, escolhemos 10% de expressão no núcleo das células tumorais como ponto de corte para análise da proteína p53 (CHOI et al. 2002; CARLOS DE VICENTE et al. 2004; LIM et al. 2004; SHIRAKI et al. 2005; OLIVEIRA et al. 2007). No presente estudo, a expressão da p53 não foi significativamente associada com a presença da metástase linfonodal oculta, corroborando com o estudo de LIM et al. (2004) e KEUM et al. (2006), nem com qualquer um dos parâmetros clínico-patológicos analisados, concordando com os achados de SHIRAKI et al. (2005), KEUM et al. (2006), COUTINHO-CAMILLO et al. (2010) e GRÖBE et al. (2014). Porém, os pacientes com

tumores que superexpressaram p53 tiveram uma sobrevida global pior, corroborando com os resultados de OLIVEIRA et al. (2007).

O Ki-67 é um marcador de proliferação, superexpresso na maioria dos tumores, que identifica um antígeno expresso nas fases G1, S e G2, fases de células em divisão. É amplamente utilizado no câncer de mama, mas o seu papel no prognóstico dos tumores de cabeça e pescoço ainda se mantém controverso. O estudo de COUTINHO-CAMILLO et al. (2010) em carcinomas de boca, demonstrou que o aumento da expressão de Ki-67 foi associado com a presença da metástase linfonodal, estágio da doença mais avançado (III/IV), tumores localizados no assoalho de boca e bem diferenciados. No estudo de MYOUNG et al. (2006), a expressão de Ki-67 teve impacto na sobrevida dos 113 pacientes com carcinoma de boca. Diferentemente, nosso estudo não mostrou associação entre a expressão de Ki-67 e os parâmetros clínico-patológicos analisados, metástase linfonodal, nem no prognóstico. Nos estudos de CARLOS DE VICENTE et al. (2002) e DUNKEL et al. (2013) a expressão de Ki-67 também não teve impacto prognóstico em carcinomas de boca.

A ciclina D1 é uma proteína que atua no ciclo celular, acelerando a fase G1. É descrita como um oncogene, no qual o aumento da ciclina desregula o ciclo celular e contribui para gênese tumoral. O papel da ciclina D1 como marcador prognóstico para o CEC oral permanece controverso. No estudo de BOVA et al. (1999) a superexpressão de ciclina D1 foi associada com reduzida sobrevida livre de doença e pior sobrevida global, com maior incidência de recorrência local e regional. No estudo de CARLOS DE

VICENTE et al. (2002), a superexpressão de ciclina D1 correlacionou-se com metástase linfonodal e tamanho do tumor primário, porém a diferença entre as curvas de sobrevida não se mostrou significativa. No estudo de SHIRAKI et al. (2005), a expressão de ciclina D1 não teve associação com as características clínico-patológicas. No presente estudo, a expressão de ciclina D1 também não teve associação com metástase linfonodal nem com as sobrevidas global e câncer específica.

Os biomarcadores moleculares que afetam a aceleração do ciclo e a proliferação celular têm sido amplamente explorados em lesões pré-malignas e malignas da cavidade oral; este é o grupo de biomarcadores mais conflitantes a respeito dos resultados. A análise de expressão do EGFR no CEC oral é um dos mais estudados, e o EGFR tem mostrado significância prognóstica na maioria das investigações (SHIRAKI et al. 2005; AGRA et al. 2008; ZHU et al. 2013). A superexpressão de EGFR tem sido reportada em 30-90% dos tumores de cabeça e pescoço. Existe uma associação da superexpressão do EGFR com tumores pouco diferenciados (ULANOVSKI et al. 2004; SHIRAKI et al. 2005) e de pior prognóstico (LAIMER et al. 2007), sugerindo ser a expressão dessa proteína um importante marcador prognóstico dos tumores de cabeça e pescoço (LAIMER et al. 2007; ZHU et al. 2013). No nosso estudo foi observada a associação da superexpressão de EGFR com tumores com características patológicas mais agressivas, como tumores com espessura maior que 4mm, pouco diferenciados, com modo de invasão dissociativo, além da

superexpressão de EGFR ter sido associada à presença de metástase linfonodal e pior sobrevida.

Além da expressão da proteína EGFR, o número de cópias do seu gene pode também ser examinado nos dias de hoje, geralmente por hibridização “in situ” fluorescente (ZHU et al. 2013). A associação entre a alteração no número de cópias do EGFR e a expressão dessa proteína é importante para determinar qual é o mais confiável como indicador prognóstico no carcinoma de língua e assoalho bucal. Usando essa abordagem, provavelmente, é possível definir o significado prognóstico desta alteração genética, sem as diferenças dos outros fatores, como fatores específicos do local, heterogeneidade tumoral e das modalidades de tratamento. No nosso estudo, a amplificação do EGFR estava presente em 10 casos. Os casos amplificados apresentaram uma sobrevida global e câncer-específica pior em relação aos casos não amplificados, corroborando com os achados de NAKATA et al. (2011) e ZHU et al. (2013). Apesar do “valor de p” não ser significativo, a sobrevida câncer-específica dos casos amplificados foi de 62,5% em 5 anos, bem inferior aos 87,2% dos casos não amplificados.

Alterações nos níveis de expressão das proteínas de adesão celular, especialmente caderinas, cateninas e claudinas, foram relatados em vários tipos de câncer (HIROHASHI 1998; LOURENÇO et al. 2010). A baixa expressão e/ou perda da E-caderina foi relacionado com metástases linfáticas e estágio avançado em carcinomas epidermóides de boca de acordo com vários estudos (ANDREWS et al. 1997; DINIZ-FREITAS et al.

2006; UEDA et al. 2006; FAN et al. 2013), enquanto alguns estudos como o CRUZ et al. (2009) e BALASUNDARAM et al. (2014) não conseguiram provar essa associação. O estudo de UEDA et al. (2006) mostrou que a perda ou redução dos níveis de E-caderina e cateninas na membrana teve correlação com a presença de metástase linfonodal e pior sobrevida. Nos resultados de FAN et al. (2013), os tumores com baixa expressão de E-caderina tiveram pior sobrevida e a E-caderina mostrou-se um bom marcador prognóstico. No estudo de FREITAS et al. (2010) a expressão de  $\beta$ -catenina não representou um bom critério de predição de metástase linfonodal em CEC de língua. No presente estudo, a perda de expressão de E-caderina e  $\beta$ -catenina na membrana não mostraram associação com a presença de metástase linfonodal nem com o prognóstico. O potencial metastático das alterações no complexo E-caderina-catenina no carcinoma de boca ainda é controverso (UEDA et al. 2006).

A expressão de claudina-7 tem sido relatada como sendo baixa em várias neoplasias humanas, corroborando com os nossos dados, onde apenas 19,4% (26/134) dos casos expressaram claudina-7. A expressão de claudina-7 foi associada ao grau histológico, a espessura tumoral e pT, similarmente ao estudo de LOURENÇO et al. (2010) porém não foi associada a presença de metástase linfonodal. Diferentemente do resultado de BELLO et al. (2008) e LOURENÇO et al. (2010), a expressão de claudina-7 não mostrou impacto na sobrevida dos pacientes.

Para o diagnóstico de invasão tumoral, progressão, metástase e para o tratamento dos tumores, seria muito importante ampliarmos o nosso

conhecimento sobre linfangiogênese, revelando o seu real papel na capacidade de crescimento tumoral e metástases linfonodais. O anticorpo monoclonal D2-40 foi desenvolvido e permite a detecção relativamente fácil de vasos linfáticos no tecido. É relatado que a linfangiogênese aumenta potencialmente as metástases nos linfonodos. Porém, no presente estudo, a densidade de vasos linfáticos intra e peri-tumorais calculada através da marcação imunoistoquímica do anticorpo D2-40, ao contrário de nossas expectativas, não teve relação com a presença de metástase linfonodal oculta, corroborando com o estudo de OKADA et al. (2010) e contrariando o estudo de ZHANG et al. (2011).

Progressão celular, invasão e migração tumoral são eventos dependentes de vários fatores, incluindo a interação de células malignas com a matriz extracelular. Para que a propagação tumoral aconteça é necessário que haja a degradação da matriz e das proteínas de adesão celular. Tem sido demonstrado que as células tumorais podem e conseguem fazer isso. As Metaloproteinases de Matriz (MMPs) foram os marcadores moleculares mais investigados neste grupo, e, as expressões de membros da família MMP em carcinomas de cabeça e pescoço são relatados amplamente. No entanto, a correlação dessas expressões com as características clínicas ainda é controversa. Apesar de seu valor preditivo no CEC oral ainda não estar totalmente esclarecido, existe a hipótese de que as suas atividades são necessárias para a angiogênese, invasão tumoral e disseminação metastática (FAN et al. 2012).



Nos estudos de KATAYAMA et al. (2004) e APARNA et al. (2014) a expressão de MMP-9 correlacionou com metástase regional e/ou a distância e pior prognóstico em tumores iniciais de boca. No presente estudo, as MMP-9 não tiveram associação com a presença de metástase linfonodal oculta nem com o prognóstico, corroborando com os achados de GUTTMAN et al. (2004). Alguns estudos anteriores analisaram estas expressões nos pacientes com uma ampla variedade de classificações nos tamanhos do tumor (T1-4) e metástase linfonodais (N0-3).

A proteína p16 representa um regulador negativo do ciclo celular que assegura o controle da passagem celular da fase G1 para a fase S. Estímulos mitogênicos, bem como fatores de crescimento determinam a ativação da ciclina D, que liga-se e ativa as quinases-dependentes de ciclina 4 e 6 (CDKs), o que resulta na fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb), há liberação de um fator de transcrição que garante a proliferação celular (HANAHAN e WEINBERG 2000). Em nosso estudo, a expressão de p16 foi identificada em 19,5% dos casos. Os estudos existentes indicam resultados controversos em relação à expressão da p16 e a relação com prognóstico e fatores histopatológicos. YUEN et al. (2002) investigaram a expressão de p16 em carcinomas de cabeça e pescoço tratados cirurgicamente e mostraram que a diminuição de expressão de p16 contribuiu significativamente para a proliferação celular e tamanho do tumor; no entanto, ela não teve significado para o risco de metástase linfonodal e sobrevida. No presente estudo, a expressão de p16 não mostrou relação significativa com o sexo, a presença de metástase linfonodal oculta, cT, pT,

espessura tumoral, grau histológico e tipo de invasão; e também não houve diferença entre as curvas de sobrevida.

Além do tabagismo e do alcoolismo, os dois principais fatores de risco para carcinoma de células escamosas oral, estudos têm sugerido que a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV), principalmente os de alto risco (subtipos 16 e 18), podem representar um fator de risco adicional para o seu desenvolvimento (HENNESSEY et al. 2009; DUNCAN et al. 2013). A prevalência de infecções por HPV em câncer de orofaringe varia em diferentes estudos, chegando até 84%. Embora a infecção pelo HPV ser discutida como um fator de risco independente na orofaringe, o seu papel na carcinogênese de tumores localizados na cavidade oral permanece incerto. Para DUNCAN et al. (2013), o HPV desempenha um papel importante na carcinogênese. LINGEN et al. (2013) acreditam que apenas a presença do DNA do vírus não seja prova suficiente para uma associação causa-efeito do ponto de vista molecular.

No presente estudo, a presença do HPV foi investigada em 96 casos de câncer inicial de língua e assoalho bucal, desses, apenas 13 foram positivos, correspondendo a 13,5%; porém, desses 13 casos, 5 foram positivos para HPV 6 (baixo risco), 7 positivos para HPV 16 e 1 caso para o subtipo 74. A porcentagem de infecção por HPV de alto risco foi de 7,3%, similar aos 6% encontrado no estudo de KRÜGER et al. (2014), os 8,6% no estudo de DUNCAN et al. (2013), 6,9% no estudo de GRÖBE et al. (2014) e aos 4% nos sítios fora da orofaringe no estudo de UPILE et al. (2014).

A imunohistoquímica para p16 é um biomarcador diagnóstico substituto, aceito para status do HPV para carcinomas de orofaringe (KUMAR et al. 2008; NICHOLS et al. 2009), com um valor preditivo positivo próximo de 93% para expressão do HPV de alto risco (JORDAN et al. 2012; LINGEN et al. 2013). No entanto, o valor preditivo positivo da expressão de p16 para o HPV em carcinoma epidermoide oral ainda não é bem estabelecido. LINGEN et al. (2013) sugerem que a expressão imunohistoquímica do p16 não deve ser utilizada como substituto nos casos de carcinomas localizados em cavidade oral pois o seu valor preditivo positivo é muito pobre (próximo dos 40%), com a maioria dos tumores p16 positivos, negativos para HPV de alto risco.

Tumores HPV-positivos são mais frequentemente encontrados na orofaringe e têm sido associados a pacientes mais jovens, que são menos propensos a serem fumantes e/ou alcoolistas e com uma melhor resposta à terapia e sobrevida (FAKHRY et al. 2008). O perfil molecular destes tumores HPV-positivos mostrou que eles são comumente associados à superexpressão de p16<sup>INK4a</sup> (p16+) (KLUSMANN et al. 2003; KUMAR et al. 2008; LASSEN et al. 2009; NICHOLS et al. 2009), enquanto tumores não associados com HPV são raramente p16 positivo (WEINBERGER et al. 2006). Diferentemente dos resultados de DUNCAN et al. (2013), que mostrou todos os casos positivos para HPV no PCR foram positivos para p16, dos 13 casos positivos para HPV neste estudo, 5 (38,5%) mostrou expressão de p16 e dos 82 casos HPV negativos, 70 (85,4%) não expressou p16 e essa associação foi estatisticamente significativa (p=0.05). Não houve

associação com a presença de HPV e a idade (< ou > 40 anos), pT, espessura tumoral, grau histológico nem metástase linfonodal oculta.

Um achado importante foi uma concordância muito pobre entre a expressão de p16 e infecção pelo HPV nos nossos casos, sugerindo que a expressão de p16 não deve, eventualmente, ser usado como um marcador substituto para a infecção por HPV em câncer de língua e assoalho bucal, concordando com os estudos de LINGEN et al. (2013), RUSHATAMUKAYANUNT et al. (2014) e RAMSHANKAR et al. (2014).

Embora ainda não haja um consenso, estudos sugerem que tumores com expressão de p16 e positivos para HPV apresentam melhores taxas de sobrevivência. Na nossa casuística, nenhum paciente HPV positivo morreu da doença, tendo uma sobrevida câncer específica de 100% em mais de 10 anos; porém a diferença das curvas não se mostrou estatisticamente significativa, possivelmente devido ao baixo número de casos positivos para HPV. Já com relação a expressão de p16 nos tumores e sobrevivência, nossa casuística não apresentou diferença estatisticamente significativa entre as curvas.

Nossa pesquisa teve como intuito encontrar biomarcadores envolvidos na carcinogênese que pudessem ser utilizados no diagnóstico e seleção de pacientes de alto risco de desenvolvimento de metástases cervicais ocultas em tumores iniciais. As proteínas selecionadas não apresentaram resultados que permitissem recomendar seu uso na rotina.

Alguns autores utilizam vários tipos histológicos e de localizações topográficas diferentes para o estudo de alguns marcadores, nossa amostra

foi bem selecionada, os critérios bem restritos, o que dificulta a comparação dos resultados com alguns artigos publicados.

A explicação para a maioria dos anticorpos utilizados na nossa pesquisa não terem sido relacionados com metástase linfonodal oculta e sobrevida pode ser explicado parcialmente por problemas com a variabilidade da marcação imunoistoquímica, especialmente diferenças na sensibilidade e especificidade entre os vários anticorpos comercialmente disponíveis, variação na interpretação das reações, artefatos de técnica e/ou diferenças na seleção das amostras, como heterogeneidade de localização e biológica do tumor (DOWSETT et al. 2007; SHAH e CHEN 2010).

