

Expressão de ciclina D1 e presença de metástase cervical de carcinoma epidermóide de boca

Cyclin D1 expression and cervical metastases in squamous cell carcinoma of the mouth

Gerson Schulz Maabs ¹, Denise Cantarelli Machado ², Emilio Antonio Jeckel-Neto ³, Vinicius Schenk Michaelises ⁴

Palavras-chave: carcinoma de células escamosas, ciclina d1, imunohistoquímica, linfonodos, metástase, neoplasias bucais.
Keywords: cyclin d1, squamous cell carcinoma, mouth cancer metastases immunohistochemistry.

Resumo / Summary

A metástase cervical é o fator de prognóstico mais relevante do carcinoma epidermóide de boca. Fatores clínicos e histológicos estão associados com o desenvolvimento da metástase cervical, porém a pesquisa de fatores moleculares está sendo amplamente realizada nos últimos anos. **Objetivo:** Observar a associação da expressão da ciclina D1 como fator de risco para a presença de metástase cervical. **Material e Método:** A expressão da ciclina D1 foi estudada e verificada sua associação com a metástase em 45 pacientes com câncer de boca. A leitura da expressão da ciclina D1 foi realizada pelo método estereológico. Características clínicas e histológicas foram pesquisadas e associadas com a presença de metástase. **Resultados:** A expressão da ciclina D1 foi encontrada em 15 pacientes (33,4%) e não esteve associada a fatores clínicos, histológicos e com a presença de metástase cervical, sendo sua expressão independente. O estadiamento clínico e as embolizações vasculares foram os fatores preditivos de maior relevância para o desenvolvimento de metástase. **Conclusões:** A expressão da ciclina D1, embora seja independente, não está associada com a presença de metástase cervical, enquanto que o estadiamento clínico e as embolizações vasculares estão.

Cervical metastasis represent the most relevant prognostic factor in carcinomas of the mouth. Clinical and histological factors are associated with the development of cervical metastasis; however, research on molecular factors has been broadly carried out in recent years. **Aim:** The aim of this study is to analyze the association of the Cyclin D1 as a risk factor for the presence of cervical metastasis. **Materials and methods:** Cyclin D1 expression was measured and the association between such substance and metastasis was found in 45 patients with mouth cancer treated by the author of this paper. Cyclin D1 presence was checked through the stereological method. Clinical and histological characteristics have been analyzed and associated with metastasis. **Results:** Cyclin D1 expression was found in 15 patients but it was not associated with clinical and histological factors related to the presence of metastasis. Such conclusion indicates that Cyclin D1 is an independent protein. The most important predictive aspects related to metastasis development have been clinical staging and vascular embolization. **Conclusions:** Cyclin D1, although independent, is not associated with cervical metastasis, while staging and vascular embolization are.

¹ Otorrinolaringologista e cirurgião de cabeça e pescoço. Mestre em medicina pela PUCRS. Membro do Serviço de otorrinolaringologia e cirurgia de cabeça e pescoço - PUCRS - Porto Alegre.

² PhD. Coordenadora do Laboratório de Biologia Celular e Doenças Respiratórias do Instituto de Pesquisas Biomédicas e Professora da Faculdade de Medicina da PUCRS.

³ Biólogo e Mestre em Educação (PUCRS), Doutor em Medicina (Aichi Medical University, Japão), Professor Titular da Faculdade de Biociências.

⁴ Doutorando Clínica Médica e Ciências da Saúde. Farmacêutico Bioquímico. Otorrinolaringologista e Cirurgião de Cabeça e Pescoço. Porto Alegre RS PUCRS - Hospital São Lucas e Hospital Mãe de Deus - Porto Alegre RS.

Endereço para correspondência: Gerson Schulz Maabs - Av. Palmeira 95/402 Bairro Petrópolis 90470-300 Porto Alegre RS.

Este artigo foi submetido no SGP (Sistema de Gestão de Publicações) da RBORL em 24 de janeiro de 2006. cod. 1693.

Artigo aceito em 2 de novembro de 2006.

INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide corresponde a mais de 90% dos tumores malignos da boca, sendo sua sobrevida modificada conforme o estadiamento da doença. Quando a doença é local, a sobrevida é de 79%, na doença loco-regional de 42% e de 19% na presença de metástases distantes¹. As características clínicas, histológicas e mais recentemente biológicas ou moleculares são denominadas de fatores de prognóstico, sendo preditivas de cura e de sobrevida. O fator de prognóstico mais importante no câncer de boca é a presença de metástase cervical o que torna o diagnóstico da metástase fundamental para o planejamento do tratamento oncológico^{2,3}.

A identificação de uma metástase cervical é realizada através do exame físico e de exames complementares, que falham em diagnosticar cerca de 20 a 35% dos pacientes clinicamente negativos^{2,3}. Este falso negativo é considerado elevado e justifica o tratamento preventivo do pescoço. Quando é tratado exclusivamente o tumor primário, na vigência de uma metástase cervical oculta, há sensível redução na sobrevida dos pacientes. A seleção dos pacientes para o tratamento do pescoço é realizada fundamentalmente pelas características clínicas do tumor quanto ao seu tamanho e localização³. As características histopatológicas, como grau de diferenciação celular e espessura do tumor, também auxiliam nesta seleção, porém ainda mantêm falhas elevadas. Aspectos biológicos do tumor estão sendo pesquisados na tentativa de identificar quais os pacientes com maior risco de desenvolver metástase cervical^{3,4}.

