

## INFILTRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS E *BUDDING* TUMORAL EM CÂNCER DE LÁBIO: EXISTE UMA ASSOCIAÇÃO COM O COMPORTAMENTO DO TUMOR?

KARINE DUARTE DA SILVA<sup>1</sup>; PATRÍCIA CARLOS CALDEIRA<sup>2</sup>; ANA PAULA NEUTZLING GOMES<sup>3</sup>; ANA CAROLINA UCHOA VASCONCELOS<sup>1,3</sup>; MARIA CÁSSIA FERREIRA DE AGUIAR<sup>2</sup>; SANDRA BEATRIZ CHAVES TARQUINIO<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Universidade Federal de Pelotas –  
karineduartedasilva1@gmail.com

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Universidade Federal de Minas Gerais –  
pat\_caldeira@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca – Faculdade de Odontologia - Universidade Federal de Pelotas – sbtarquinio@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

O câncer de lábio, em especial de lábio inferior, é representado principalmente pelo carcinoma espinocelular (CEC), que revela notável prevalência entre pessoas de pele clara que trabalham expostas cronicamente à radiação solar (DOMÍNGUEZ-GORDILLO et al., 2015; SILVEIRA et al., 2010). Pacientes com CEC de lábio apresentam sobrevida livre de doença em 5 anos mais favorável comparada aos casos intraorais (BHANDARI et al., 2014; XIE et al., 2016). Lesões de CEC em lábio tem diagnóstico precoce favorecido pela fácil visualização e podem sofrer tratamento cirúrgico amplo, aspectos associados com melhor prognóstico (RENA et al., 2014; SENA et al., 2010). Entretanto, esses aspectos não são suficientes para explicar as baixas taxas de metástases, apesar da rica vascularização do lábio inferior (SOLLAMO et al., 2016).

Nesse sentido, algumas características histológicas podem ser úteis como fatores prognósticos em carcinomas. Uma delas é o *budding* tumoral (BT), representado por *clusters* (*buds*) de células malignas localizadas não só no fronte de invasão tumoral (FIT), mas também em sítios intratumorais, tendo sido relacionado a aumento do potencial metastático, inclusive em casos de CEC oral (ALMANGUSH et al., 2016; WANG et al., 2011).

Além disso, tem-se o sistema de gradação histológica dos tumores proposto por Bryne et al. (1992) que pode ser utilizado para análise do prognóstico. Nesse sistema clássico, uma maior intensidade do infiltrado inflamatório (especialmente composto por linfócitos) é considerada benéfica para o paciente. Entretanto, estudos mais recentes têm demonstrado que o infiltrado inflamatório pode apresentar efeitos não só anti, como pró-tumorais (SOUTO, 2011; TRELLAKIS et al., 2011). Neutrófilos associados ao tumor podem estar envolvidos na iniciação, invasão e progressão do câncer, além do que sua interação com linfócitos no microambiente tumoral tem sido relacionada com resultados clínicos desfavoráveis e pobre sobrevida em diversos tipos de câncer, incluindo o CEC oral, quando uma alta razão neutrófilos/linfócitos (RNL) é encontrada no sangue, tumor ou ambos (PERISANIDIS et al., 2013; TRELLAKIS et al., 2011).

Baseando-se no melhor comportamento do CEC em lábio, características associadas a pior prognóstico no CEC oral também merecem ser avaliadas no CEC de lábio. Portanto, o objetivo desse estudo é avaliar o número de neutrófilos e linfócitos em uma amostra de CEC de lábio e verificar sua associação com o grau histológico dos tumores e o BT.

### 2. METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) (#1143507). Quarenta e três espécimes de excisão de CEC de lábio foram recuperadas dos arquivos do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (UFPEL). Dados clínicos dos pacientes foram obtidos das fichas de biópsia. A gradação histológica dos tumores, conforme critérios de Bryne et al. (1992), foi realizada simultaneamente por dois observadores cegados em relação às características clínicas das lesões.

Foi realizada técnica imunoistoquímica para a identificação de neutrófilos, linfócitos e citoqueratinas, utilizando os anticorpos CD66b (1:600; clone GF10F5; BD Biosciences, EUA), CD3 (1:200; clone F7.2.38; Dako Cytomation, Dinamarca) e um pan de citoqueratinas (1:100; clone AE1/AE1; Dako Cytomation, Dinamarca), respectivamente. Para os dois primeiros, a recuperação antigênica foi realizada com solução de Tris-EDTA (pH 9,0), em banho-maria a 96°C, durante 20 min. Já para o AE1/AE3, utilizou-se solução de ácido cítrico (pH 6,0), em banho-maria a 96°C, durante 30 min. O bloqueio da peroxidase endógena e de proteínas, bem como as etapas de detecção foram realizadas com soluções prontas para uso (Kit Spring BioScience).