Apesar do nosso e de vários outros estudos que avaliaram a expressão imunoistoquímica de muitos biomarcadores, até o presente momento, nenhum biomarcador mostrou-se confiável em repetidos estudos e nenhum é usado na rotina prática da patologia de cabeça e pescoço.

A incidência de metástase linfonodal oculta encontrada foi de 20,5%, dentro do esperado e publicado na literatura. Dos parâmetros histopatológicos avaliados, a espessura maior que 4mm, pT2 e o grau de diferenciação foi associado ao maior risco de desenvolvimento de metástases linfonodais ocultas, concordando com vários autores. Os tumores com alta expressão de EGFR foram associados ao maior risco de desenvolvimento de metástase linfonodal, apresentaram características patológicas desfavoráveis e pior sobrevida. Os fatores moleculares ainda necessitam de melhor padronização para serem utilizados na prática clínica diária e os parâmetros clínico-patológicos ainda são os mais acessíveis na avaliação dos pacientes com alto e baixo risco de metástases.

## 7 CONCLUSÕES

- A incidência de metástase oculta neste estudo foi de 20,5%;
- As sobrevidas global e câncer específica foram similares nos pacientes submetidos ao esvaziamento cervical eletivo e nos observados;
- A política de observação do pescoço pode ser indicada para tumores pequenos (pT1), de baixa espessura (menores de 4mm);
- A presença de metástase linfonodal é o parâmetro mais importante na sobrevida dos pacientes portadores de carcinoma inicial de língua e assoalho bucal;
- Os parâmetros clínico-patológicos são os fatores mais acessíveis e importantes na rotina clínica para avaliar o risco de metástase linfonodal oculta nos pacientes com tumor inicial e pescoço clinicamente negativo;
- Os tumores pT2, com espessura maior que 4mm, especialmente pouco diferenciados, são os de maior risco a desenvolverem metástase linfonodal oculta, portanto candidatos ao esvaziamento cervical eletivo;
- Os tumores com alta expressão de EGFR apresentaram características patológicas desfavoráveis e pior sobrevida câncer específica;
- Os fatores moleculares ainda necessitam de melhor padronização para serem utilizados na prática clínica diária.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agra IM, Carvalho AL, Pinto CA, et al. Biological markers and prognosis in recurrent oral cancer after salvage surgery. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2008; 134:743-9.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Biologia molecular da célula**. 4ª ed 2ª reimpressão. Porto Alegre: Artmed, 2006. Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular; p.1065-125.

Al-Rajhi N, Khafaga Y, El-Husseiny J, et al. Early stage carcinoma of oral tongue: prognostic factors for local control and survival. **Oral Oncol** 2000; 36:508-14.

Amaral TMP, Freire ARS, Carvalho AL, Pinto CAL, Kowalski LP. 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** 2004; 40:780-6.

Andrews NA, Jones AK, Helliwell TR, Kinsella AR. Expression of the E-cadherin-catenin cell adhesion complex in primary squamous cell carcinomas of the head and neck and their nodal metastases. **Br J Cancer** 1997; 75:1474-80.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand J Dent Res** 1987; 95:229-49.

Aparna M, Rao L, Kunhikatta V, Radhakrishnan R. The role of MMP-2 and MMP-9 as prognostic markers in the early stages of tongue squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 2014; 12. [Epub ahead of print].

Balasundaram P, Singh MK, Dinda AK, Thakar A, Yadav R. Study of  $\beta$ -catenin, E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma with and without lymph node metastases. **Diagn Pathol** 2014; 9:145.

Barros SS, Henriques AC, Pereira KM, de Medeiros AM, Galvão HC, Freitas Rde A. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. **Arch Oral Biol** 2011; 56:752-60.

Bello IO, Vilen ST, Niinimaa A, Kantola S, Soini Y, Salo T. Expression of claudins 1, 4, 5, and 7 and occludin, and relationship with prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. **Hum Pathol** 2008; 39:1212-20.

Bernardes VF, Gleber-Netto FO, Sousa SF, et al. EGFR status in oral squamous cell carcinoma: comparing immunohistochemistry, FISH and CISH detection in a case series study. **BMJ Open** 2013; 3:e002077.

Bettendorf O, Piffkò J, Bänkfalvi A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? **Oral Oncol** 2004; 40:110-9.

Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, et al. Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. **Clin Cancer Res** 1999; 5:2810-9.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med** 1989; 18:432-7.

Byers RM, El-Naggar AK, Lee YY, et al. Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue? **Head Neck** 1998; 20:138-44.



Cantarutti AL, Fernandes LP, Saldanha MV, et al. Evaluation of immunohistochemical expression of p16 and presence of human papillomavirus in oral and oropharyngeal carcinoma. **J Craniofac Surg** 2014; 25:210-4.

Capote A, Escorial V, Muñoz-Guerra MF, Rodríguez-Campo FJ, Gamallo C, Naval L. Elective neck dissection in early-stage oral squamous cell carcinoma--does it influence recurrence and survival? **Head Neck** 2007; 29:3-11.

Carlos de Vicente J, Herrero-Zapatero A, Fresno MF, Lopez-Arranz JS. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. **Oral Oncol** 2002; 38:301-8.

Castelijns JA, van den Brekel MW. Imaging of lymphadenopathy in the neck. **Eur Radiol** 2002; 12:727-38.

Chen ZW, Weinreb I, Kamel-Reid S, Perez-Ordoñez B. Equivocal p16 immunostaining in squamous cell carcinoma of the head and neck: staining patterns are suggestive of HPV status. **Head Neck Pathol** 2012; 6:422-9.

Cheng AN, Jiang SS, Fan CC et al Increased Cdc7 expression is a marker of oral squamous cell carcinoma and overexpression of Cdc7 contributes to the resistance to DNA-damaging agents. **Cancer Lett** 2013; 337:218–225.

Choi HR, Batsakis JG, Zhan F, Sturgis E, Luna MA, El-Naggar AK. Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis. **Hum Pathol** 2002; 33:158-64.

Chone CT, Crespo AN. Manejo do pescoço no câncer de boca. In: Parise O, Kowalski LP, Lehn C, editores. **Câncer de cabeça e pescoço: diagnóstico e tratamento**. São Paulo: Âmbito Editores; 2008. p.118-24.

Chow V, Yuen AP, Lam KY, Tsao GS, Ho WK, Wei WI. A comparative study of the clinicopathological significance of E-cadherin and catenins (alpha, beta, gamma) expression in the surgical management of oral tongue carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 2001; 127:59-63.

Cortesina G, Martone T. Molecular metástases markers in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. **Acta Otorhinolaryngol Ital** 2006; 26:317-25.

Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Nishimoto IN, Kowalski LP, Soares FA. Nucleophosmin, p53, and Ki-67 expression patterns on an oral squamous cell carcinoma tissue microarray. **Hum Pathol** 2010; 41:1079-86.

Cruz MC, Pereira AL, Lopes FF, et al. Immunohistochemical expression of E-cadherin and CD44v6 in squamous cell carcinomas of the lower lip and tongue. **Braz Dent J** 2009; 20:64-9.

D'Cruz AK, Siddachari RC, Walvekar RR, et al. Elective neck dissection for the management of the N0 neck in early cancer of the oral tongue: need for a randomized controlled trial. **Head Neck** 2009; 31:618-24.

de Aguiar A Jr, Kowalski LP, de Almeida OP. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. **Oral Oncol** 2007; 43:593-601.

de Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Hernández Vallejo G. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2005; 41:283-93.

Dias FL, Kligerman J, Sá GM, et al. Elective neck dissection versus observation in stage I squamous cell carcinomas of the tongue and floor of the mouth. **Otorinolaringol Head Neck Surg** 2001; 125:23-9.

Diniz-Freitas M, Garcia-Caballero T, Antunez-Lopez J, Gandara-Rey JM, Garcia-Garcia A. Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2006; 42:190-200.

Dowsett M, Hanna WM, Kockx M, et al. Standardization of HER2 testing: results of an international proficiency-testing ring study. **Mod Pathol** 2007; 20:584-91.

Duncan LD, Winkler M, Carlson ER, Heidel RE, Kang E, Webb D. p16 immunohistochemistry can be used to detect human papillomavirus in oral cavity squamous cell Carcinoma. **J Oral Maxillofac Surg** 2013; 71:1367-75.

Dunkel J, Vaittinen S, Grénman R, Kinnunen I, Irjala H. Prognostic markers in stage I oral cavity squamous cell carcinoma. **Laryngoscope** 2013; 123:2435-41.

Ebrahimi A, Ashford BG, Clark JR. Improved survival with elective neck dissection in thick early-stage oral squamous cell carcinoma. **Head Neck** 2012; 34:709-16.

El-Naaj IA, Leiser Y, Shveis M, Sabo E, Peled M. Incidence of oral cancer occult metastasis and survival of T1-T2N0 oral cancer patients. **J Oral Maxillofac Surg** 2011; 69:2674-9.

El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. **Head Neck** 2012; 34:459-61.

Fakih AR, Rao RS, Borges AM, Patel AR. Elective versus therapeutic neck dissection in early carcinoma of the oral tongue. **Am J Surg** 1989; 158:309-13.

Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, Forastiere A, Gillison ML. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. **J Natl Cancer Inst** 2008; 100:261-9.

Fan HX, Li HX, Chen D, Gao ZX, Zheng JH. Changes in the expression of MMP2, MMP9, and ColIV in stromal cells in oral squamous tongue cell carcinoma: relationships and prognostic implications. **J Exp Clin Cancer Res**. 2012; 31:90-8.

Fan CC, Wang TY, Cheng YA, et al. Expression of E-cadherin, Twist, and p53 and their prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol** 2013; 139:1735-44.

Faustino SES, Oliveira DT, Nonogaki S, Landman G, Carvalho AL, Kowalski LP. Expression of vascular endothelial growth factor-C does not predict occult lymph-node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2008; 37:372-8.

Ferlito A, Rinaldo A. False negative conventional histology of lymph nodes in patients with head and neck cancer. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec** 2000; 62:112-4.

Ferlito A, Shaha AR, Rinaldo A. The incidence of lymph node micrometastases in patients pathologically staged N0 in cancer of oral cavity and oropharynx. **Oral Oncol** 2002; 38:3-5.

Ferlito A, Rinaldo A, Silver CE, et al. Neck dissection: then and now. **Auris Nasus Larynx** 2006; 33:365-74.

Ferris RL, Kraus DH. Sentinel lymph node biopsy versus selective neck dissection for detection of metastatic oral squamous cell carcinoma. **Clin Exp Metastasis** 2012; 29:693-8.

Furuse M, Sasaki H, Tsukita S. Manner of interaction of heterogenous claudin species within and between tight junction strands. **J Cell Biol** 1999; 147:891-903.

Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. **Cancer** 2002; 95:1902-10.

Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int J Cancer** 1989; 43:992-1000.

Franco EL, Dib LL, Pinto DS, Lombardo V, Contesini H. Race and gender influences on the survival of patients with mouth cancer. **J Clin Epidemiol** 1993; 46:37-46.

Freitas Rde A, Silveira EJ, Silveira JP, Silva FM, Amorim RF. Correlation of  $\beta$ -catenin expression and metastasis in tongue squamous cell carcinoma. **Acta Cir Bras** 2010; 25:513-7.

Ganly I, Patel S, Shah J. Early stage squamous cell cancer of the oral tongue-clinicopathologic features affecting outcome. **Cancer** 2012; 118:101-11.

Gasco M, Crook T. The p53 network in head and neck cancer. **Oral Oncol** 2003; 39:222-31.

Gröbe A, Hanken H, Al-Dam A, et al. P53 immunohistochemical expression does not correlate with clinical features in 207 carcinomas of the oral cavity and in the head and neck region. **Clin Oral Investig** 2014; 18:211-7.

Guttman D, Stern Y, Shpitzer T, Ulanovski D, Druzd T, Feinmesser R. Expression of MMP-9, TIMP-1, CD-34 and factor-8 as prognostic markers for squamous cell carcinoma of the tongue. **Oral Oncol** 2004; 40:798-803.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

Hasebe T, Mukai K, Yamaguchi N, et al. Prognostic value of immunohistochemical staining for proliferating cell nuclear antigen, p53, and c-erbB-2 in sebaceous gland carcinoma and sweat gland carcinoma: comparison with histopathological parameter. **Mod Pathol** 1994; 7:37-43.

Hennessey PT, Westra WH, Califano JA. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. **J Dent Res** 2009; 88:300-6.

Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. **Am J Pathol** 1998; 153:333-9.

Huang SF, Kang CJ, Lin CY, et al. Neck treatment of patients with early stage oral tongue cancer: comparison between observation, supraomohyoid dissection, and extended dissection. **Cancer** 2008; 112:1066-75.

Huang SH, Hwang D, Lockwood G, Goldstein DP, O'Sullivan B. Predictive value of tumor thickness for cervical lymph-node involvement in squamous cell carcinoma of the oral cavity: a meta-analysis of reported studies. **Cancer** 2009; 115:1489-97.

Huang SF, Cheng SD, Chien HT, et al. Relationship between epidermal growth factor receptor gene copy number and protein expression in oral cavity squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2012; 48:67-72.

Jordan RC, Lingen MW, Perez-Ordóñez B, et al. Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. **Am J Surg Pathol** 2012; 36:945-54.

Katayama A, Bando N, Kishibe K, et al. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. **Clin Cancer Res** 2004; 10:634-40.

Kelner N, Vartanian JG, Pinto CA, Coutinho-Camillo CM, Kowalski LP. Does elective neck dissection in T1/T2 carcinoma of the oral tongue and floor of the mouth influence recurrence and survival rates? **Br J Oral Maxillofac Surg** 2014; 52:590-7.

Keski-Säntti H, Atula T, Törnwall J, Koivunen P, Mäkitie A. Elective neck treatment versus observation in patients with T1/T2 N0 squamous cell carcinoma of oral tongue. **Oral Oncol** 2006; 42:96-101.

Keski-Säntti H, Atula T, Tikka J, Hollmén J, Mäkitie AA, Leivo I. Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of oral tongue. **Oral Oncol** 2007; 43:1007-13.

Keum KC, Chung EJ, Koom WS, et al. Predictive value of p53 and PCNA expression for occult neck metastases in patients with clinically node-negative oral tongue cancer. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2006; 135:858-64.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, et al. Overexpression of p16(INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. **Int J Cancer** 2001; 92:276-84.

Kligerman J, Lima RA, Soares JR, et al. Supraomohyoid neck dissection in the treatment of T1/T2 squamous cell carcinoma of oral cavity. **Am J Surg** 1994;168:391-4.

Klussman J, Gultekin E, Weissenborn S, et al. Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. **Am J Pathol** 2003; 162:747.

Kowalski LP. Results of salvage treatment of neck in patients with oral cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2002; 128:58-62.

Kowalski LP, Medina JE. Nodal metastases. **Otolaryngol Clin North Am** 1998; 31:621-37.

Kowalski LP, Sanabria A. Elective neck dissection in oral carcinoma: a critical review of the evidence. **Acta Otorhinolaryngol Ital** 2007; 27:113-7.



Kumar B, Cordell KG, Lee JS, et al. EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53,sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. **J Clin Oncol** 2008; 26:3128-37.

Kurokawa H, Yamashita Y, Takeda S, et al. Risk factors for late cervical lymph node metastases in patients with stage I or II carcinoma of the tongue. **Head Neck**. 2002; 24:731-6.