A ciclina D1 é uma proteína codificada pelo gene CCND1 localizado no cromossomo 11q13. Esta proteína atua no ciclo celular acelerando a fase G1 e foi descrita como um oncogene em 1991 por Motokura⁵, o qual observou que o aumento da ciclina desregula o ciclo celular e contribui para gênese do tumor. A presença da ciclina D1 é demonstrada imuno-histoquimicamente no câncer de cabeça e pescoço e, quanto maior sua expressão, menor a sobrevida dos pacientes, sendo assim considerada um fator de prognóstico por muitos pesquisadores, em carcinomas de esôfago, mama, cérvix uterino, cólon, reto e melanomas^{5,6}.

No presente estudo, foi avaliada a expressão da Ciclina D1 em uma série de 45 pacientes com carcinoma epidermóide de boca, e sua associação com a presença de metástase cervical. O objetivo do estudo foi associar a expressão da ciclina D1 como fator de risco para a presença de metástase cervical.

PACIENTES E MÉTODOS

1. Pacientes

Foram estudados 45 pacientes portadores de carci-

noma epidermóide de boca, tratados cirurgicamente pelo autor, no período de janeiro de 1991 a dezembro de 2001. Os pacientes foram submetidos à ressecção cirúrgica do tumor em seu local de origem e dos linfonodos cervicais. A cirurgia dos linfonodos cervicais incluiu pacientes que clinicamente não apresentavam metástases (N-), e de pacientes que clinicamente foram diagnosticados como metastáticos (N+).

A pesquisa da expressão da ciclina D1 foi realizada em lâminas histológicas obtidas do tumor primário. Foram revisados os prontuários com coleta de dados clínicos pré-cirúrgicos, coleta de dados do exame anatomopatológico da peça cirúrgica e sua evolução pós-operatória.

Foram excluídos do estudo os pacientes que apresentavam uma ou mais das seguintes situações:

- + Cirurgia sem intenção curativa.
- + Outras neoplasias concomitantes ou história de tumores prévios.
- + Terapia neo-adjuvante (quimioterapia e radioterapia).
- + Pacientes cujos dados de prontuário estavam incompletos.
- + Impossibilidade de definir o estadiamento clínico

2. Imunoistoquímica

Foram obtidos os blocos de parafina que continham os tumores primários dos pacientes investigados. Do bloco principal de cada tumor foram feitos cortes com uma espessura de 4mm.

Os cortes foram colocados em lâminas pré-tratadas com 10% de poli-L-lisina (Sigma, USA) e levados a estufa a 60°C por 24 horas.

Os cortes foram desparafinizados por incubação em xileno por 10 minutos por três vezes, seguido da rehidratação dos cortes em seqüência de etanol em concentrações decrescentes, começando com etanol absoluto, 90%, 80% e 70% por três minutos em cada diluição. A seguir, os cortes foram lavados três vezes em água destilada.

A recuperação dos sítios antigênicos com digestão por tripsina foi realizada após o aquecimento a 37°C em uma solução de tripsina 0,1% contendo 0,1% de cloreto de cálcio em pH 7,8. As lâminas foram incubadas nesta solução por 30 minutos a 37°C, seguido de uma lavagem com água destilada.

A exposição do antígeno em alta temperatura foi realizada pela incubação das lâminas em berço de vidro, com tampão contendo 1mM de EDTA dispostos em ângulo de 45°, em potência média por cinco minutos e 50 segundos, seguida de oito minutos em potência baixa (Microondas Panasonic, 1.500W).

Após a recuperação dos sítios antigênicos, procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com 3% de H₂O₂. Após 10 minutos de incubação, as lâminas foram

lavadas três vezes com água destilada e uma vez com PBS pH 7,2. Os cortes foram incubados por uma hora com o anticorpo primário anti-Ciclina D1 (Dako, USA) na concentração 1:20, seguido de duas lavagens em PBS. Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram incubados com o sistema biotina-estreptavidina (Dako LSAB² System, USA) que consiste na incubação com anticorpo anti-mouse/anti-rabbit biotilado por 10 minutos, seguido de uma lavagem em PBS e posterior incubação com estreptavidina conjugados a peroxidase. Após 10 minutos de incubação, as lâminas foram lavadas em PBS e uma solução com diaminobenzidina (Dako[®] Liquid DAB Substrate Chromogen System, USA). Após lavagem em água destilada, as lâminas foram contra-coradas com hematoxilina de Harris por 15 segundos, lavadas em três banhos de água e mergulhadas em uma solução de amônia 37 mM. Após a contra-coloração, a lâminas foram lavadas em três banhos de água morna, seguido de desidratação em concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e puro, respectivamente) por três minutos em cada diluição. Após dois tratamentos por cinco minutos em xileno os cortes foram cobertos com lamínulas montadas em Entellan[®] (Merck, Alemanha).

As lâminas foram analisadas sob microscópio ótico com o objetivo de avaliar a expressão da ciclina D1.

A medida da expressão da ciclina D1 foi realizada através de método denominado estereológico, cujo objetivo é de determinar parâmetros quantitativos a partir de cortes bidimensionais de estruturas antômicas microscópicas tridimensionais, valendo-se da geometria e da estatística^{7,8}.