A análise do BT foi realizada simultaneamente por dois avaliadores, sendo identificada primeiramente a área do *hot spot* (100x). BT foi considerado presente quando havia células isoladas ou pequenos grupos de no máximo quatro células, totalizando pelo menos cinco *buds* em um campo (200x) (UENO et al, 2002; WANG et al, 2011).

Para a análise de neutrófilos e linfócitos, todos os casos foram avaliados por um único observador, usando retículo acoplado a um microscópio óptico. Análise semiquantitativa foi realizada, conforme Caldeira et al. (2015). Essas células foram contadas em cinco campos consecutivos no FIT (400X), sendo a positividade classificada em relação ao infiltrado total como escore 0 (sem imunomarcagem), 1 (1-25%), 2 (>25-50%), ou 3 (>50%). O valor médio dos escores dos cinco campos foi definido como o índice de CD66b<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup> para cada caso, a partir dos quais se pode obter a RNL.

Testes estatísticos foram realizados utilizando o programa SPSS® versão 22. Frequências absolutas e relativas foram estimadas. Qui-quadrado de Pearson, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados para verificar a associação entre as variáveis. Para todos os testes, o nível de significância estabelecido foi 5%.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O padrão clássico de ocorrência do CEC em lábio foi confirmado na amostra avaliada, com maior prevalência no sexo masculino, indivíduos acima dos 40 anos de idade, pessoas de pele branca, e trabalhadores expostos cronicamente à radiação solar (DOMÍNGUEZ-GORDILLO et al., 2015; SILVEIRA et al., 2010). As características clínicas e patológicas dos 43 pacientes podem ser observadas na Tabela 1.

A análise imunohistoquímica de neutrófilos CD66<sup>+</sup> e linfócitos CD3<sup>+</sup> revelou, a partir dos valores médios gerados para cada caso, que a mediana de imunomarcagem para neutrófilos foi 0,8 (min 0,0; máx 2,4) e para linfócitos 2,0 (min 0,0; máx 3,0), portanto, a mediana para a RNL foi 0,4 (0,0 min; máx 2,4), apresentando-se baixa em relação a observada em outros estudos, os quais encontraram associação entre alta RNL e pobre prognóstico com reduzida sobrevida (PERISANIDIS et al., 2013; TRELLAKIS et al., 2011). Dessa forma, o resultado encontrado é provavelmente favorável para os casos avaliados.

Apesar da análise do fenótipo anti ou pró-tumoral dos neutrófilos não ter sido realizada, acredita-se que eles possam apresentar um perfil benéfico nas

amostras analisadas, de acordo com o melhor comportamento dos CECs de lábio (BHANDARI et al, 2014; SILVEIRA et al., 2010). Similarmente, atribui-se efeito protetor para a alta contagem de linfócitos CD3<sup>+</sup>, de acordo com a hipótese de Bryne et al. (1992) para o papel do infiltrado linfocitário no CEC oral.

De acordo com a literatura revisada este parece ser o primeiro estudo que avalia o BT em CEC de lábio, estando presente em 11 (25,6%) e ausente em 32 (74,4%) casos. A presença de BT está associada com pior prognóstico em vários tipos de carcinomas (ALMANGUSH et al, 2016; WANG et al, 2011). Não houve associação estatisticamente significativa entre BT e a contagem de neutrófilos CD66b<sup>+</sup> e linfócitos CD3<sup>+</sup>, entretanto, o padrão de invasão (BRYNE et al., 1992) e a presença de BT mostraram-se associados ( $p=0,03$ ), conforme também revelaram outros estudos (BRANDWEIN-GENSLER et al, 2010; WANG et al, 2011). Este fato sugere que tanto o padrão de invasão quanto o BT podem refletir a agressividade do tumor no FIT.

Em relação ao sistema de gradação histológica, a maioria, 36 (83,7%), dos tumores são bem diferenciados, apresentando bom prognóstico, o que está de acordo com o que a literatura reporta para o CEC de lábio (SENA et al., 2010; SILVEIRA et al, 2010). O parâmetro infiltrado inflamatório linfoplasmocitário do sistema de Bryne et al. (1992) e a contagem de células CD3<sup>+</sup> mostraram-se associados ( $p=0,03$ ), quando avaliados os parâmetros desse sistema e a contagem de neutrófilos CD66b<sup>+</sup> e linfócitos CD3<sup>+</sup>.