Krüger M, Pabst AM, Walter C, et al. The prevalence of human papilloma virus (HPV) infections in oral squamous cell carcinomas: a retrospective analysis of 88 patients and literature overview. **J Craniomaxillofac Surg** 2014; 42:1506-14.

Laimer K, Spizzo G, Gastl G, et al. High EGFR expression predicts poor prognosis in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx: a TMA-based immunohistochemical analysis. **Oral Oncol** 2007; 43:193-8.

Larsen SR, Johansen J, Sørensen JA, Krogdahl A. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 2009; 38:657-62.

Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Oncol** 2009; 27:1992-8.

Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, Van Der Waal I, Snow GB. Recurrences at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. **Cancer** 1994; 73:187-90.

Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:9-12.

Liao C, Lin CY, Fan KH, et al. Identification of a high-risk group among patients with oral cavity squamous cell carcinoma and pT1-2N0 disease. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2010; 82:284-90.

Lim SC, Zhang S, Ishii G. et al. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. **Clin Cancer Res** 2004; 10:166-72.

Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, et al. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. **Oral Oncol** 2013; 49:1-8.

Lourenço SV, Coutinho-Camilo CM, Buim MEC, et al. Oral squamous cell carcinoma: status of tight junction claudins in the different histopathological patterns and relationship with clinical parameters: a tissue-microarray-based study of 136 cases. **J Clin Pathol** 2010; 63:609-14.

Mäkitie AA, Koivunen P, Keski-Säntti H, et al. Oral tongue carcinoma and its treatment in Finland. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2007; 264:263-7.

Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2006; 102:67-76.

Melchers LJ, Schuurin E, van Dijk BA, et al. Tumour infiltration depth  $\geq 4$  mm is an indication for an elective neck dissection in pT1cN0 oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2012; 48:337-42.

Méndez E, Fan W, Choi P, et al. Tumor-specific genetic expression profile of metastatic oral squamous cell carcinoma. **Head Neck** 2007; 29:803-14.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2014.

Miyahara M, Tanuma J, Sugihara K, Semba I. Tumor lymphangiogenesis correlates with lymph node metastasis and clinicopathologic parameters in oral squamous cell carcinoma. **Cancer** 2007; 110:1287-94.

Monteiro LS, Diniz-Freitas M, Garcia-Caballero T, et al. EGFR and Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma using tissue microarray technology. **J Oral Pathol Med** 2010; 39:571-8.

Monteiro LS, Diniz-Freitas M, Garcia-Caballero T, Warnakulasuriya S, Forteza J, Fraga M. Combined cytoplasmic and membranous EGFR and p53 overexpression is a poor prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 2012; 41:559-67.

Montero PH, Yu C, Palmer FL, et al. Nomograms for preoperative prediction of prognosis in patients with oral cavity squamous cell carcinoma. **Cancer** 2014; 120:214-21.

Myers JN, Elkins T, Roberts D, Byers RM. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2000; 122:44-51.

Myoung H, Kim MJ, Lee JH, Ok YJ, Paeng JY, Yun PY. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2006; 35:1005-10.

Nakata Y, Uzawa N, Takahashi K, et al. EGFR gene copy number alteration is a better prognostic indicator than protein overexpression in oral tongue squamous cell carcinomas. **Eur J Cancer** 2011; 47:2364-72.

Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer J Clin** 2002; 52:195-215.

Nichols AC, Faquin WC, Westra WH, et al. HPV-16 infection predicts treatment outcome in oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2009; 140:228-34.

Oliveira LR de, Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. Prognostic impact of p53 and p63 immunoexpression in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 2007; 36:191-7.

Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Costa JP, Simões AL, Matteo MA, Zucoloto S. Prognostic factors and survival analysis in a sample of oral squamous cell carcinoma patients. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2008; 106:685-95.

Okada Y. Relationships of cervical lymph node metastasis to histopathological malignancy grade, tumor angiogenesis, and lymphatic invasion in tongue cancer. **Odontology** 2010; 98:153-9.

Okamoto M, Nishimine M, Kishi M, et al. Prediction of delayed neck metastasis in patients with stage I/II squamous cell carcinoma of the tongue. **J oral Pathol Med** 2002; 31:227-33.

Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. **Annu Rev Pathol** 2009; 4:49-70.

Pande P, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. **Oral Oncol** 1998; 34:396-403.

Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. **J Clin Oncol** 2011; 29:1488-94.

Ramshankar V, Soundara VT, Shyamsundar V, Ramani P, Krishnamurthy A. Risk stratification of early stage oral tongue cancers based on HPV status and p16 immunoexpression. **Asian Pac J Cancer Prev** 2014; 15:8351-9.

Ribeiro KCB, Kowalski LP, Latorre MR. Perioperative complications, comorbidities, and survival in oral or oropharyngeal cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2003; 129:219-28.

Rushatamukayanunt P, Morita K, Matsukawa S, et al. Lack of association between high-risk human papillomaviruses and oral squamous cell carcinoma in young Japanese patients. **Asian Pac J Cancer Prev** 2014; 15:4135-41.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science** 1985; 230:1350-4.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2<sup>nd</sup> ed. New York: Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor; 1989.

Sarkis SA, Abdullah BH, Abdul Majeed BA, Talabani NG. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinoma in relation to proliferation, apoptosis, angiogenesis and lymphangiogenesis. **Head Neck Oncol** 2010; 2:13.

Scully C. **Medicina oral e maxillofacial: bases do diagnóstico e tratamento**. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. Câncer. p.177-90.

Sessions DG, Spector GJ, Lenox J, Haughey B, Chao C, Marks J. Analysis of treatment results for oral tongue cancer. **Laryngoscope** 2002; 112:616-25.

Shah JP, Candela FC, Poddar AK. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. **Cancer** 1990; 66:109-13.

Shah S, Chen B. Testing for HER2 in breast cancer: a continuing evolution. **Patholog Res Int** 2010; 6:903202-7.

Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the U.S. population ages 20-44 years. **Cancer** 2005; 103:1843-9.

Shiraki M, Odajima T, Ikeda T, et al. Combined expression of p53, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor improves estimation of prognosis in curatively resected oral cancer. **Mod Pathol** 2005; 18:1482-9.

Silva SD, Perez DE, Alves FA, et al. ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: correlation with clinical outcomes. **Oral Oncol** 2008; 44:484-90.

Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. **Cancer** 2010; 116:2166-73.

Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. **Int J Cancer** 2007; 121:2465-72.

Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. **Int J Cancer** 2004; 108:766-72.

Spiro RH, Huvos AG, Wong GY, Spiro JD, Gnecco CA, Strong EW. Predictive value of tumor thickness in squamous carcinoma confined to the tongue and floor of the mouth. **Am J Surg** 1986; 152:345-50.

Stabenow E. Metástase linfática cervical no carcinoma espinocelular de vias aerodigestivas superiores: análise crítica de fatores preditivos, pelo modelo de regressão logística. **Rev Bras Cir Cabeça Pescoço** 2007; 36: 202-8.

Sugiura T, Inoue Y, Matsuki R, et al. VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: Implications for use as a prognostic marker. **Int J Oncol** 2009; 34:673-80.

Szabó B, Nelhubel GA, Kárpáti A, et al. Clinical significance of genetic alterations and expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas. **Oral Oncol** 2011; 47:487-96.

Teixeira G, Antonangelo L, Kowalski L, Saldiva P, Ferraz A, Silva Filho G. Argyrophilic nucleolar organizer regions staining is useful in predicting recurrence-free interval in oral tongue and floor of mouth squamous cell carcinoma. **Am J Surg** 1996; 172:684-8.

Thiele OC, Seeberger R, Flechtenmacher C, Hofele C, Freier K. The role of elective supraomohyoid neck dissection in the treatment of early, node-negative oral squamous cell carcinoma (OSCC): a retrospective analysis of 122 cases. **J Craniomaxillofac Surg** 2012; 40:67-70.

Thomas J, Primeaux T. Is p16 immunohistochemistry a more cost-effective method for identification of human papilloma virus-associated head and neck squamous cell carcinoma? **Ann Diagn Pathol** 2012; 16:91-9.

Todd R, Donoff RB, Wong DT. The molecular biology of oral carcinogenesis: toward a tumor progression model. **J Oral Maxillofac Surg** 1997; 55:613-23. Review.

Tsai CH, Yang CC, Chou LS, Chou MY. The correlation between alteration of p16 gene and clinical status in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 2001; 30:527-31.

Tsukita S, Furuse M. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? **Trends Cell Biol** 1999; 9:268-73.

Ueda G, Sunakawa H, Nakamori K, et al. Aberrant expression of beta- and gamma catenin is an independent prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2006; 35:356-61.

Ulanovski D, Stern Y, Roizman P, et al. Expression of EGFR and Cerb-B2 as prognostic factors in cancer of the tongue. **Oral Oncol** 2004; 40:532-7.



Upile NS, Shaw RJ, Jones TM, et al. Squamous cell carcinoma of the head and neck outside the oropharynx is rarely human papillomavirus related. **Laryngoscope** 2014; 124:2739-44.

Van den Brekel MW, Castelijns JA, Snow GB. Diagnostic evaluation of the neck. **Otolaryngol Clin North Am** 1998; 31:601-20.

Van den Brekel MW, Castelijns JA. Radiologic evaluation of neck metastases: the otolaryngologist's perspective. **Semin Ultrasound CT MR** 1999; 20:162-74.

Vandenbrouck C, Sancho-Garnier H, Chassagne D, Saravane D, Cachin Y, Micheau C. Elective versus therapeutic radical neck dissection in epidermoid carcinoma of the oral cavity: results of a randomized clinical trial. **Cancer** 1980; 46:386-90.

Winn DM. Diet and nutrition in the etiology of oral cancer. **Am J Clin Nutr** 1995; 61:437S-45S.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. **N Engl J Med** 1991; 324:1-8.

Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. **J Clin Oncol** 2006; 24:736-47.

Weiss MH, Harrison LB, Isaacs RS. Use of decision analysis in planning a management strategy for the stage N0 neck. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 1994; 120:699-702.

Werner B, Campos AC, Nadji M, Torres LFB. Uso prático da imunohistoquímica em patologia cirúrgica. **J Bras Patol Med Lab** 2005; 41:353-64.

Wolfensberger M, Zbaeren P, Dulguerov P, Müller W, Arnoux A, Schmid S. Surgical treatment of early oral carcinoma-results of a prospective controlled multicenter study. **Head Neck** 2001; 23:525-30.

Woolgar JA. Detailed topography of cervical lymph-node metastases from oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg** 1997; 26:3-9.

Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2006; 42:229-39.

Xie X, De Angelis P, Clausen OP, Boysen M. Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. **Oral Oncol** 1999; 35:502-9.

Xuan M, Fang YR, Wato M, Hata S, Tanaka A. Immunohistochemical colocalization of lymphatics and blood vessels in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med** 2005; 34:334-9.

Yuen AP, Lam KY, Lam LK, et al. Prognostic factors of clinically stage I and II oral tongue carcinoma- A comparative study of stage, thickness, shape, growth pattern, invasive front malignancy grading, Martinez-Gimeno score, and pathologic features. **Head Neck** 2002; 24:513-20.

Yuen AP, Ho CM, Chow TL, et al. Prospective randomized study of selective neck dissection versus observation for N0 neck of early tongue carcinoma. **Head Neck** 2009; 31:765-72.

Yuen PW, Chow V, Choy J, Lam KY, Ho WK, Wei WI. The clinicopathologic significance of p53 and p21 expression in the surgical management of lingual squamous cell carcinoma. **Am J Clin Pathol** 2001; 116:240-5.

Zhang Z, Pan J, Li L, Wang Z, Xiao W, Li N. Survey of risk factors contributed to lymphatic metastasis in patients with oral tongue cancer by immunohistochemistry. **J Oral Pathol Med** 2011; 40:127-34.

Zhu X, Zhang F, Zhang W, He J, Zhao Y, Chen X. Prognostic role of epidermal growth factor receptor in head and neck cancer: a meta-analysis. **J Surg Oncol** 2013; 108:387-97.

## ADENDO

Resultados adicionais:

### 1 **Conceito de Metástase Linfonodal Oculta:**


- Nos pacientes que não realizaram esvaziamento cervical eletivo (grupo observacional) a metástase oculta foi definida como a confirmação histológica da metástase cervical detectada durante o período de follow-up sem a presença de metástase no sítio primário do tumor. Os pacientes que apresentaram metástase cervical com recorrência local não foi considerada metástase oculta pois a recorrência no pescoço pode ter ocorrido após o tratamento inicial.
- Nos pacientes que foram submetidos ao esvaziamento cervical eletivo, a metástase oculta foi definida como a presença de doença microscópica no exame anatomopatológico do espécime da dissecação do pescoço.

Quando consideramos esses dois conceitos juntos, os parâmetros patológicos associados a metástase oculta foram: espessura tumoral maior ou igual a 3mm, grau histológico, estadiamento patológico do tumor (pT) e invasão muscular (tabela abaixo).

Tabela da associação entre os dados patológicos e a presença ou não da metástase linfonodal oculta (pN+)

Dados Patológicos		Metástase Linfonodal Oculta (pN+)			P
		não	sim	total	
Espessura 3mm	igual ou menor	41 (91.1%)	4 (8.9%)	45	p= 0.02
	maior	89 (75.4%)	29 (24.6%)	118	
	total	130	33	163	
Espessura 4mm	igual ou menor	61 (92.4%)	5 (7.6%)	66	p= 0.001
	maior	67 (70.5%)	28 (29.5%)	95	
	total	128	33	161	
Espessura 5mm	igual ou menor	70 (92.1%)	6 (7.9%)	76	p= 0.000
	maior	58 (68.2%)	27 (31.8%)	85	
	total	128	33	161	
Grau Histológico	I	64 (84.2%)	12 (15.8%)	76	p=0.003
	II	56 (83.6%)	11 (16.4%)	67	
	III	11 (50%)	11 (50%)	22	
	total	131	34	165	
T patológico	pT1	77 (89.5%)	9 (10.5%)	86	p=0.001
	pT2	50 (68.5%)	23 (31.5%)	73	
	total	127	32	159	
invasão muscular	não	42 (89.4%)	5 (10.6%)	47	p=0.04
	sim	88 (75.2%)	29 (24.8%)	117	
		130	34	164	

## Anexo 1 – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

 **Hospital  
A.C. Camargo**  
Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer

**Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 18 de Abril de 2011.

Ao  
**Dr. Luiz Paulo Kowalski**

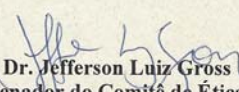
**Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1528/11**  
**“Fatores clínico-patológicos e expressão imunoistoquímica de potenciais marcadores preditivos para metástase cervical em carcinoma epidermóide inicial (T1-T2) de língua e assoalho bucal”.**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 12/04/2011, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 15/03/2011, **aprovaram** a realização do estudo em referência, datado de 24 de março de 2011 e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para/Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre o Uso e destino do material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Ciência do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica.

**Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.**

Atenciosamente,

  
**Dr. Jefferson Luiz Gross**  
**1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

1/1

---

Fundação Antonio Prudente – CNPJ/MF N. 60.961.968/0001-06  
Rua Prof. Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo, SP – 01509-900  
Telefone: (11) 2189-5000  
www.accamargo.org.br

## Anexo 2 - Ficha Clínica

### Dados Demográficos e Clínico Patológicos

1. Nome: \_\_\_\_\_ 2. RgH: \_\_\_\_\_
3. Idade: \_\_\_\_\_ data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_
4. Sexo (1) Feminino (2) Masculino
5. Raça: (1) branca (2) negra (3) amarela (4) pardo (5) outro \_\_\_\_\_
6. Fumo: (0) não (1) sim (9) ignorado \_\_\_\_\_ cigarros/dia \_\_\_\_\_ anos
7. Álcool: (0) não (1) sim (9) ignorado
8. Sítio do tumor: (1) borda de língua (2) ponta de língua (3) assoalho central (4) assoalho lateral (5) dorso de língua ; distância da linha média \_\_\_\_\_ distancia da gengiva \_\_\_\_\_
9. (1) T1 (2) T2 Tamanho: \_\_\_\_\_ cm
10. Tipo clínico: (1) ulcerado superficial (2) exofítico (3) ulcero-infiltrativo (4) ulcero-vegetante (5) ulcero-vegetante-infiltrativa (9) ignorado
11. Cirurgia: (1) Glossectomia parcial (2) pelveglossectomia parcial (3) plectomia parcial (4) pelveglossomandibulectomia marginal (5) pelveglossomandibulectomia seccional
12. Data da cirurgia: \_\_\_\_\_
13. EC Ipsilateral (0) não (1) SOH (2) Radical modificado (3) radical (4) seletivo
14. EC Contralateral (0) não (1) SOH (2) Radical modificado (3) radical (4) seletivo
15. Reconstrução: (0) não (1) retalho local (2) miocutâneo \_\_\_\_\_ (3) microcirúrgico \_\_\_\_\_
- Complicações PO:**
16. Locais: (0) não (1) deiscência (2) infecção (3) trombose (4) hematoma (5) seroma (6) outras \_\_\_\_\_
17. Sistêmicas: (0) não (1) pneumonia (2) IAM (3) AVC (4) Trombose venosa profunda (5) outras \_\_\_\_\_
18. Adjuvância: (0) não (1) RXT a) Dose tumor: \_\_\_\_\_
- b) Dose ipsilateral: \_\_\_\_\_ c) Dose contralateral: \_\_\_\_\_
19. Aparelho: (1) cobalto (2) acelerador (3) IMRT 22. data de início de RXT \_\_\_\_\_
21. QT: (0) não (1) concomitante a RT \_\_\_\_\_
- Microscopia: número AP \_\_\_\_\_
- (1) grau I (2) grau II (3) grau III (4) indiferenciado
22. Espessura total: \_\_\_\_\_ mm
23. Espessura 3mm: (0) igual ou menor que 3mm (1) maior que 3mm (9) ignorado  
Espessura 4mm: (0) igual ou menor que 4mm (1) maior que 4mm (9) ignorado  
Espessura 5mm: (0) igual ou menor que 5mm (1) maior que 5mm (9) ignorado
24. Diâmetro: \_\_\_\_\_ mm
25. Tipo de invasão (1) pushing (2) infiltration (3) dissociation
26. Margens (0) livres (1) exígua (2) comprometida
27. Margem comprometida/exígua (0) não (1) lateral (2) profunda
28. Distancia mínima da margem exígua \_\_\_\_\_ mm
29. Embolização vascular: (0) não (1) sim 30. Embolização linfática: (0) não (1) sim
31. Invasão perineural: (0) não (1) sim 32. Invasão muscular: (0) não (1) sim (2) superficialmente
33. Invasão glandular (0) não (1) sim 34. Reação desmoplásica: (0) não (1) leve (2) moderada (3) intensa
35. Infiltrado inflamatório: (0) não (1) leve (2) moderado (3) intenso
36. Linfonodo comprometido: (0) não (1) sim número de LN + \_\_\_\_\_ (9) NA
37. Local do LN+ ipsilat (0) não (1) nível I (2) nível II (3) nível III (4) nível IV (5) nível V

38. Local do LN+ contra (0) não (1) nível I (2) nível II (3) nível III (4) nível IV (5) nível V
39. Ruptura capsular (0) não (1) sim (9) não se aplica
40. Recaída (0) não (1) local (2) pescoço ipsilateral (3) pescoço contralateral (4) pulmão  
(5) outro: \_\_\_\_\_
41. Data da recaída: \_\_\_\_\_
42. Tratamento da recaída: (0) não (1) Cir (2) RT (3) QT (4) associações
43. 2º primário: (0) não (1) sim CID: \_\_\_\_\_
44. Data do 2º primário : \_\_\_\_\_
45. Tratamento do 2º primário: (0) não (1) Cir (2) RT (3) QT
46. Data da última informação: \_\_\_\_\_
47. Situação: (0) vivo sem doença (1) vivo com doença (2) morte por doença (3) morte por outra causa (4) perdido de vista (5) morte pós operatória

Telefone de contato: \_\_\_\_\_

Observações pertinentes:

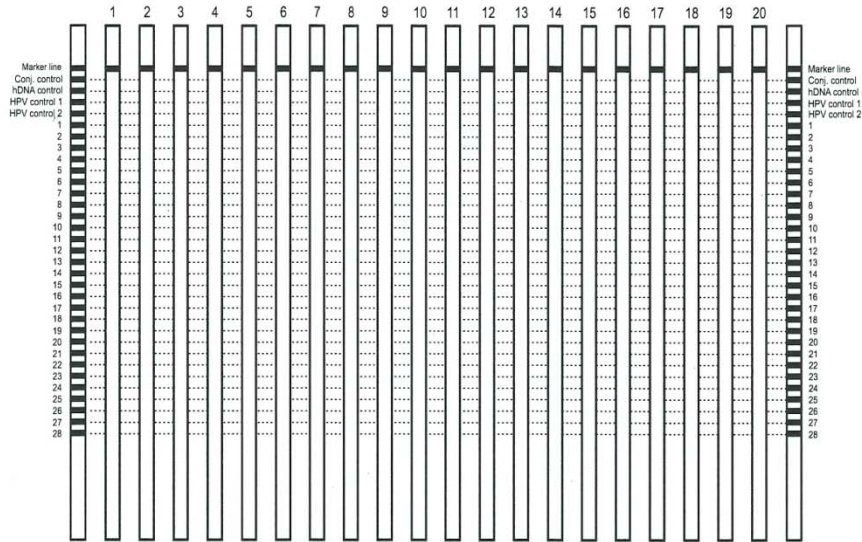
\_\_\_\_\_





# INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra*

## Data reporting sheet



LiPA Strip	Sample ID	Reactive lines	Genotyping Result	Remarks
1				
2				
3				
4				
5				
6				
7				
8				
9				
10				
11				
12				
13				
14				
15				
16				
17				
18				
19				
20				

© 2007 Innogenetics

Amplification date(s):

INNO-LiPA HPV Genotyping *Extra* date(s):

Lot no.

Lot no.

Performed by:

Approved by:



## Does elective neck dissection in T1/T2 carcinoma of the oral tongue and floor of the mouth influence recurrence and survival rates?

Natalie Kelner<sup>a</sup>, José Guilherme Vartanian<sup>a</sup>, Clóvis Antônio Lopes Pinto<sup>b</sup>,  
Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo<sup>b</sup>, Luiz Paulo Kowalski<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Head and Neck and Otorhinolaryngology Surgery, ACCamargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

<sup>b</sup> Department of Pathology, ACCamargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

Accepted 27 March 2014

Available online 17 May 2014

### Abstract

The aim of this study was to evaluate the results of elective neck dissection compared with observation (control group) in selected cases of early carcinoma of the oral tongue and floor of the mouth. It was a retrospective analysis of 222 patients who had the tumour resected (161 also had elective neck dissection). Occult lymph node metastases were detected in 33/161 (21%), and neck recurrences were diagnosed in 10 of the 61 patients in the control group (16%). Occult lymph node metastases reduced the 5-year disease-specific survival from 90% to 65% ( $p=0.001$ ) and it was 96% among the controls. The 5-year disease-specific survival was 85% in the group treated by neck dissection and 96% in the observation group ( $p=0.09$ ). Rigorous follow-up of selected low risk patients is associated with high rates of salvage, and overall survival was similar to the observed survival in patients treated by elective neck dissection. Observation is a reasonable option in the treatment of selected patients.

© 2014 The British Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

**Keywords:** Oral cancer; Squamous cell carcinoma; Early stage; Lymph nodes; Elective neck dissection

### Introduction

Oral squamous cell carcinoma (SCC) is characterised by a high risk of metastases to lymph nodes in the neck.<sup>1</sup> The metastatic spread of these tumours usually occurs through the lymphatic system in the neck, at levels I–III.<sup>2,3</sup>

The incidence of occult lymph node metastases in early oral SCC ranges from 14% to 45%, and is higher in tumours of the tongue and floor of the mouth.<sup>4–7</sup> The presence of pathological lymph node metastases is the most important prognostic factor, and it reduces survival in patients with oral SCC.<sup>4,8–13</sup> Computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), ultrasonography (US), and positron emission tomography-CT (PET-CT) are used to detect neck metastases, but none can detect all micrometastases.<sup>5,11,14,15</sup>

The high incidence of occult metastases is the most important argument in favour of elective neck dissection in oral cancer. However, the functional and cosmetic side effects, morbidity, and costs argue against it.<sup>15,16</sup> It is recommended only in patients with an estimated risk of metastases of more than 20%.<sup>8</sup>

\* Corresponding author at: Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, ACCamargo Cancer Center, Rua Professor Antônio Prudente, 211, São Paulo, SP CEP: 01509-900, Brazil.  
Tel.: +55 1121895172.

E-mail addresses: [nataliekelner@yahoo.com.br](mailto:nataliekelner@yahoo.com.br) (N. Kelner), [jgvartanian@uol.com.br](mailto:jgvartanian@uol.com.br) (J.G. Vartanian), [coipinto@uol.com.br](mailto:coipinto@uol.com.br) (C.A.L. Pinto), [claumcc@terra.com.br](mailto:claumcc@terra.com.br) (C.M. Coutinho-Camillo), [lp\\_kowalski@uol.com.br](mailto:lp_kowalski@uol.com.br) (L.P. Kowalski).

We know of only a few prospective randomised studies that have evaluated the benefit of elective neck dissection. One randomised study compared it with therapeutic neck dissection in T1-T3N0M0 SCC of the oral tongue and floor of the mouth.<sup>17</sup> Another compared elective ipsilateral radical neck dissection with observation in T1-T2N0M0 SCC of the oral tongue.<sup>18</sup> These two studies showed no survival benefit of neck dissection. One randomised study that compared elective supraomohyoid neck dissection with observation in T1-T2N0 SCC of the tongue and the floor of the mouth did show that selective neck dissection was of significant benefit,<sup>19</sup> but a recent randomised study compared selective elective neck dissection with observation in early oral tongue carcinoma, and found similar results in the two groups.<sup>20</sup>

The aim of the present study was to evaluate the results of elective neck dissection compared with observation in selected cases of early-stage SCC of the oral tongue and floor of the mouth.

## Patients and methods

A total of 222 patients with early stage (clinical T1/T2N0M0) SCC of the oral tongue and floor of the mouth were identified from a database of patients who were treated surgically at ACCamargo Cancer Center between 1980 and 2010. None of the patients had previously been treated, and they all had a preoperative clinical diagnosis of no invaded nodes in the neck. Nodal metastases were identified by physical examination. The patients treated after 1990 also had CT or MRI. All patients had a pathological T1 or T2 SCC of the oral tongue and floor of the mouth and were initially treated surgically. All microscopic slides were reviewed. This study was approved by the Hospital Research Ethics Committee.

Since 1980, all patients who were considered to be at high risk of occult metastases were treated by elective neck dissection (Fig. 1). The decision was based on the following criteria: if at initial evaluation the lesion presented with signs of infiltration and the clinically estimated thickness was more than 3 mm, or there were adverse pathological features in the biopsy (such as perineural invasion or vascular embolisation), the elective neck dissection was done at the same time as the resection of the primary tumour. If the macroscopic lesion was present with a thickness estimated on palpation of less than 3 mm (superficial) and no adverse pathological features were detected in the biopsy specimen, the patient was observed. However, those patients who were not initially thought to require neck dissection, but who did have adverse pathological findings in the operative specimen, were treated by neck dissection between 2 and 4 weeks of the initial operation.

In general, patients whose necks would require reconstruction had larger or more infiltrating tumours and for these reasons were candidates for neck dissection. It was also indicated in low-risk cases with superficial but large lesions that

also required reconstruction. A total of 68 patients required reconstruction, 66 of whom had a neck dissection.

The patients with low-risk tumours were treated only by resection of the primary tumour, and the neck was followed-up with palpation. Since the 1990s CT or MRI has been done every 6 months for at least 2 years.

The surgeon together with the radiation oncologist decided whether the patient required postoperative radiotherapy (RT), and the criteria that they used included the presence of pathologically invaded lymph nodes, the presence of extracapsular nodal extension or perineural invasion, and surgical margins of less than 0.5 cm.

The data were evaluated with the aid of IBM SPSS Statistics for Windows (version 20, IBM Corp, Armonk NY, USA). Overall survival was calculated from the date of operation to the date of the last follow-up or death. Disease-specific survival was calculated from the date of operation to the date of death from SCC of the tongue or floor of the mouth. The survival curves were plotted using the Kaplan–Meier method and were compared using the log rank test. Probabilities of less than 0.05 were accepted as significant.

## Results

A total of 222 patients were eligible for the analyses, and Table 1 shows their clinicopathological characteristics. The clinically clear necks were treated by observation in 61 patients and elective neck dissection in 161. Of the 161, the dissection was unilateral in 136 cases. Twenty-five patients who had primary tumours that approached or crossed the midline, had bilateral dissection. Two patients had it as a secondary procedure because of the risk of occult nodal metastases. Of the 222 patients, 58 (26%) had postoperative RT to the site of primary resection and to the neck (Fig. 2).

The mean number of dissected lymph nodes was 38 (range 9–108). Thirty-three of the 161 patients who had elective neck dissection had pathologically invaded nodes (21%). Of the 33, 29 (88%) had clinically T2 SCC, whereas the other 4 patients (12%) had clinically T1 lesions. The overall rates of occult nodal metastases in clinically T1 and T2 cases were 4/32 (13%) and 29/129 (23%), respectively. Most patients with pathologically invaded nodes had only a single involved node ( $n = 22$ , 67%), whereas four patients had more than 2 (pN2b). Most patients with pathologically invaded nodes had metastasis in level II ( $n = 19$ , 58%) or level I ( $n = 8$ , 24%) nodes. Five patients had metastasis at both levels I and II (15%). No patient had pathologically invaded nodes at levels IV or V. Extracapsular spread was present in 4/33 pathologically invaded nodes (12%).

Among the 33 patients with pathologically invaded nodes, 27 had postoperative RT to the neck. Of these, one developed ipsilateral recurrence in the neck but it was successfully treated, and one patient developed an ipsilateral locoregional recurrence, which was treated by chemotherapy, but died



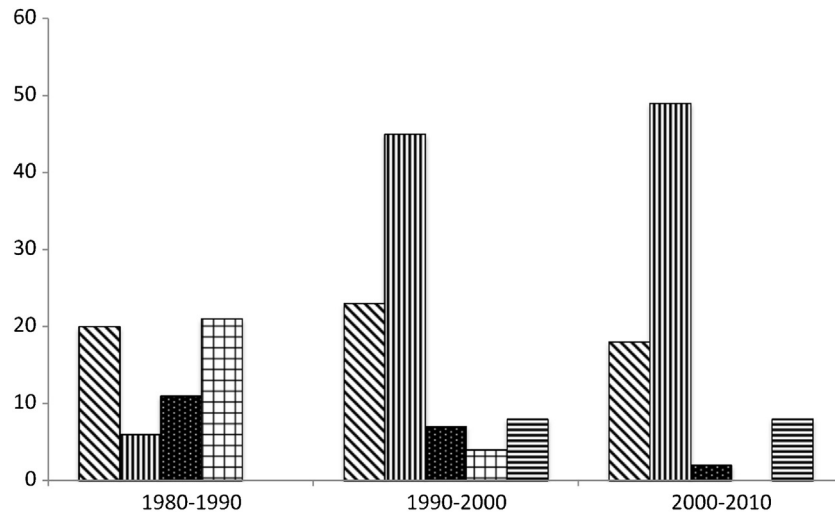


Fig. 1. Type of elective neck dissection according to decades. Columns from left to right refer to: no neck dissection; supraomohyoid; radical modified; radical and selective (I–IV).

of the disease. Of the remaining 6 patients who did not have postoperative RT, 2 subsequently developed ipsilateral recurrences in the neck during the first year after neck dissection and died of their disease (Fig. 2).