A expressão da ciclina D1 foi medida pela contagem do número de núcleos corados divididos pela área em mm² e o valor indicado por Qa⁹.

A análise das lâminas foi feita em microscópio óptico Olympus AX-70 (Japão), acoplado a uma câmara de vídeo. As imagens obtidas eram transferidas a um computador e as contagens feitas com o auxílio do Programa Image Pro Plus versão 4.1 (Media Cybernetics, USA). Sobre uma imagem obtida com a objetiva de 20x era aplicada uma grade que dividia a mesma em nove campos iguais conforme a Figura 1.

De cada lâmina foram obtidos cinco valores e calculada uma média dos cinco Qa obtidos.

3. Análise Estatística

As variáveis quantitativas foram descritas por média e desvio padrão, enquanto que para as variáveis qualitativas utilizaram-se percentuais. A comparação das variáveis quantitativas nos grupos foi realizada pelo teste t de Student e no caso das variáveis qualitativas pelo teste do Qui-quadrado. Medidas de associação como o odds ratio e o risco relativo com seus respectivos intervalos de confiança foram complementarmente realizados. Para

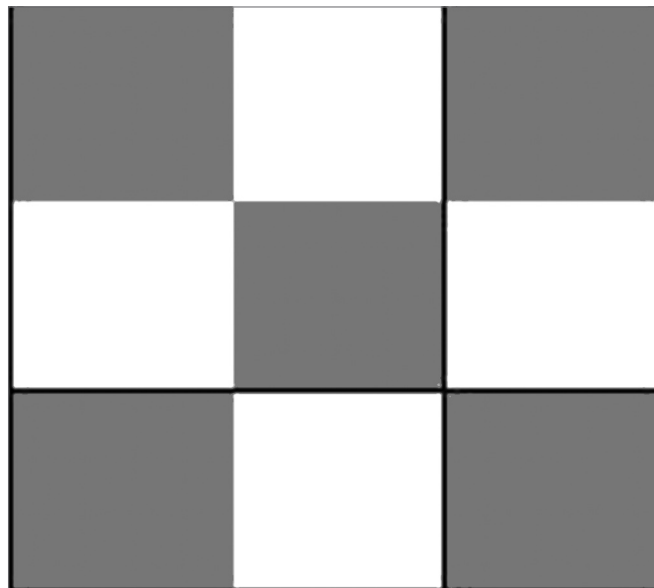


Figura 1. Diagrama dos campos pesquisados na lâmina - * A área escura indica onde foi realizada a contagem dos núcleos marcados com a ciclina D1.

ajustar a associação entre ciclina e metástase frente a diversos potenciais fatores de risco, utilizou-se a regressão logística multivariada.

As curvas de sobrevivência foram calculadas com o método de Kaplan- Meyer. As mortes que não foram decorrentes do tumor primário ou suas metástases não foram consideradas como falha de tratamento e sim como observações censuradas. As diferenças entre as curvas de sobrevivência foram comparadas pelo teste log rank. Para ajustar simultaneamente os efeitos dos diversos fatores considerados e sua relação com a ocorrência de óbito, foi utilizada a regressão de Cox. Os valores de P menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativos, sendo que nos modelos multivariáveis considerou-se P menores que 0,1.

Para a análise estatística, os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas SPSS (Statistical Package for Social Science) for Windows 11.0 e Excel 97.

4. Ética

O estudo está em conformidade com os itens III.3.i e III.3.t das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96), bem como a diretriz 12 das Diretrizes Éticas Internacionais para Pesquisas Biomédicas Envolvendo Seres Humanos (CIOMS 1993).

Foram respeitados os princípios enunciados na Declaração de Helsinque (WORLD MEDICAL ASSOCIATION, 1996), mantendo-se em sigilo a identidade dos pacientes, cujos dados foram identificados apenas pelo número de registro no projeto.

Tabela 1. Comparação entre os grupos com metástase e sem metástase quanto a variáveis demográficas, hábitos e características clínicas, histológicas e moleculares dos tumores.

Variável	Com Metástase(n=23)	Sem Metástase(n=22)	OR	IC95%	P
Idade, anos	59,0±11,4	57,0±11,0	1,02	0,96 a 1,07	0,543
Gênero, nº (%)					
masculino	22 (95,7)	18 (81,8)	4,9	0,5 a 47,7	0,187
feminino(a)	1 (4,3)	4 (18,2)	-		
Tabagismo, nº (%)					
sim	18 (78,3)	18 (81,8)	0,8	0,2 a 3,5	0,999
não(a)	5 (21,7)	4 (18,2)	-		
Uso de álcool, nº (%)					
sim	13 (56,5)	12 (54,5)	0,9	0,3 a 3,0	0,999
não(a)	10 (43,5)	10 (45,5)	-		
Língua, nº (%)					
comprometida	12 (52,2)	14 (63,6)	0,6	0,2 a 2,1	0,634
não comprometida(a)	11 (47,8)	8 (36,4)	-		
Classificação T (tumor), nº (%)					
T1 e T2(a)	12 (52,2)	16 (72,7)	-		
T3 e T4	11 (47,8)	6 (27,3)	2,4	0,7 a 8,5	0,265
Estadiamento clínico, nº (%)					
I e II(a)	4 (17,4)	13 (59,1)	-		
III e IV	19 (82,6)	9 (40,9)	6,8	1,7 a 27,1	0,010
Grau de diferenciação, n (%)					
G1	0 (0,0)	1 (4,5)	0,2(b)	(0,0 a 16,7)	0,462
G2	16 (69,6)	16 (72,7)	0,7	(0,2 a 3,3)	0,878
G3(a)	7 (30,4)	5 (22,7)	-		
Embolização, nº (%)					
presente	14 (60,9)	4 (18,2)	7,0	1,8 a 27,5	0,009
ausente(a)	9 (39,1)	18 (81,8)	-		
Infiltração nervosa, nº (%)					
presente	14 (60,9)	11 (50,0)	1,6	0,5 a 5,1	0,665
ausente(a)	9 (39,1)	11 (50,0)	-		
Ciclina, nº (%)					
[+]	9 (39,1)	6 (27,3)	1,7	0,5 a 6,0	0,598
[-](a)	14 (60,9)	16 (72,7)	-		