**Tabela 1.** Análise descritiva das características clínico-patológicas da amostra (n = 43).

Características	n (%)	Características	n (%)
<b>Sexo</b>		<b>Tamanho</b>	
Feminino	11 (25,6)	T1 (até 2cm)	30 (79,0)
Masculino	32 (74,4)	T2 (>2-4)	6 (15,8)
<b>Idade</b>		T3 (>4cm)	2 (5,3)
<40 anos	2 (4,9)	<b>Aspecto Clínico</b>	
40-60 anos	16 (39,0)	Eritroplasia	2 (5,1)
>60 anos	23 (56,1)	Úlcera	33 (84,6)
<b>Cor de pele*</b>		Associação**	4 (10,3)
Branca	40 (100)	<b>Tempo de evolução</b>	
Não-branca	0 (0)	0-6 meses	13 (43,3)
<b>Ocupação</b>		6-12 meses	6 (20,0)
Ambiente interno	7 (18,0)	>12 meses	11 (36,7)
Ambiente externo	24 (61,5)		
Aposentado	8 (20,5)		

O número máximo de informações perdidas foi para a variável tempo de evolução (n=13).

\*Percepção do profissional \*\*Eritroplasia+úlcera e úlcera+leucoplasia

#### 4. CONCLUSÕES

Desta forma, nossos resultados podem explicar, em parte, as baixas taxas de metástase local e sistêmica do CEC de lábio, uma vez que a baixa infiltração de neutrófilos no FIT e a ausência de BT observados na maioria dos casos podem

desfavorecer este processo e estarem associadas ao melhor comportamento dos CECs nesse sítio, quando comparados aos casos de CEC intraorais.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMANGUSH, A. et al. Prognostic value of tumour budding in oesophageal cancer: a meta-analysis. **Histopathology**, v.68, n.2, p.173-182, 2016.
- BHANDARI, K. et al. Primary cN0 lip squamous cell carcinoma and elective neck dissection: Systematic review and meta-analysis. **Head and Neck**, v.37, n.9, p.1392-400, 2015.
- BRANDWEIN-GENSLER, M. 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**, v.34, n.5, p.676-88, 2010.
- BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J Pathol**, v.166, n.4, p.375-81, 1992.
- CALDEIRA, P.C., SOUSA, A.A., AGUIAR, M.C.F. Differential infiltration of neutrophils in T1–T2 versus T3–T4 oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. **BMC Res Notes**, v.8, n.569, 2015.
- DOMÍNGUEZ-GORDILLO, A. et al. The pattern of lip cancer occurrence over the 1990–2011 period in public hospitals in Madrid, Spain. **J Oral Pathol Med**, v.45, n.3, p.202-10, 2015.
- PERISANIDIS, C. et al. High neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent marker of poor disease-specific survival in patients with oral cancer. **Med Oncol**, v.30, n.1, p.334-41, 2013.
- RENA, W. et al. Surgical management of Squamous Cell Carcinoma of the lower lip: An experience of 109 cases. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.19, n.4, p.e398-402, 2014.
- SENA, M.F. et al. Avaliação dos Fatores Prognósticos Relacionados ao Câncer de Lábio: Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.56, n.1, p.93-102, 2010.
- SILVEIRA, E.J.D. et al. Analysis of local immunity in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. **Exp Mol Pathol**, v.88, n.1, p.171-175, 2010.
- SOLLAMO, E.M.J. et al. Sentinel lymph node biopsy in cN0 squamous cell carcinoma of the lip: A retrospective study. **Head & Neck**, v.38, n.1, p.E1375-80, 2016.
- SOUTO, J.C., VILA, L., BRÚ, A. Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. **Med Res Rev**, v.31, n.3, p.311-63, 2011.
- TRELLAKIS, et al. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. **Int J Cancer**, v.129, n.9, p.2183-93, 2011.
- UENO, H. et al. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. **Histopathology**, v.40, n.2, p.127-132, 2002.
- WANG, C. et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.40, n.7, p.545-551, 2011.
- XIE, L. et al. Facial lymph node involvement as a prognostic factor for patient survival in oral cavity squamous cell carcinoma. **Tumor Biol**, v.37, n.3, p.3489-96, 2016.