The sites of recurrence of the tumours and the treatments are shown in Table 2. Fig. 2 shows an algorithm of the patients who were stratified according to neck dissection, pathological nodal status, postoperative RT, and ipsilateral recurrence in the neck.

Nine of the 61 patients in the observation group developed recurrences in the ipsilateral neck (15%), which was higher than that in the neck dissection group (11/161, 7%) ( $p=0.06$ ). Of the 9 patients with recurrences in the ipsilateral neck in the observation group, 8 had a further resection (Table 2).

Regional ipsilateral or contralateral recurrences occurred in 29 patients. Of these recurrences, 8 were clinically T1 and 21 were T2 SCC. The median time from the initial treatment to a regional recurrence was 9.47 months (range 2–79) months. The further treatment consisted of operation with RT ( $n=14$ ); operation, RT, and chemotherapy ( $n=4$ ); operation alone ( $n=3$ ), or RT alone ( $n=1$ ). Two patients were given palliative treatment with chemotherapy, 2 with radiotherapy and chemotherapy, and 3 had no treatment for their recurrence; these 7 patients died of their disease.

When the effect of the neck treatment on regional control was assessed, the patients with local recurrence were excluded, because the nodal spread could have occurred after the initial treatment. Four patients in the observation group developed ipsilateral neck recurrence alone, 3 of them were

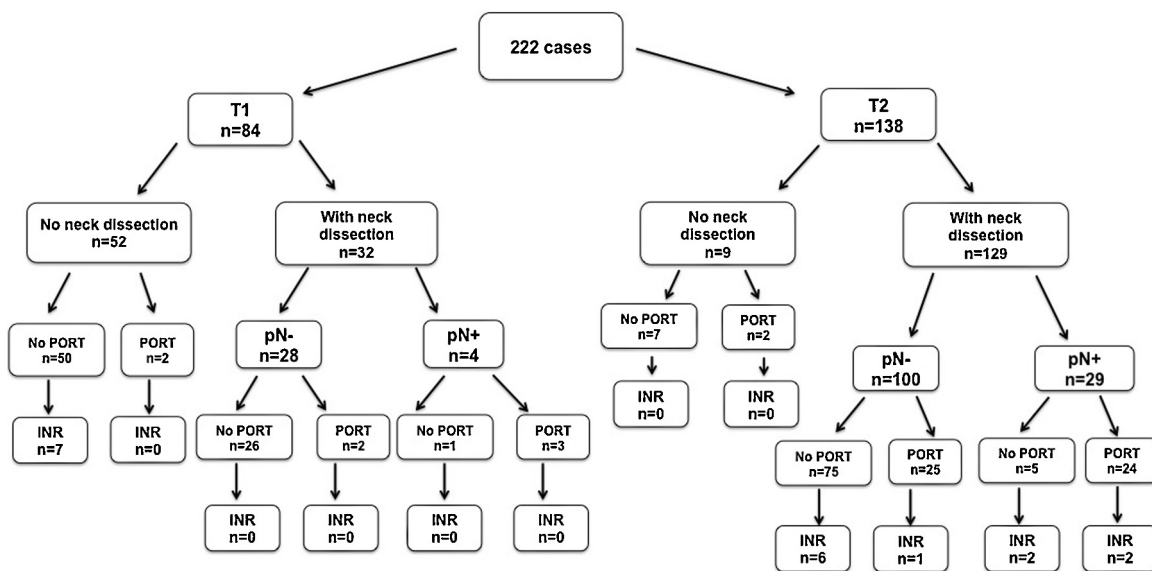


Fig. 2. Algorithm showing the management of patients with early carcinoma of the oral tongue and floor of mouth stratified according to the clinical stage of the tumour (T), neck dissection, pathological state of lymph nodes (pN), and ipsilateral recurrence in the neck (INR).

Table 1

Clinicopathological characteristics of patients with early stage carcinoma of the oral tongue and the floor of the mouth ( $n=222$ ). Data are number of patients.

Variable	Observation ( $n=61$ )	Elective neck dissection ( $n=161$ )	Total ( $n=222$ )	$p$ value
Median (range) age (years)	58 (28–83)	58 (21–85)	58 (21–85)	0.74
Sex				
Male	41	120	161	0.28
Female	20	41	61	
Tobacco				
Yes	41	122	163	0.371
No	17	35	52	
Not recorded	3	4	7	
Alcohol				
Yes	36	112	148	0.32
No	22	44	66	
Not recorded	3	5	8	
Site of tumour				
Oral tongue	53	115	168	0.017
Floor of the mouth	8	46	54	
Clinical stage of tumour				
cT1	52	32	84	<0.001
cT2	9	129	138	
Thickness (mm)				
<3	26	22	48	<0.001
3 or more	22	118	140	
Not recorded	13	21	34	
Histological grade				
1	37	71	108	<0.001
2	14	66	80	
3	2	22	24	
Not recorded	8	2	10	
Perineural invasion				
Yes	7	42	49	0.007
No	31	87	118	
Not recorded	23	32	55	
Type of neck dissection				
SOHND (I–III)	–	100	100	–
MRND	–	20	20	
RND	–	25	25	
SND (I–IV)	–	16	16	
Pathological status of nodes				
Clear	–	128	128	–
Invaded	–	33	33	

SOHND, supraomohyoid neck dissection; MRND, modified radical neck dissection; RND, radical neck dissection; SND, selective neck dissection.

operated on and had postoperative RT, and all 3 are alive. Five patients in the neck dissection group developed ipsilateral nodal recurrence, and they were operated on with curative intent, but only 2 remained alive without recurrent cancer (Table 2). Of the 25 patients who had bilateral neck dissection, 7 developed recurrences; in 4 they were local, in 2 ipsilateral, and 1 had a locoregional ipsilateral recurrence.

The median follow-up period was 68.7 months (6–282). A total of 74 patients died of causes unrelated to cancer during follow-up, and 31 died of their disease. Overall, 111 patients were alive at the last follow-up, and 6 were lost to follow-up (range 6–57 months).

The presence of occult, pathologically-invaded nodes decreases the disease-specific survival from 90% to 65% in 5 years (Fig. 3). The 5-year disease-specific survival was 96% in the observation group and 85% in the neck dissection group ( $p=0.09$ ) (Fig. 4). The 5-year disease-specific survival for clinical T1 SCC was higher than that of clinical T2 SCC (94% and 84%, respectively,  $p=0.01$ ).

The 5-year overall survival was 77% in the observation group and 70% in the neck dissection group ( $p=0.4$ ). In the observation group the 5-year disease-free survival was 79%, and 74% in the neck dissection group ( $p=0.88$ ). The 5-year disease-free survival of the patients with a regional recurrence

Table 2  
Patterns of recurrence, salvage treatment, and outcome. Data are number, or number (%).

Site of recurrence	Elective neck dissection (n = 161)	Observation (n = 61)	Total (n = 222)
Local alone	24 (15)	8 (13)	32 (14)
Neck alone (regional recurrence)	9 (6)	5 (8)	14 (6)
Ipsilateral alone	5	4	9
Neck salvage treatment	5	3	8
No evidence of disease	2	3	5
Contralateral alone:	4	0	4
Neck salvage treatment	4	0	4
No evidence of disease	4	0	4
Bilateral	0	1	1
Neck salvage treatment	0	1	1
No evidence of disease	0	1	1
Local and neck	8 (5)	4 (7)	12 (5)
Local and ipsilateral	4	2	6
Salvage treatment	4	2	6
No evidence of disease	0	2	2
Local + contralateral	4	1	5
Salvage treatment	2	1	3
No evidence of disease	2	1	3
Local and bilateral neck	0	1	1
Salvage treatment	0	1	1
No evidence of disease	0	1	1
Ipsilateral neck and distant	2 (1)	1 (2)	3 (1)
Salvage treatment	2	1	3
No evidence of disease	0	0	0
Distant alone	1 (1)	0	1 (<1)
Salvage treatment	1	0	1
No evidence of disease	0	0	0
Total recurrences	44 (27)	18 (30)	62 (28)
Total salvage treatment			
Yes	40/44 (91)	17/18 (95)	57/62 (92)
No	4/44 (9)	1/18 (6)	5/62 (8)
No evidence of disease	18/44 (41)	13/18 (72)	31/62 (50)

was 86%. This was 84% in the observation group and 87% in the neck dissection group ( $p=0.46$ ).

The 5-year overall survival of patients who had neck dissection and who also had occult pathologically invaded nodes ( $n=33$ ) was 58%, which did not differ significantly from that of patients in the observation group who developed a regional recurrence ( $n=10$ , 69%,  $p=0.85$ ).

There was no association between the site of the tumour and regional recurrence ( $p=0.51$ ), lymph node metastases ( $p=0.66$ ), overall survival ( $p=0.39$ ) and disease-specific survival ( $p=0.27$ ).

## Discussion

Elective neck dissection, biopsy of the sentinel lymph node, and an observation policy are the options for the treatment of the neck in early oral SCC, because none of the imaging examinations can detect all the micrometastases in neck lymph nodes.<sup>5,11,14,15</sup> The technique of sentinel lymph node

biopsy is based on the unique lymphatic drainage patterns of each patient. Experienced groups have reported that it has good sensitivity in identifying occult metastases in the neck, may prevent overtreatment (neck dissection) of patients who are staged pathologically as clear, and reduce the morbidity associated with neck dissection. However, sentinel lymph node biopsy is still used, and several issues require further investigation.<sup>21</sup>

Elective neck dissection in patients with no clinically involved nodes in the neck has been proposed by many authors because of the high risk of nodal recurrence in an untreated neck, and the accuracy of this procedure for staging. The pathological information is important to guide the subsequent use of adjuvant treatment.<sup>1,7,13</sup> However, neck dissection may be unnecessary for some patients, and there is a risk of functional morbidity of the shoulder. In contrast, few studies have shown that observation could result in the same survival as neck dissection.<sup>17,18,20,22</sup> Observation may not be safe, because delayed diagnosis of cervical metastases increases the risk of extracapsular spread and involvement

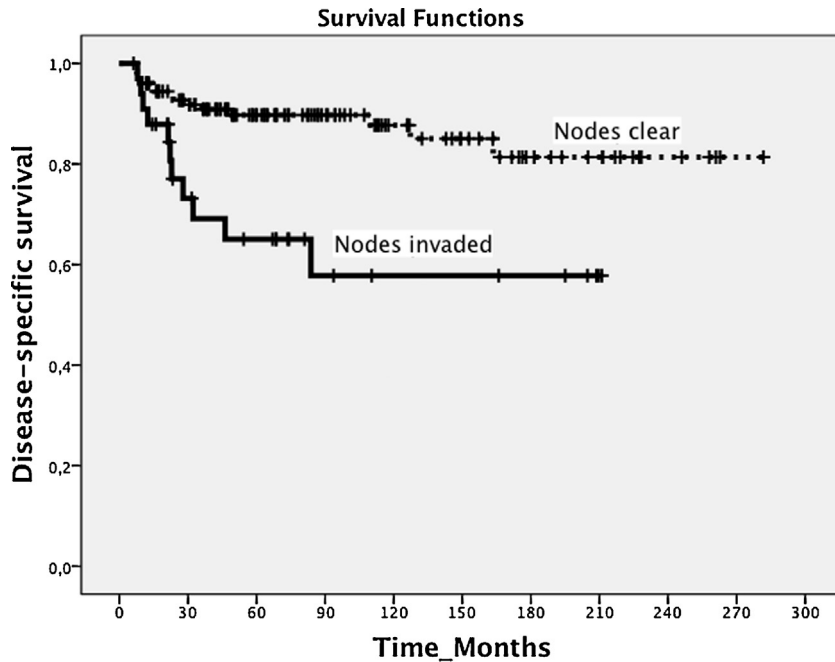


Fig. 3. Survival curves showing pathologically clear nodes, and invaded nodes. Censored deaths are indicated by vertical lines.

of multiple nodes at the time of reoperation. These adverse pathological findings are associated with reduced survival.<sup>19</sup>

Elective neck dissection is advocated for most cancers of the tongue and floor of the mouth, except for early stage (clinical T1) superficial tumours.<sup>7,13</sup> In most hospitals the decision to treat the neck electively is based on the risk of occult lymph node involvement that is associated with a thickness of tumour of more than 3 mm (a risk over 20%). In the

present series, the median thickness in observation group was 2.7 mm (range 0.5–10 mm) and 7.0 mm (range 0.95–30 mm) in the neck dissection group ( $p < 0.001$ ).

The incidence of occult metastases in the cervical lymph nodes after surgical treatment ranges from 14% to 42%. In our study the incidence of occult metastases was 21%, which is similar to that reported by others.<sup>6,13,19,22</sup> Most patients with pathologically invaded nodes had only a single involved node, and levels I and II were the most common sites. There

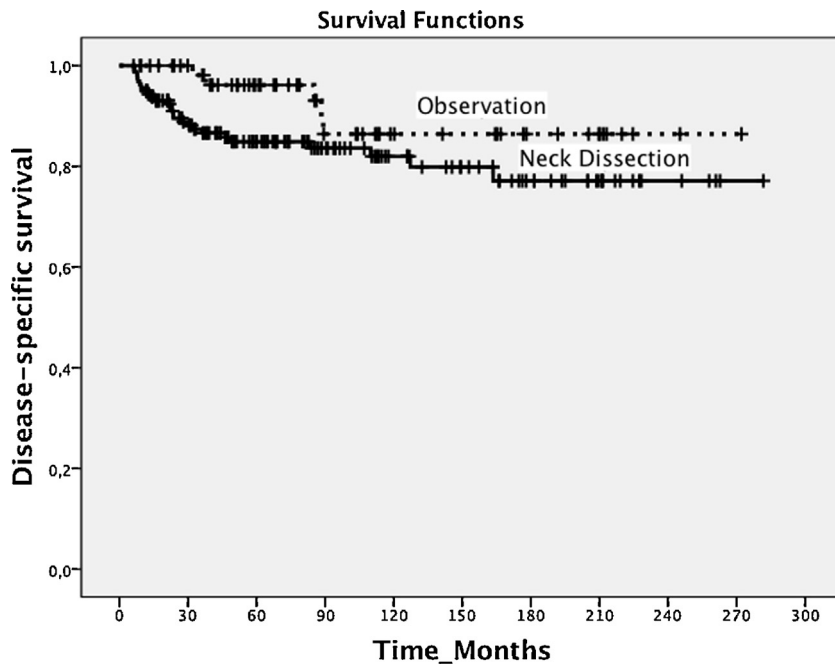


Fig. 4. Survival curves showing the observation (control) group and the group treated by neck dissection. Censored deaths are indicated by vertical lines.



was no association between site of tumour or T-stage with lymph node metastases.