Os dados são apresentados como média±desvio padrão e frequência (percentual). OR: odds ratio; IC95%: intervalo de confiança de 95%. (a) Categoria de referência no cálculo do odds ratio; (b) Odds ratio ajustado pelo método de Agresti.

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (Protocolo número 298/01 - CEP).

RESULTADOS

As características clínicas, histológicas e a expressão da ciclina D1 dos 45 pacientes estudados podem ser

observadas na Tabela 1.

A ciclina D1 foi positiva em 15 (33,3%) casos e negativa nos demais 30 (66,7%). A média do número de núcleos marcados (Qa) variou entre 0,15 e 1,24 nos casos positivos. A presença da proteína no núcleo da célula pode ser observada na Figura 2.

A expressão da proteína no citoplasma da célula também foi observada em três pacientes.

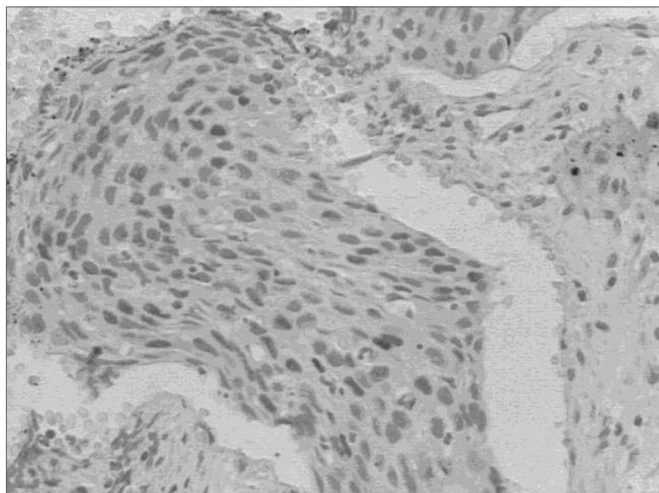


Figura 2. Expressão da Ciclina D1 - Expressão da Ciclina D1 corada em marrom no núcleo de células neoplásicas

As associações e correlações entre os pacientes com metástase (pN+) e sem metástase (pN-) foram realizadas com as características clínicas, histológicas, hábitos, variáveis demográficas e ciclina D1 e podem ser observadas na Tabela 1. A análise multivariada para avaliar o risco de associação da ciclina D1 com outros potenciais fatores de risco foi realizada e está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2. Modelo de regressão logística multivariável ajustando o efeito da ciclina [+] frente a diversos potenciais fatores de risco para sua associação com a ocorrência de metástases.

Variável	OR	IC90%	P
Ciclina [+]	2,7	0,6 a 11,6	0,267
Estadiamento clínico III e IV	16,4	2,8 a 95,5	0,009
Comprometimento da língua	0,2	0,1 a 0,9	0,068
Embolização vascular	4,3	1,1 a 17,5	0,084
Diferenciação celular G3	8,1	1,2 a 53,4	0,069
Infiltração nervosa	0,5	0,1 a 2,1	0,460

OR: odds ratio; IC90%: intervalo de confiança de 90%.

A sobrevida foi analisada em função da expressão da ciclina D1 e da presença de metástase em meses através de uma curva de sobrevida cujo desfecho considerado foi o óbito por câncer de boca, que ocorreu em sete situações. Os resultados podem ser observados nas Figuras 3 e 4.

O efeito da ciclina D1 foi ajustado frente a potenciais fatores de risco para a avaliação da sobrevida e está mostrado na Tabela 3. O efeito da ciclina D1 na sobrevida ajustado pelo modelo de regressão de Cox multivariável contendo os fatores estadiamento clínico, comprometimento da língua, diferenciação celular, embolização vascular