The status of the clinically invaded neck is an important determinant of survival in head and neck cancers. Our results support this finding even when metastases were occult. Because the status of the neck has a serious impact on outcome, treatment of the neck is an important aspect in the management of these patients.

The main cause of failure in early-stage oral cancer is locoregional recurrence. In the present study local recurrence (14%) and recurrence in the neck (13%) were similar to those reported elsewhere.<sup>13,23</sup> The effect of extranodal spread is evident in recurrences in the neck and distant metastases.<sup>9</sup> In this study, 4 patients had extranodal spread. These patients were given postoperative RT (6040–6600 cGy).

The difference in the ipsilateral regional failure rate between the neck dissection group (5/161, 3%) and the observation group (4/61, 7%) was not significant ( $p = 0.26$ ).

All 25 tumours that crossed the midline were treated with bilateral neck dissection. The contralateral side of the neck is a common and potentially preventable site of recurrence in tumours of the oral cavity.<sup>24</sup>

The overall and disease-specific survivals were similar for both treatments. However, most patients in the observation group (85%) had clinical-stage T1 primary tumours, whereas most patients in the neck dissection group (81%) had stage T2 tumours, which is predictable in a retrospective series. Our groups were well selected, and the eligibility criteria were restricted, so our observation group was highly selected with favourable clinicopathological characteristics, and therefore had a better prognosis, with better survival, fewer recurrences, and higher chances of cure.

For low risk patients, close monitoring with the early detection of recurrence and repeat operation is essential. The rigorous clinical and radiological follow-up reflects the cure rates and the similar overall survival in this study. The observation policy is reasonable for appropriately selected patients.

### Conflict of interest statement

No conflict of interest.

### Contract grant sponsors

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), number: 2011/03507-3.

### Ethics statement/confirmation of patient permission

This study was approved by the Hospital Research Ethics Committees (reference number 1528/11).

### References

1. Yuen AP, Wei WI, Wong YM, et al. Elective neck dissection versus observation in the treatment of early oral tongue carcinoma. *Head Neck* 1997;**19**:583–8.
2. Shah JP, Candela FC, Poddar AK. The patterns of cervical lymph node metastases from squamous carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1990;**66**:109–13.
3. Woolgar JA. Detailed topography of cervical lymph-node metastases from oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1997;**26**:3–9.
4. Brazilian Head and Neck Cancer Study Group. Results of a prospective trial on elective modified radical classical versus supraomohyoid neck dissection in the management of oral squamous carcinoma. *Am J Surg* 1998;**176**:422–7.
5. Okamoto M, Nishimine M, Kishi M, et al. Prediction of delayed neck metastasis in patients with stage I/II squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Pathol Med* 2002;**31**:227–33.
6. Pimenta Amaral TM, Da Silva Freire AR, Carvalho AL, 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* 2004;**40**:780–6.
7. Thiele OC, Seeberger R, Flechtenmacher C, et al. The role of elective supraomohyoid neck dissection in the treatment of early, node negative oral squamous cell carcinoma (OSCC): a retrospective analysis of 122 cases. *J Craniomaxillofac Surg* 2012;**40**:67–70.
8. Kowalski LP, Medina JE. Nodal metastases. *Otolaryngol Clin North Am* 1998;**31**:621–37.
9. Leemans CR, Tiwari R, Nauta JJ, et al. Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor. *Cancer* 1994;**73**:187–90.
10. Dias FL, Kligerman J, Matos de Sá G, et al. Elective neck dissection versus observation in stage I squamous cell carcinomas of the tongue and floor of the mouth. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;**125**:23–9.
11. Lim SC, Zhang S, Ishii G, et al. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res* 2004;**10**:166–72.
12. Ferlito A, Rinaldo A, Silver CE, et al. Neck dissection: then and now. *Auris Nasus Larynx* 2006;**33**:365–74.
13. Ganly I, Patel S, Shah J. Early stage squamous cell cancer of the oral tongue-clinicopathologic features affecting outcome. *Cancer* 2012;**118**:101–11.
14. Castelijns JA, van den Brekel MW. Imaging of lymphadenopathy in the neck. *Eur Radiol* 2002;**12**:727–38.
15. Kowalski LP, Sanabria A. Elective neck dissection in oral carcinoma: a critical review of the evidence. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2007;**27**:113–7.
16. Kowalski LP. Results of salvage treatment of neck in patients with oral cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;**128**:58–62.
17. Vandenbrouck C, Sancho-Garnier H, Chassagne D, et al. Elective versus therapeutic radical neck dissection in epidermoid carcinoma of the oral cavity: results of a randomized clinical trial. *Cancer* 1980;**46**:386–90.
18. Fakhri AR, Rao RS, Borges AM, et al. Elective versus therapeutic neck dissection in early carcinoma of the oral tongue. *Am J Surg* 1989;**158**:309–13.
19. Kligerman J, Lima RA, Soares JR, et al. Supraomohyoid neck dissection in the treatment of T1/T2 squamous cell carcinoma of oral cavity. *Am J Surg* 1994;**168**:391–4.
20. Yuen AP, Ho CM, Chow TL, et al. Prospective randomized study of selective neck dissection versus observation for N0 neck of early tongue carcinoma. *Head Neck* 2009;**31**:765–72.

21. Civantos FJ, Stoeckli SJ, Takes RP, et al. What is the role of sentinel lymph node biopsy in the management of oral cancer in 2010? *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010;**267**:839–44.
22. D’Cruz AK, Siddachari RC, Walvekar RR, et al. Elective neck dissection for the management of the N0 neck in early cancer of the oral tongue: need for a randomized controlled trial. *Head Neck* 2009;**31**:618–24.
23. Yuen AP, Lam KY, Chan AC, et al. Clinicopathological analysis of elective neck dissection for N0 neck of early oral tongue carcinoma. *Am J Surg* 1999;**177**:90–2.
24. Kowalski LP, Bagietto R, Lara JR, et al. Factors influencing contralateral lymph node metastasis from oral carcinoma. *Head Neck* 1999;**21**:104–10.

## Activin A immunoexpression as predictor of occult lymph node metastasis and overall survival in oral tongue squamous cell carcinoma

Natalie Kelner, DDS, MS,<sup>1</sup> Priscila Campioni Rodrigues, DDS, MS,<sup>2</sup> Andreia Bufalino, DDS, PhD,<sup>2</sup> Felipe Paiva Fonseca, DDS, MS,<sup>2</sup> Alan Roger dos Santos-Silva, DDS, PhD,<sup>2</sup> Marcia Cristina Costa Miguel, DDS, PhD,<sup>2,3</sup> Clóvis Antonio Lopes Pinto, MD, PhD,<sup>4</sup> Adriana Franco Paes Leme, DDS, PhD,<sup>5</sup> Edgard Graner, DDS, PhD,<sup>2</sup> Tuula Salo, DDS, PhD,<sup>6</sup> Luiz Paulo Kowalski, MD, PhD,<sup>1</sup> Ricardo D. Coletta, DDS, PhD<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, <sup>2</sup>Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry, State University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil, <sup>3</sup>Department of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal-RN, Brazil, <sup>4</sup>Department of Pathology, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, <sup>5</sup>Laboratório Nacional de Biociências, Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, SP, Brazil, <sup>6</sup>Department of Diagnostics and Oral Medicine, Institute of Dentistry and Oulu University Hospital, University of Oulu, and Institute of Dentistry, University of Helsinki, Finland.

Accepted 10 February 2014

Published online 00 Month 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI 10.1002/hed.23627

**ABSTRACT:** *Background.* The presence of regional lymph node metastasis has an important impact on clinical management and prognostication of patients with oral tongue squamous cell carcinoma (SCC). Approximately 30% to 50% of patients with oral tongue SCC have regional metastasis at diagnosis, but the limited sensibility of the current diagnostic methods used for neck staging does not allow detection of all cases, leaving a significant number of undiagnosed metastasis (occult lymph node metastasis). In this study, we evaluated whether clinicopathologic features and immunohistochemical detection of carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) and activin A could be predictive markers for occult lymph node metastasis in oral tongue SCC.

*Methods.* One hundred ten patients with primary oral tongue SCC, who were classified with early stage tumor (stage I and II) and received surgical treatment with elective neck dissection, were enrolled in the study.

*Results.* Among all examined features, only high immunohistochemical expression of activin A was significantly associated with presence of occult lymph node metastasis ( $p = .006$ ). Multivariate survival analysis using the Cox proportional hazard model showed that the expression of activin A was an independent marker of reduced overall survival with a 5-year survival of 89.7% for patients with low expression compared to 76.5% for those with high expression (hazard ratio [HR], 2.44; 95% confidence interval [CI], 1.55–3.85;  $p = .012$ ).

*Conclusion.* Our results demonstrated that immunodetection of activin A can be useful for prognostication of oral tongue SCC, revealing patients with occult lymph node metastasis and lower overall survival. © 2014 Wiley Periodicals, Inc. *Head Neck* 00: 000–000, 2014

**KEY WORDS:** oral tongue squamous cell carcinoma, clinicopathological features, activin A, carcinoma-associated fibroblast, prognosis

## INTRODUCTION

Oral tongue squamous cell carcinomas (SCCs) are locally aggressive and frequently show lymph node metastasis at diagnosis. Regional lymph node metastasis is considered the most reliable marker for therapy and prognosis of oral tongue SCC, and the knowledge of this prognostic factor before treatment is essential in determining the best therapeutic choice for the patient. However, independent of the neck staging method, the indices of occult neck lymph

node metastasis are high (20% to 30%) in patients with oral tongue SCC, significantly influencing its treatment and prognosis.<sup>1</sup> Although a variety of clinical, histopathologic, and biological markers have been proposed as predictive of occult lymph node metastasis in oral tongue SCC, none of them has yet to impact on routine clinical care.<sup>2</sup>

Previous studies have demonstrated that increased density of carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) in the stroma of oral tongue SCC correlated with lymph node metastasis and higher mortality.<sup>3–5</sup> In a recent study, we demonstrated that CAFs, indicating myofibroblast transdifferentiation, promote tumorigenesis of oral tongue SCC cell lines via upregulation of activin A, a member of the transforming growth factor- $\beta$  superfamily of proteins.<sup>6</sup> Interestingly, overexpression of activin A in all stages of various oral SCCs was associated with increased regional lymph node metastasis and lower disease-free and overall survivals.<sup>7</sup> Therefore, the purpose of this study was to determine whether the presence of CAFs and the expression of activin A, as well as clinicopathological features, are predictive for occult lymph node metastasis in early stage oral tongue SCC. In the present study, we provide evidence that

\*Corresponding author: R. D. Coletta, Department of Oral Diagnosis, School of Dentistry, State University of Campinas, CEP 13414-018, Piracicaba, São Paulo, Brazil. E-mail: coletta@fop.unicamp.br

Contract grant sponsor: This work was supported by grants from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, São Paulo, Brazil (2011/00691-7) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq, Brasília, Brazil (302464/2011-5). N. Kelner received a scholarship grant from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo-FAPESP, São Paulo, Brazil (2011/03507-3).

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

immunohistochemical expression of activin A is a marker of occult lymph node metastasis and shortened overall survival in patients with early stage oral tongue SCC.

## MATERIALS AND METHODS

### Samples

One hundred ten patients with primary oral tongue SCC, who were classified with clinically early stage tumor (stage I: T1N0M0 or stage II: T2N0M0) and received surgical treatment with elective neck dissection in the Department of Head and Neck Surgery and Otorhinolaryngology, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil, from 1980 to 2010, were enrolled in the study. For clinical stage, patients were systematically examined, including neck palpation and a cervical CT examination to warrant N0 classification, and chest X-ray or CT scan were performed to determine the presence of distant metastasis. CT scan was introduced in the routine of oral cancers initial examination in the early 1990s. In this institute, elective neck dissection is applied in patients with high-risk for occult metastasis, which is based on location in the posterior portion of the tongue or thickness >3 mm.<sup>8</sup> Radical neck dissection was performed until the 1990s and thus replaced for supraomohyoid dissection thereafter. The study was approved by the Ethics Committee of the A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil.

### Histological risk model, depth of invasion, and margin status

Tissue blocks, including those of the tumors and cervical lymph nodes, were retrieved and new sections were stained with hematoxylin-eosin. Small lymph nodes showing capsule integrity were cut in half, whereas large lymph nodes or those with signs of tumor involvement were cut in several sections (2- to 3-mm sections) before histological processing. Presence of tumor cells in the lymph nodes, regardless of size, was classified as regional metastasis. All slides were assessed independently by 3 investigators who were blinded to clinicopathologic data and outcomes and any disagreement was settled by discussion. Tumors were scored regarding worst pattern of invasion, lymphocytic infiltrate, and perineural invasion, and classified according to the histological risk model proposed by Brandwein-Gensler et al.<sup>9</sup> Each slide was scanned using the Aperio Scanscope (Aperio Technologies, Vista, CA) and the depth of tumor invasion (tumor thickness) and the distance from resection margin were measured using the software Image Scope (Aperio Technologies). Depth of invasion represented the distance from the tumor surface to the deepest area of the tumor, and the cutoff value of 5 mm was used to categorize the tumors into 2 groups.<sup>10</sup> The distance from surgical margin, identified as the closest distance between the deepest portion of the tumor and the surgical resection edge, was categorized into 2 groups based on cutoff value of 5 mm, as previously described.<sup>10</sup>

### Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on 3- $\mu$ m tissue sections using the avidin-biotin-peroxidase complex method. In

essence, sections were deparaffinized and dehydrated using a graded series of ethanol. Sections were then subjected to antigen retrieval with 0.01 M citrate buffer pH 6.0 in an electric pressure cooker and incubation with 3% aqueous hydrogen peroxide for 15 minutes to quench endogenous peroxidase. The sections were incubated with monoclonal mouse anti- $\alpha$ -smooth muscle actin diluted 1:400 (Dako, Carpinteria, CA) or rabbit anti-activin A diluted 1:50 (R&D Systems, Minneapolis, MN), followed by the labeled streptavidin-biotin detection system (Dako). Reactions were developed by incubating the sections with 0.6 mg/mL 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) containing 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and counterstained with Mayer's hematoxylin. The control reactions were performed by the exclusion of the primary antibodies.

The presence of  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells (CAFs) was classified as negative, scanty, or abundant, as described by Kellermann et al.<sup>3</sup> in a blinded analysis performed by 3 of the authors. Two different areas of the tumor were analyzed: the stroma within the tumor, defined as the overall area for the purposes of this study, and the deep invasive tumor front, defined as tumor front, which represented the band of tissue between the invasive tumor front and adjacent normal tissue. For statistical purposes, negative and scanty samples were lumped together and compared with samples classified as abundant presence of CAFs. For activin A, the expression was scored after the methods of Chang et al.<sup>7</sup> Briefly, glass slides were scanned into high-resolution images using the Aperio Scanscope CS Slide Scanner and the obtained digital images were analyzed with Pixel Count V9 algorithm (Aperio Technologies). By using specific input parameters (hue value = 0.1; hue width = 0.5; color saturation threshold = 0.04; and intensity threshold ranging from 90–180), the percentage of cytoplasm positivity was calculated and classified in 3 categories according to their intensity range as weak (from 130–180), moderate (from 105–129), and strong staining (from 90–104). Each category received an intensity score, 1 for weak, 2 for moderate, and 3 for strong staining. The final score of each tumor was calculated as the sum of the percentage of each category multiplied by their intensity scores using the following formula: [(%weak  $\times$  1) + (%moderate  $\times$  2) + (%strong  $\times$  3)]. The results ranged from 109 to 237, and the median value of 174 was used to divide tumors into 2 groups, below and above the median, exhibiting low and high activin A immunohistochemical expression, respectively.