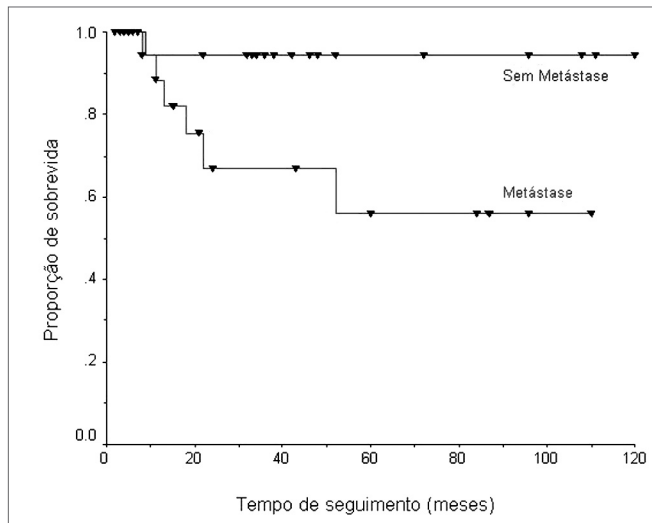


Figura 3. Metástases e sobrevida - Gráfico de Kaplan-Meier apresentando a ocorrência de óbitos estratificada pela presença ou não de metástases.

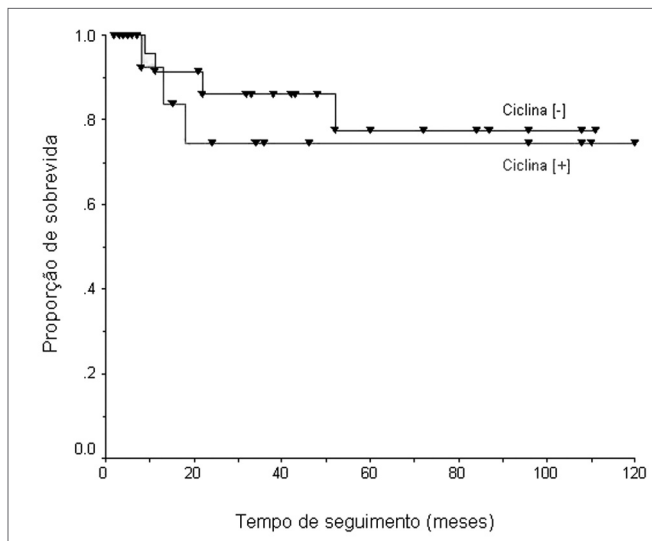


Figura 4. Ciclina D1 e sobrevida - Gráfico de Kaplan-Meier apresentando a ocorrência de óbitos estratificada por grupos de ciclina positiva ([+]) e negativa ([-]).

Tabela 3. Modelo de regressão de Cox multivariável ajustando o efeito da ciclina [+] frente a diversos potenciais fatores de risco para sua associação com a ocorrência de óbito.

Variável	RR	IC90%	P
Ciclina [+]	0.8	0.2 a 3.5	0.846
Estadiamento clínico III e IV	4.9	0.6 a 37.9	0.198
Comprometimento da língua	1.0	0.2 a 5.7	0.964
Embolização vascular	1.6	0.3 a 7.2	0.625
Diferenciação celular G3	3.6	0.6 a 20.9	0.226
Infiltração nervosa	0.4	0.1 a 2.4	0.409

OR: odds ratio; IC90%: intervalo de confiança de 90%.

e infiltração nervosa foi estudado e está apresentado na Figura 5.

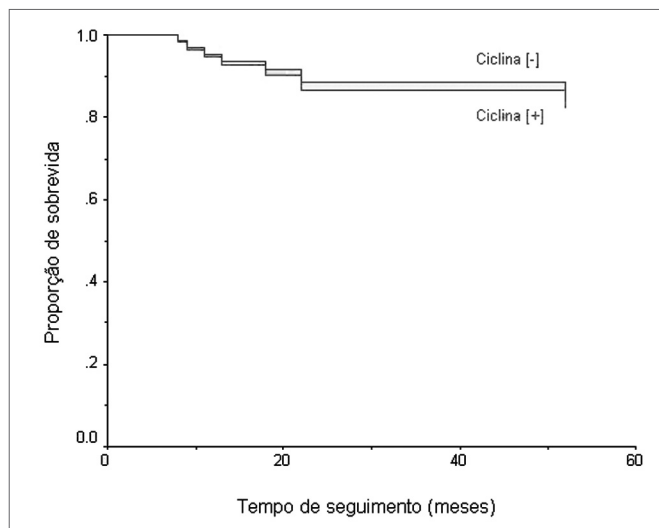


Figura 5. Ciclina D1 e sobrevivida - Análise multivariada - Gráfico de sobrevivida comparando os grupos de ciclina positiva ([+]) e negativa ([-]) com efeitos ajustados em modelo de regressão de Cox multivariável contendo os fatores estadiamento clínico, comprometimento da língua, diferenciação celular, embolização vascular e infiltração nervosa.

DISCUSSÃO

A ciclina D1 foi expressa em 15 (33,3%) pacientes da amostra estando de acordo com os resultados publicados que variam entre 30 e 40%¹⁰⁻¹², embora por uma metodologia distinta de leitura da imunoistoquímica. A literatura sobre câncer e ciclina D1 avalia a presença da ciclina através da contagem de núcleos marcados por grupo de células neoplásicas, que geralmente variam entre 500 e 1000 células, em percentuais. Por este método o pesquisador necessita contar um total de células neoplásicas, independente de estarem marcadas ou não, e a seguir, recontar as células que expressam a proteína, calculando o percentual. Além de ser um método trabalhoso, ocasiona maior risco de distorções na contagem. A escolha do ponto de corte, para separar a expressão positiva da negativa da ciclina D1, é arbitrária. Han et al.¹³, consideram a positividade quando ocorrer mais de 5% de núcleos marcados. Ravi et al.¹⁴, Itami et al.¹¹ e

Capaccio et al.¹², consideram a expressão da ciclina D1 significante quando presente em mais de 10% das células tumorais. El-Naggar et al.¹⁵ consideram valores superiores a 50% como uma superexpressão desta proteína. Mineta et al.¹⁶ consideram valores entre 0-50% de baixa expressão e acima de 50% de alta expressão. Schoelch et al.¹⁰ utilizam o escore negativo quando não há expressão, + para até 33% de expressão, ++ entre 33 e 66% e +++ acima de 66% de expressão da proteína nas células tumorais.

O método estereológico utilizado neste trabalho

avalia a expressão da proteína nos núcleos por área de tumor, sendo mais confiável^{8,9}. A expressão da proteína no citoplasma da célula também foi observada como já descrito em outros estudos¹⁷.

A ciclina D1 pode estar expressa com distintos graus de intensidade. O termo “alta expressão” é definido pela marcação de mais de 50% das células neoplásicas¹⁰. No presente estudo, os resultados do Qa obtidos nos 15 pacientes positivos variaram de 0,15 a 1,27 e não foram significativas as diferenças dos valores encontrados. Estabelecer um ponto de corte para categorizar a expressão da ciclina em baixa e alta expressão não foi possível face ao tamanho da amostra de pacientes, porém a análise quantitativa dos valores do Qa foi realizada.

A expressão da ciclina D1 nos 15 pacientes positivos não foi constante em toda a área de superfície do tumor. Em todos os casos, a análise da expressão da proteína foi realizada na região de maior marcação na lâmina, existindo áreas de tumor que não expressaram a proteína. A não-uniformidade da marcação pode ser justificada pelo fato de que cerca de 20% das células neoplásicas estejam em mitose¹⁸. Face à distribuição assimétrica desta expressão, poder-se-ia contestar os estudos em que os pesquisadores utilizam material de biópsia, como já relatado por Michalides et al.¹⁹, onde falsos negativos de expressão da ciclina D1 foram observados em material de biópsia quando comparado com a peça operatória, porém mais estudos são necessários para medir qual é a real sensibilidade da expressão da ciclina D1 em material de biópsia comparado com uma peça operatória. Isto é relevante, pois a existência de falsos negativos no material de biópsia comprometeria a aplicação clínica deste marcador na decisão de um tratamento, como por exemplo, a indicação ou não de um esvaziamento cervical em um paciente clinicamente N0.

Quanto ao gênero, fumo e álcool, não houve associação com a presença de metástase cervical e com a invasão da cápsula do linfonodo, o que confirma não serem fatores de risco para metástase cervical¹⁶.

A idade também não esteve relacionada com a presença de metástase cervical e com a invasão da cápsula do linfonodo, embora os pacientes muito jovens e os idosos desenvolvam tumores com comportamento mais agressivo²⁰.

Quanto à localização, também não houve associação com a presença de metástases. Os 14 pacientes T1 e T2 com carcinoma epidermóide de língua apresentaram metástase em seis casos, enquanto que os demais 14 pacientes T1 e T2, classificados como outros locais da boca, apresentaram metástase em seis casos. A localização não apresenta importância quando os tumores são grandes, como os tumores T3 e T4 que individualmente já acarretam elevado risco de metástases.

A localização do tumor na boca esteve associada

com a invasão da cápsula do linfonodo. Os tumores que comprometiam mais de uma localização na boca tiveram um maior comprometimento da cápsula do linfonodo com um valor $P = 0,049$.

Doze dos 28 pacientes T1 e T2 apresentaram metástases histológicas (42,8%), um valor próximo do esperado, que é de 20 a 40%. Quanto aos 17 pacientes T3 e T4, 11 apresentaram metástases (64,7%) concordando com a literatura²¹. Não houve significado estatístico entre o tamanho do tumor e a presença de metástase ($P = 0,265$). Também não foi significativa a associação do tamanho do tumor e a invasão da cápsula do linfonodo metastático ($P = 0,089$).

Quanto à classificação N, o exame histológico demonstrou que dos 25 casos negativos, oito (32%) eram falsos negativos e 17 (68%) verdadeiramente negativos. Quanto aos 20 pacientes N+, o exame histológico revelou que cinco (25%) pacientes eram falsos positivos e em 15 (75%) pacientes foi confirmada a presença de metástase cervical. O valor P encontrado foi de 0,001 para a presença de metástase cervical e de 0,047 para a invasão de cápsula. O número de falsos positivos de 25% corresponde ao descrito na literatura, que é de 20%, enquanto que o de falsos negativos foi de 32%, quando o valor referido na literatura é entre 20 a 35%^{22,23}. A estratificação dos pacientes com metástase não foi estudada neste trabalho, face ao pequeno número de pacientes alocados em cada subdivisão N.

O estadiamento clínico foi significativo na associação com a presença de metástase cervical. Quando é definido o estadiamento de um paciente com carcinoma de boca, está sendo considerado o tamanho do tumor e a presença clínica de metástase pela palpação cervical. Uma vez que os pacientes classificados em N positivo estão no estadiamento III e IV, o valor encontrado não é surpreendente estando diretamente associado à incidência de falsos positivos e falsos negativos na palpação cervical, que no presente estudo foi de 25% e 32% respectivamente. A palpação cervical e a classificação T isoladamente não apresentaram significância, o que justifica a utilização do estadiamento.