### Statistical analysis

Correlations between presence of occult lymph node metastasis and clinicopathologic and immunohistochemical parameters of the tumors were performed by cross-tabulation and Fisher's exact test. Similarly, the immunohistochemical expression of activin A was correlated with the clinicopathologic features of the tumors. Survival curves were constructed based on the Kaplan-Meier method and compared with the log-rank test. For univariate and multivariate survival analysis, the Cox proportional hazard model was used. The level of significance considered was 5% ( $p \leq .05$ ).



**TABLE 1.** Clinicopathological and immunohistochemical correlation of the presence of occult lymph node metastasis in oral tongue squamous cell carcinomas.

Parameter	No. of patients (%) by lymph node status		<i>p</i> value
	NO	N+	
Age, y			
<58	39 (48.1)	20 (69)	.08
≥58	42 (51.9)	9 (31)	
Sex			
Male	54 (66.7)	23 (79.3)	.24
Female	27 (33.3)	6 (20.7)	
Ethnicity			
White	70 (86.4)	26 (89.7)	.76
Non-white	11 (13.6)	3 (10.3)	
Smoking habit			
No	23 (29.5)	6 (20.7)	.46
Yes	55 (70.5)	23 (79.3)	
Drinking habit			
No	31 (39.7)	5 (17.2)	.04
Yes	47 (60.3)	24 (82.8)	
Local recurrence			
No	68 (84)	21 (72.4)	.18
Yes	13 (16)	8 (27.6)	
Regional recurrence			
No	74 (91.4)	23 (79.3)	.10
Yes	7 (8.6)	6 (20.7)	
Second primary			
No	64 (79)	24 (82.8)	.79
Yes	17 (21)	5 (17.2)	
Histological risk			
Low/intermediate	55 (67.9)	10 (65.5)	.82
High	26 (32.1)	19 (34.5)	
Depth of invasion			
>5 mm	28 (38.7)	6 (22.3)	.13
<5 mm	49 (61.3)	21 (77.7)	
Distance from surgical margin			
>5 mm	77 (95.1)	26 (89.7)	.30
<5 mm	4 (4.9)	3 (10.3)	
Overall CAFs			
Negative/scanty	57 (70.4)	18 (62.1)	.48
Abundant	24 (29.6)	11 (37.9)	
Tumor front CAFs			
Negative/scanty	66 (81.5)	24 (82.8)	.87
Abundant	15 (18.5)	5 (17.2)	
Activin A expression			
Low	44 (56.4)	7 (25.9)	.006
High	34 (43.6)	20 (74.1)	

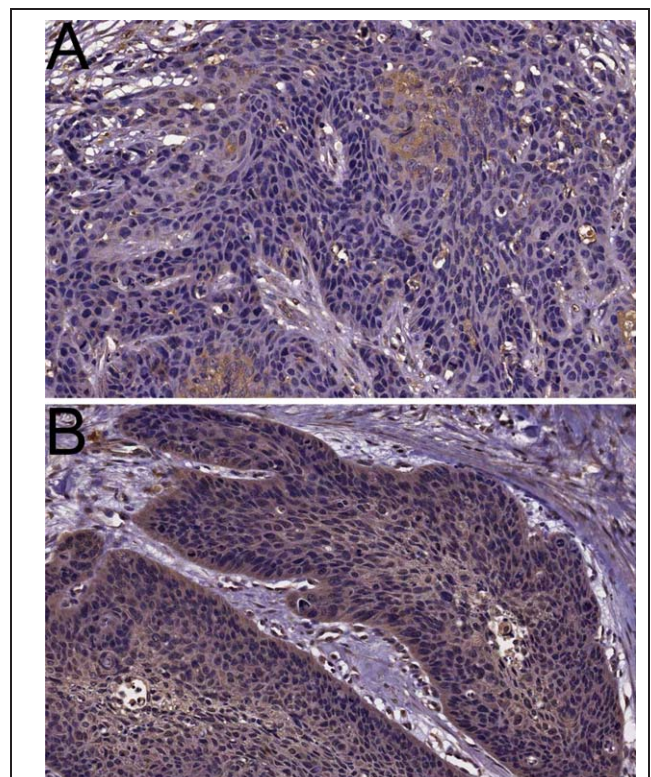
Abbreviation: CAFs, carcinoma-associated fibroblasts.

## RESULTS

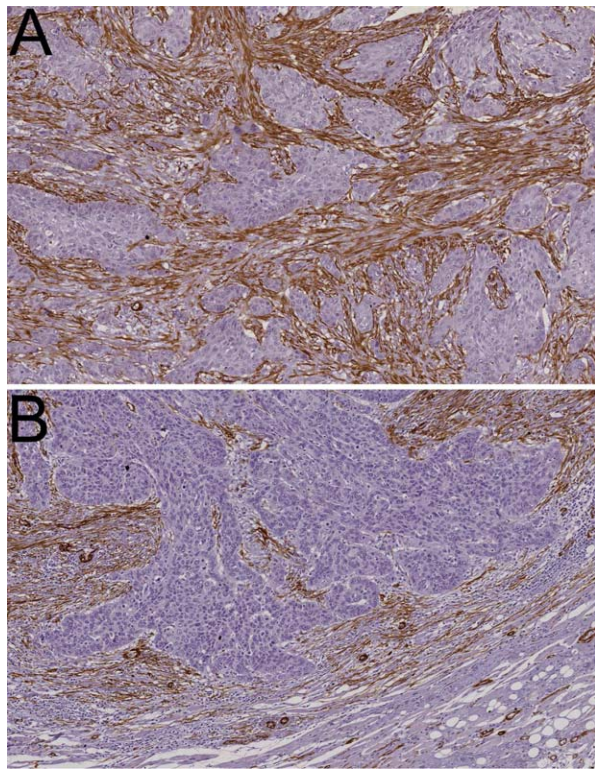
In this cohort, a male prevalence was observed (70%) and the average age was  $57.8 \pm 13.2$  years (range, 21–84 years). Most of the patients reported smoking (78 patients) and drinking alcohol (71 patients). Regarding tumor size (T classification), 19 patients were T1 (17.3%) and 91 were T2 (82.7%). There were 29 patients (26.3%) who had occult lymph node metastasis as evidenced by the presence in pathologic findings in the elective neck dissection specimens. The histological risk model based on the Brandwein–Gensler score system classified 12 tumors (10.9%) in low risk, 53 (48.2%) in intermediate

risk, and 45 (40.9%) in high risk. During follow-up, 21 patients (19%) developed local recurrence and 13 (11.8%) developed regional recurrence (11.8%). The overall survival ranged between 6 and 190 months, with a median of 42 months (mean, 51.5 months).

Dividing the tumors in relation to presence of occult lymph node metastasis, we found that high immunohistochemical expression of activin A was significantly associated with the risk of occult lymph node metastasis ( $p = .006$ ; Table 1). From tumors with occult lymph node metastasis, 74.1% ( $n = 20$ ) were classified as expressing high levels of activin A. Immunoreactivity for activin A was observed as a cytoplasmic stain with variable distribution and intensity in the tumor cells (Figure 1). Immunopositivity was also found in scattered stromal cells, including inflammatory cells, CAFs, and endothelial cells. Presence of occult lymph node metastasis was not associated with clinical features, histological risk, or its individual parameters (data not shown), depth of invasion, distance from surgical margin, or abundance of CAFs within tumor stroma and front (Table 1). Lack of CAFs was observed in 36.4% ( $n = 40$ ) of the tumors, but all samples demonstrated positivity for  $\alpha$ -smooth muscle actin in the smooth muscle of the blood vessel walls, which worked as an internal positive control. In the tumor front, absence of CAFs was found in 45.6% ( $n = 50$ ) of



**FIGURE 1.** Immunohistochemical expression of activin A in oral tongue squamous cell carcinomas (SCCs). Representative samples scored as low (A) and high (B) are shown. Activin A was detected as a cytoplasmic immunostaining in the tumor cells, and in the stromal cells around the tumor (original magnification  $\times 200$ ). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]



**FIGURE 2.** Distribution of carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) in oral tongue squamous cell carcinomas (SCCs). CAFs, recognized by the immunohistochemical expression of  $\alpha$ -smooth muscle actin, were distributed immediately adjacent to the islands of tumor cells (A) or demarcating the invasive front of the tumor (B) (original magnification  $\times 100$ ). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

the tumor samples (Figure 2). Interestingly, depth of invasion was significantly associated with presence of CAFs ( $p = .0001$ ; Figure 3).

In the univariate analysis, sex of the patient, smoking habit, drinking habit, occult lymph node metastasis, local recurrence, regional recurrence, depth of tumor invasion, and activin A immunohistochemical expression were positively associated with lower overall survival (Table 2). Patients with high activin A expression showed a 5-year overall survival of 76.5% (95% confidence interval [CI], 15.1–87.3) compared with 89.7% (95% CI, 54.7–93.8) for patients with low activin A immunoreactivity (Figure 4). However, in the adjusted multivariate analysis, based on Cox proportion regression, only presence of occult lymph node metastasis ( $p = .009$ ), local recurrence ( $p = .003$ ), regional recurrence ( $p < .0001$ ), and immunohistochemical expression of activin A ( $p = .012$ ) remained as significant predictors of overall survival of patients with early stage oral tongue SCC (Table 2).

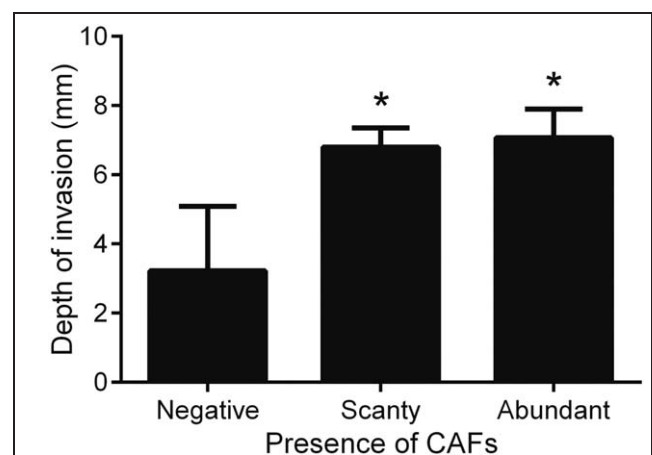
Interestingly, the predictive hazard ratio (HR) of activin A immunohistochemical expression dropped from 3.81 in the univariate analysis to 2.44 in the multivariate, suggesting the influence of other factors on determination of the activin A hazard risk. To identify possible cofounds of activin A, we determined whether activin A expression is associated with clinicopathologic features of patients

with oral tongue SCC. As depicted in Table 3, a high expression of activin A was significantly associated with regional recurrence ( $p = .01$ ), as well as presence of occult lymph node metastasis ( $p = .006$ ). Although not statistically significant, the association of activin A with histological risk reached a  $p$  value of .06 and with the presence of CAFs in the tumor front a  $p$  value of .07 (Table 3). Thus, these data show an association between activin A immunohistochemical expression and regional recurrence, and strongly suggest an important influence on survival of patients with oral tongue SCC.

## DISCUSSION

Nodal status is one of the most important prognostic factors for oral tongue SCCs and has a significant impact on survival rates. Occult lymph node metastases are frequently observed in patients with oral tongue SCC and elective neck dissection, in general, is advocated for the majority of the patients, except for those with very superficial tumors.<sup>8,11</sup> In this scenario, with a lack of strong predictive factors of lymph node disease, several patients who do not present lymph node metastasis are overtreated by neck dissection, whereas other patients may not have the neck treated but show occult neck disease. In both situations, the impact of the decision is fundamental for the patient's survival and quality of life. In this cohort, 29 patients (26.3%) clinically classified as N0 presented metastatic disease, revealing that 81 (73.7%) were overtreated by neck dissection, leaving considerable functional and esthetic sequel. The frequency of occult lymph node metastasis in this study was in the range to that reported by other studies.<sup>11–15</sup> Thus, the identification of predictive factors for occult lymph node metastasis will have a significant impact on treatment and survival of patients with oral tongue SCC.

Herein, we demonstrated that the immunohistochemical expression of activin A was significantly associated with identification of patients with occult lymph node metastasis



**FIGURE 3.** Presence of carcinoma-associated fibroblasts (CAFs) is correlated with depth of invasion. Lack of CAFs in the stroma was mainly found in tumors with shortest depth of invasion, whereas tumors with more than 5 mm of invasion demonstrated CAFs and were classified as scanty or abundant in relation to presence of CAFs.  $*p < .001$



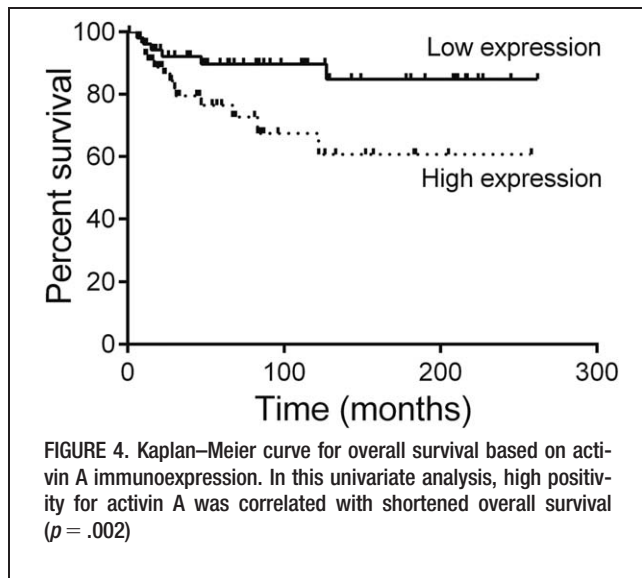
TABLE 2. Cox regression analysis for overall survival of the 110 patients with oral tongue squamous cell carcinoma.