O grau de diferenciação celular não esteve associado com a presença de metástase cervical ou com a invasão da cápsula do linfonodo. A presença de apenas um paciente com carcinoma epidermóide bem diferenciado impossibilitou a observação da relação entre o grau de diferenciação e o risco de metástase.

A infiltração de bainhas nervosas não esteve associada à presença de metástase cervical ou à invasão da cápsula do linfonodo. A presença de infiltração de bainha nervosa ocorreu em 14 (60,9%) dos 23 pacientes com metástases, porém sem significado estatístico. Também não houve associação da infiltração de bainha nervosa com a invasão da cápsula do linfonodo.

A embolização vascular foi preditiva quanto à presença de metástases. Woolgar²⁴ encontrou 78% de invasão vascular nos pacientes N positivos e de 70% de infiltração de bainhas nervosas de uma amostra também de 45 pacientes com carcinoma epidermóide de boca. No presente estudo foi encontrado o valor de 60,9% para ambas as situações, porém com significados diferentes quando observados os resultados dos adequados testes de significância estatística, o que demonstra a relevância dos testes na análise dos dados, evitando assim, interpretações equivocadas.

A expressão da ciclina D1 não está associada à presença de metástase. A ciclina D1 quantificada pelo valor do Qa também não modificou estes resultados. A ausência de trabalhos na literatura que utilizam o método estereológico impossibilita a comparação de resultados quantitativos. A ciclina também não esteve associada à invasão de cápsula do linfonodo metastático.

Na literatura, a associação entre a expressão da ciclina D1 e a presença de metástase cervical é ambígua. Os resultados do presente estudo concordam com os obtidos por Han et al.¹³, Michalides et al.^{19,25} e Bellacosa et al.²⁶. Já os trabalhos de Frachiolla²⁷, Itami¹¹, Masuda²⁸, Tapia et al.²⁹, Capaccio et al.³⁰ e Mineta et al.¹⁶ demonstraram que a ciclina D1 está associada à presença de metástase cervical. Os resultados são contraditórios e os motivos podem ser: diferenças de expressão da ciclina D1 nos diferentes órgãos, o estado da peça cirúrgica, como emblocamento e tempo no formal até ser fixado, o ponto de corte para definir o que é superexpressão da proteína e uma metodologia padrão de leitura evitando subjetividade na interpretação.

A análise multivariada da ciclina D1 com os fatores de prognóstico de maior relevância não modificaram os resultados, demonstrando que a expressão da ciclina D1 é independente dos demais fatores estudados, concordando com os achados de Capaccio et al.³⁰ e Mineta et al.¹⁶.

A curva de sobrevida dos 45 pacientes da amostra demonstra que os pacientes positivos para ciclina D1 apresentam uma tendência de menor sobrevida que os pacientes negativos, embora não tenha um forte significado estatístico.

A análise da sobrevida quanto à presença de metástase, revela que os pacientes com metástase cervical apresentam menor sobrevida, e confirma o significado da metástase cervical como fator prognóstico no câncer de boca^{3,31-33}.

A análise multivariada identifica que a presença de ciclina D1 e a metástase cervical são independentes quanto à sobrevida, concordando com os achados de Han et al.¹³. Estes autores não encontraram associação entre a ciclina D1 e a presença de metástase em câncer gástrico e encontraram associação com a sobrevida dos pacientes. Michalides et al.^{19,25} estudaram carcinomas de cabeça e

pescoço e Bellacosa et al.²⁶ pacientes com câncer de laringe e também não encontraram correspondência entre a presença de metástases com a expressão da ciclina D1, porém encontraram com a sobrevida dos pacientes.

Neste estudo a presença de metástase cervical foi significativa para diminuir a sobrevida, enquanto que a ciclina D1 não teve a mesma significância estatística, mostrando apenas uma tendência de que os pacientes com maior expressão da ciclina tiveram pior sobrevida.

CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu concluir que:

a. A expressão da ciclina D1 parece ser independente das características clínicas e histológicas do carcinoma epidermóide de boca.

b. A ciclina D1 provavelmente não está associada com a presença de metástase cervical.

c. A presença de embolização vascular e o estadiamento clínico foram os fatores mais significativos como preditivos de metástase cervical nos casos estudados.