Parameter	5-y OS (%)	HR (95% CI) / <i>p</i> value	
		Univariate	Multivariate
Age, y			
<58	81.9	Reference	Reference
≥58	83.8	0.82 (0.34–1.98) / .65	0.98 (0.64–1.51) / .48
Sex			
Male	77.3	Reference	Reference
Female	96.1	0.35 (0.14–0.89) / .03	0.71 (0.48–1.05) / .08
Ethnicity			
White	71.9	Reference	Reference
Non-white	91.6	0.49 (0.13–1.81) / .28	0.94 (0.63–1.40) / .25
Smoking habit			
No	96.3	Reference	Reference
Yes	76.4	2.74 (1.08–6.94) / .03	1.22 (0.81–1.84) / .78
Drinking habit			
No	93.1	Reference	Reference
Yes	76.6	2.46 (0.99–6.06) / .05	1.28 (0.84–1.94) / .48
Treatment			
Surgery	82.9	Reference	Reference
Surgery + radiotherapy	82.8	1.06 (0.50–3.18) / .62	1.01 (0.64–1.48) / .36
Occult lymph node metastasis			
No	88.3	Reference	
Yes	66.3	5.69 (1.94–16.73) / .001	3.07 (1.86–5.06) / .009
Local recurrence			
No	91.7	Reference	Reference
Yes	43.5	92.4 (25.2–337.9) / < .0001	5.34 (2.92–9.75) / .003
Regional recurrence			
No	88.7	Reference	Reference
Yes	37.4	97.6 (16.7–570.1) / < .0001	28.4 (13.4–60.2) / < .0001
Second primary			
No	88.2	Reference	Reference
Yes	81.5	1.08 (0.38–3.06) / .87	1.02 (0.66–1.51) / .98
Histological risk			
Low/intermediate	86.3	Reference	Reference
High	78.1	1.78 (0.73–4.59) / .19	1.34 (0.32–4.84) / .37
Depth of invasion			
>5 mm	96.9	Reference	Reference
<5 mm	74.9	3.36 (1.32–8.58) / .01	1.31 (0.77–2.25) / .31
Distance from surgical margin			
>5 mm	83.7	Reference	Reference
<5 mm	71.4	1.38 (0.26–7.23) / .44	1.23 (0.26–6.78) / .69
Overall CAFs			
Negative/scanty	83.1	Reference	Reference
Abundant	82.7	1.55 (0.59–4.04) / .36	1.19 (0.79–1.80) / .44
Tumor front CAFs			
Negative/scanty	84.7	Reference	Reference
Abundant	76.6	1.52 (0.49–4.71) / .46	1.25 (0.86–1.85) / .32
Activin A expression			
Low	89.7	Reference	Reference
High	76.5	3.81 (1.13–6.72) / .002	2.44 (1.55–3.85) / .012

Abbreviations: OS, overall survival; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; CAFs, carcinoma-associated fibroblasts.

and, more importantly, multivariate analysis showed that activin A overexpression was an independent marker for overall survival in early stage oral tongue SCC after adjusting for other prognostic factors. Activin A is a member of the transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) superfamily, and shares the same intracellular signaling pathways (Smad and mitogen-activated protein kinase) with other TGF- $\beta$  family members.<sup>16</sup> Activin A shows pleiotropic effects in many cell types including growth, differentiation, and survival, although it was initially discovered in ovarian follicu-

lar fluid as a promoter of pituitary follicle-stimulating hormones.<sup>17,18</sup> Aberrant expression of activin A has been described in several types of cancer, and recent studies have started to elucidate its causal role on tumorigenesis. In prostate cancers, overproduction of activin A by tumor cells leads to increased angiogenesis, decreased immune surveillance, and increased epithelial-to-mesenchymal transition of the tumor cells, favoring tumor progression.<sup>19</sup> Overexpression of activin A in endometrial and esophageal carcinomas and malignant pleural mesotheliomas was associated with



an induction of the proliferation via regulation of cyclin D.<sup>20-22</sup> Furthermore, activin A in the serum of patients with breast and prostate cancer with bone metastases are significantly higher than those of patients without bone metastases.<sup>23</sup> In addition, the activin A mRNA level was significantly associated with lymph node metastasis and clinical stage in esophageal carcinoma, and patients with high expression of activin A had a poor prognosis compared to those with low expression levels.<sup>24</sup>

Few studies have suggested that activin A plays a role in oral tumorigenesis. The first evidence of the participation of activin A in oral cancer came from the study of Shimizu et al<sup>25</sup> in 2007. Those authors, by using chromosomal comparative genomic hybridization and oligonucleotide microarrays in head and neck cell lines, identified the upregulation of *INHBA*, the gene encoding activin A. Further analysis demonstrated that the expression of activin A was significantly higher in tumor samples compared with matched normal samples, and its expression in tumors was associated with lymph node metastasis and shortened disease-free survival.<sup>25</sup> Later, Chang et al<sup>7</sup> confirmed that the high percentage of activin A-positive cells in oral carcinomas was significantly associated with clinicopathologic features, including N classification, tumor cellular differentiation, and presence of perineural invasion, and with worse prognosis as revealed by shortened overall and disease-free survival. Moreover, downregulation of activin A expression with small interference RNA reduced proliferation and invasion of oral cancer cells.<sup>7</sup> In the present study, a strong association between activin A expression and risk of occult lymph node metastasis was observed, and by using logistic regression analysis we were able to confirm that activin A, although in strong association with risk of regional recurrence after treatment, is an independent prognostic factors for the survival of patients with oral tongue SCC. Taken together, our results demonstrate for the first time that immunodetection of activin A is helpful as an indicator of subclinical disease of the neck, and reinforce the suggested role of activin A on tumor progression and metastasis.

After our first study demonstrating that abundant presence of myofibroblasts in oral carcinomas, particularly in the invasive tumor front, leads to a more aggressive behavior, such as shorter overall survival,<sup>3</sup> several studies attended to elucidate its role in oral cancer development and progression. In general, those studies replicated our findings revealing that high density of CAFs (myofibroblasts) is a strong predictor of poor prognosis,<sup>4,5,26-28</sup> and further showed that CAFs in the stroma of oral carcinomas may influence proliferation and invasion, resulting in a more aggressive tumor.<sup>6,29</sup> Interestingly, in line with a recent study analyzing the disease-specific survival of patients with early stage oral tongue SCC,<sup>30</sup> our findings

TABLE 3. Correlation of the clinicopathological parameters of the oral tongue squamous cell carcinomas with the immunohistochemical expression of activin A.

Parameter	No. of patients (%) by activin A expression		p value
	Low expression	High expression	
Age			
<58 y	25 (49)	32 (59.3)	
≥58 y	26 (51)	22 (40.7)	.29
Sex			
Male	33 (64.7)	40 (74.1)	
Female	18 (35.3)	14 (25.9)	.29
Ethnicity			
White	42 (82.4)	49 (90.7)	
Non-white	9 (17.6)	5 (9.3)	.20
Smoking habit			
No	15 (31.3)	13 (24.1)	
Yes	33 (68.7)	41 (75.9)	.42
Drinking habit			
No	18 (37.5)	16 (29.6)	
Yes	30 (62.5)	38 (70.4)	.40
Local recurrence			
No	43 (84.3)	41 (75.9)	
Yes	8 (15.7)	13 (24.1)	.28
Regional recurrence			
No	49 (96.1)	43 (79.6)	
Yes	2 (3.9)	11 (20.4)	.01
Second primary			
No	40 (78.4)	44 (81.5)	
Yes	11 (21.6)	10 (18.5)	.69
Histological risk			
Low/intermediate	39 (76.5)	32 (59.3)	
High	12 (23.5)	22 (40.7)	.06
Depth of invasion			
>5 mm	33 (67.3)	33 (61.1)	
<5 mm	16 (32.7)	21 (38.9)	.51
Distance from surgical margin			
>5 mm	46 (90.2)	52 (96.2)	
<5 mm	5 (9.8)	2 (3.8)	.21
Overall CAFs			
Negative/scanty	36 (70.6)	34 (63)	
Abundant	15 (29.4)	20 (37)	.41
Tumor front CAFs			
Negative/scanty	45 (88.2)	40 (74.1)	
Abundant	6 (11.8)	14 (25.9)	.07
Occult lymph node metastasis			
No	44 (86.3)	34 (63)	
Yes	7 (13.7)	20 (37)	.006

Abbreviation: CAFs, carcinoma-associated fibroblasts.



do not support the association between CAFs, either in the stroma within the tumor or in the invasive tumor front, and risk for occult lymph node metastasis or survival of patients with early stage oral tongue SCC. A possible explanation for this lack of association resides in the cross-talk between tumor cells during invasion and resident normal stroma cells. CAFs,  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cells, are not found in the stroma of normal oral mucosa and dysplastic lesions,<sup>3,31,32</sup> but it is found in approximately 60% of the oral tongue SCCs in contact with the tumor islands.<sup>3–5,27</sup> Moreover, in vitro studies demonstrated that TGF- $\beta$ 1 released by oral carcinoma cells induces myofibroblast transition,<sup>4,33</sup> suggesting that the emergence of CAFs within tumor stroma is coordinated by tumor cell invasion. In support for this hypothesis, the majority of samples classified as CAF-negative were those with the shortest depth of invasion, whereas high CAF density was found in tumors with more than 5 mm of invasion.

Many histopathologic features have been described as predictive of occult lymph node metastasis in oral tongue SCC, but none of them showed high reproducibility.<sup>34–36</sup> The grading system applied in the current study, the histologic risk model proposed by Brandwein-Gensler et al,<sup>9</sup> has demonstrated very expressive results, allowing the identification of patients with oral cancer with poor prognosis.<sup>27,37–39</sup> However, its value in predicting occult lymph node metastasis was never evaluated. Our results demonstrated that this model or its individual parameters did not correlate with the presence of lymph node metastasis. A recent study demonstrated the correlation between tumor satellite distance and the presence of occult lymph node metastasis in early stage oral tongue SCC.<sup>40</sup> Although tumor satellite is contemplated under worst pattern of invasion in the histological risk model, the number of samples in the present cohort classified as tumor satellites was very low, not allowing any further conclusion.

In closing, our study is the first to demonstrate that activin A immunodetection correlates with occult lymph node metastasis in patients with early oral tongue SCC. Furthermore, the findings of this study reinforce that the expression of activin A is an independent marker of a patient's outcome and support its potential as a prognosticator for oral tongue SCCs. A better understanding and knowledge of the biological events that precede the clinical presentation of the cervical metastatic disease can markedly increase the survival rates of patients with oral tongue SCC.

## REFERENCES

- Thompson CF, St John MA, Lawson G, Grogan T, Elashoff D, Mendelsohn AH. Diagnostic value of sentinel lymph node biopsy in head and neck cancer: a meta-analysis. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2012;270:2115–2122.
- Bello IO, Soini Y, Salo T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (II). *Oral Oncol* 2010;46:636–643.
- Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, et al. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. *Histopathology* 2007;51:849–853.
- Kellermann MG, Sobral LM, da Silva SD, et al. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. *Oral Oncol* 2008;44:509–517.
- Bello IO, Vered M, Dayan D, et al. Cancer-associated fibroblasts, a parameter of the tumor microenvironment, overcomes carcinoma-associated parameters in the prognosis of patients with mobile tongue cancer. *Oral Oncol* 2011;47:33–38.
- Sobral LM, Bufalino A, Lopes MA, Graner E, Salo T, Coletta RD. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. *Oral Oncol* 2011;47:840–846.
- Chang KP, Kao HK, Liang Y, et al. Overexpression of activin A in oral squamous cell carcinoma: association with poor prognosis and tumor progression. *Ann Surg Oncol* 2010;17:1945–1956.
- Kowalski LP, Medina JE. Nodal metastases: predictive factors. *Otolaryngol Clin North Am* 1998;31:621–637.
- Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, 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* 2005;29:167–178.
- Al-Rajhi N, Khafaga Y, El-Husseiny J, et al. Early stage carcinoma of oral tongue: prognostic factors for local control and survival. *Oral Oncol* 2000;36:508–514.
- Ganly I, Patel S, Shah J. Early stage squamous cell cancer of the oral tongue—clinicopathologic features affecting outcome. *Cancer* 2012;118:101–111.
- van den Brekel MW, Stel HV, Castelijns JA, et al. Cervical lymph node metastasis: assessment of radiologic criteria. *Radiology* 1990;177:379–384.
- Ross GL, Soutar DS, MacDonald DG, Shoaib T, Camilleri IG, Robertson AG. Improved staging of cervical metastases in clinically node-negative patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2004;11:213–218.
- Pimenta Amaral TM, Da Silva Freire AR, Carvalho AL, Pinto CA, Kowalski LP. 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* 2004;40:780–786.
- El-Naaj IA, Leiser Y, Shveis M, Sabo E, Peled M. Incidence of oral cancer occult metastasis and survival of T1-T2N0 oral cancer patients. *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69:2674–2679.
- Chen YG, Wang Q, Lin SL, Chang CD, Chuang J, Ying SY. Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. *Exp Biol Med* (Maywood) 2006;231:534–544.
- Ling N, Ying SY, Ueno N, et al. Pituitary FSH is released by a heterodimer of the beta-subunits from the two forms of inhibin. *Nature* 1986;321:779–782.
- Vale W, Rivier J, Vaughan J, et al. Purification and characterization of an FSH releasing protein from porcine ovarian follicular fluid. *Nature* 1986;321:776–779.
- Gold E, Risbridger G. Activins and activin antagonists in the prostate and prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2012;359:107–112.
- Tanaka T, Toujima S, Umesaki N. Activin A inhibits growth-inhibitory signals by TGF- $\beta$ 1 in differentiated human endometrial adenocarcinoma cells. *Oncol Rep* 2004;11:875–879.
- Yoshinaga K, Yamashita K, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Mori M. Activin A causes cancer cell aggressiveness in esophageal squamous cell carcinoma cells. *Ann Surg Oncol* 2008;15:96–103.
- Hoda MA, Münzker J, Ghanim B, et al. Suppression of activin A signals inhibits growth of malignant pleural mesothelioma cells. *Br J Cancer* 2012;107:1978–1986.
- Leto G, Incorvaia L, Badalamenti G, et al. Activin A circulating levels in patients with bone metastasis from breast or prostate cancer. *Clin Exp Metastasis* 2006;23:117–122.
- Yoshinaga K, Mimori K, Yamashita K, Utsunomiya T, Inoue H, Mori M. Clinical significance of the expression of activin A in esophageal carcinoma. *Int J Oncol* 2003;22:75–80.
- Shimizu S, Seki N, Sugimoto T, et al. Identification of molecular targets in head and neck squamous cell carcinomas based on genome-wide gene expression profiling. *Oncol Rep* 2007;18:1489–1497.
- Kawashiri S, Tanaka A, Noguchi N, et al. Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck* 2009;31:1346–1353.
- Vered M, Dobriyan A, Dayan D, et al. Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer. *Cancer Sci* 2010;101:274–280.
- Marsh D, Suchak K, Moutasim KA, et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *J Pathol* 2011;223:470–481.
- Hinsley EE, Kumar S, Hunter KD, Whawell SA, Lambert DW. Endothelin-1 stimulates oral fibroblasts to promote oral cancer invasion. *Life Sci* 2012;91:557–561.
- Almangush A, Bello IO, Keski-Säntti H, et al. Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. *Head Neck* 2013. May 21. doi: 10.1002/hed.23380 [Epub ahead of print].
- Etamad-Moghadam S, Khalili M, Tiryagy F, Alaeddini M. Evaluation of myofibroblasts in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2009;38:639–643.
- Vered M, Allon I, Buchner A, Dayan D. Stromal myofibroblasts accompany modifications in the epithelial phenotype of tongue dysplastic and malignant lesions. *Cancer Microenviron* 2009;2:49–57.

33. Lewis MP, Lygoe KA, Nystrom ML, et al. Tumour-derived TGF-beta1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SF-dependent invasion of squamous carcinoma cells. *Br J Cancer* 2004;90:822–832.
34. Byers RM, El-Naggar AK, Lee YY, et al. Can we detect or predict the presence of occult nodal metastases in patients with squamous carcinoma of the oral tongue? *Head Neck* 1998;20:138–144.
35. Beenken SW, Krontiras H, Maddox WA, Peters GE, Soong S, Urist MM. T1 and T2 squamous cell carcinoma of the oral tongue: prognostic factors and the role of elective lymph node dissection. *Head Neck* 1999;21:124–130.
36. Kurokawa H, Yamashita Y, Takeda S, Zhang M, Fukuyama H, Takahashi T. Risk factors for late cervical lymph node metastases in patients with stage I or II carcinoma of the tongue. *Head Neck* 2002;24:731–736.
37. Brandwein-Gensler M, Smith RV, Wang B, et al. Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2010;34:676–688.
38. Lindenblatt Rde C, Martinez GL, Silva LE, Faria PS, Camisasca DR, Lourenço Sde Q. Oral squamous cell carcinoma grading systems—analysis of the best survival predictor. *J Oral Pathol Med* 2012;41:34–39.
39. Li Y, Bai S, Carroll W, et al. Validation of the risk model: high-risk classification and tumor pattern of invasion predict outcome for patients with low-stage oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol* 2013;7:211–223.
40. Yang TL, Lou PJ, Chang YL, Wu CT, Wang CP, Ko JY. Tumor satellite in predicting occult nodal metastasis of tongue cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2011;145:599–605.