d. A presença de metástase cervical foi significativa na sobrevida dos pacientes estudados, enquanto que o mesmo não foi observado com a ciclina D1.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gloecker Ries LA. SEER cancer statistics review, 1973-1991. Bethesda MD: US. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Cancer Institute 1994. Report no. NIH-94-2789.
2. Shaha AR, Spiro RH, Shah JP, Stron EW. Squamous carcinoma of the floor of the mouth. *Am J Surg* 1984;148:455-9.
3. Russolo M, Giacomarra V, Papanikolla L, Tirelli G. Prognostic indicators of occult metastases in oral cancer. *Laryngoscope* 2002;112:449-52.
4. Mohit-Tabatabai M. Relation of Thickness of Floor of Mouth Stage I and II Cancers to Regional Metastasis. *The Am J. of Surg* 1986;152:351-3.
5. Motokura T, Bloom T, Kim HG. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature* 1991;350:512-5.
6. Quon H, Liu FF, Cummings BJ. Potential molecular prognostic marker in head and neck squamous cell carcinomas. *Head Neck* 2001;23(2):147-59.
7. Mandarin-de-Lacerda CA. Métodos quantitativos em morfologia. Rio de Janeiro: UERJ; 1995. p 72-107.
8. Gundersen HJG et al. Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 1988;96:379-94.
9. Hamilton PW, Allen DC. Quantitative clinical pathology. Oxford: Blackwell Science Inc.; 1995, pp. 4-5.
10. Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 1999;35(3):333-42.
11. Itami A, Shimada Y, Watanabe G, Imamura M. Prognostic value of p27 and cyclin D1 expression in esophageal cancer. *Oncology* 1999;57:311-317.
12. Capaccio P, Pruneri G, Carboni N, Pagliari AV, Quatela M, Cesana BM, Pitnataro L. Cyclin D1 expression is predictive of occult metastases in head and neck cancer patients with clinically negative cervical lymph nodes. *Head and Neck* 2000;5:234-40.
13. Han S, Kim H, Park K. Expression of p27 and cyclin D1 proteins is inversely correlated and associated with poor clinical outcome in human gastric cancer. *J Surg Oncol* 1999;71:147-54.
14. Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, Nalinakumari KR, Nair MK, Pillai MR. Angiogenesis during tumor progression in the oral cavity is related to reduced apoptosis and high tumor cell proliferation. *Oral Oncology* 1998;34:543-8.
15. El-Naggar AK, Lai S, Cayman GL, Zhou J, Tucker SA, Myers J, Luna MA, Benedict WF. Expression of p16, Rb and Cyclin D1 gene products in oral and laryngeal squamous carcinoma: biological and clinical implications. *Human Pathol* 1999;30:1013-8.
16. Mineta H, Miura K, Takebayashi S. Cyclin D1 overexpression correlates with poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2000;36:194-8.
17. Goodger NM, Gannon J, Hunt T, Morgan PR. Cell cycle regulatory proteins - an overview with relevance to oral cancer. *Oral Oncology* 1997;33:61-73.
18. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson SD. *Biologia molecular da célula*. Porto Alegre: Artes Médicas; 2002. p 1273-90.
19. Michalides RJAM, Van Veelen NMJ, Kristel PMP. Overexpression of cyclin D1 indicates a poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1997;123:497-502.
20. Carvalho FE, Papaleo NM. *Geriatría, fundamentos, clínica e terapêutica*. São Paulo: Atheneu; 1994, pp 9-30.
21. Jones AS. Prognosis in Mouth Cancer: Tumor Factors. *Oral Oncol, Eur J Câncer* 1994;30B: 8-15.
22. Carter LR. Patterns and mechanisms of spread of squamous carcinomas of the oral cavity. *Clinic Otolaryngology* 1990;15:185-91.
23. Ali S, Tiwari RM, Snow G. False-positive and False-negative neck nodes. *Head Neck Surg* 1985;8:78-82.
24. Woolgar J, Path MRC, Scoot J, Path FRC. Prediction of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue/floor of mouth. *Head & Neck* 1995;17:463-72.
25. Michalides R, Van Veelen N, Hart A, Lofturs B, Wientjens E, Balm A. Overexpression of cyclin D1 correlates with recurrence in a group of forty-seven operable squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1995;55:975-8.
26. Bellacosa A, Almadori G, Cavallo S. Cyclin D1 gene amplification in human laryngeal squamous cell carcinomas: prognostic significance and clinical implications. *Clin Cancer Res* 1996;2(1):175-80.
27. Fracchiolla NS, Pruneri G, Pignataro L, et al. Molecular and immunohistochemical analysis of the bcl-1/cyclin D1 gene in laryngeal squamous cell carcinomas: correlation of protein expression with lymph node metastases and advanced clinical stage. *Cancer* 1997;79:1114-21.
28. Masuda M, Hirakawa N, Nakashima T, Kuratomi Y, Komiyama S. Cyclin D1 overexpression in primary hypopharyngeal carcinomas. *Cancer* 1996;78:390-5.
29. Tapia JPR, Meana MVG, Gonzáles LAG. Inactivación de p53 y amplificación de la ciclina D1 en los carcinomas epidermoides de cabeza e cuello. *Acta Otorrinolaringol Esp* 2002;53:225-32.
30. Capaccio P, Pruneri G, Carboni N. Cyclin D1 protein expression is related to clinical progression in laryngeal squamous cell carcinomas. *J Laryngol Otol* 1997;111(7):622-6.
31. Spiro RH, Alfonso AE, Farr HW, Stron EW. Cervical node metastases from epidermoid carcinoma of the oral cavity or oropharynx: a critical assessment of current staging. *Am J Surg* 1974;128:562-7.
32. Hibbert J, Marks NJ, Winter PJH, Shaheen OH. Prognostic factors in oral carcinoma and their relation to clinical staging. *Clin Otolaryngol* 1983;8:197-203.
33. Hiratsuka H. Multivariate Analysis of Occult Lymph Node Metastasis as a Prognostic Indicator for Patients with Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Cancer* 1997;80:351-6.