Caracterização imuno-histoquímica do infiltrado linfocitário em biópsia de carcinoma espinocelular da língua e soalho oral e sua implicação prognostica

Character description by immuno-histochemical technique in lymphocytic inflammatory infiltration in epidermoid carcinomas biopsies of the tongue and floor of the mouth

Afonso Celso Manzano [1]
Albina Altemani [2]
Antonio Santos Martins [3]
André Del Negro [4]
Alfio José Tincani [5]

RESUMO

Introdução: O infiltrado inflamatório tem sido considerado como um possível fator prognóstico em neoplasias malignas. O objetivo do presente estudo é caracterizar pela técnica imuno-histoquímica, o infiltrado inflamatório linfocitário em biópsias de carcinoma espino celular (CEC) da língua e soalho de boca, analisando seu valor prognóstico por correlação dos achados, com os dados do estadiamento TNM e com a probabilidade de sobrevida dos doentes. **Método:** Foram analisadas 46 biópsias de pacientes não tratados com CEC de língua e soalho da boca, nas quais foram avaliadas as seguintes características do infiltrado inflamatório: intensidade do infiltrado inflamatório geral, intensidade relativa do infiltrado de linfócitos T (CD45R0+) e B (CD20+) em relação ao infiltrado geral nas regiões intra e peritumorais, epitélio displásico e epitélio normal; quantidade de linfócitos CD4+, quantidade de linfócitos CD8+ e razão CD4/CD8 nas regiões intra e peritumorais. **Resultados:** Tanto o infiltrado inflamatório geral, como o infiltrado de linfócitos T e B eram mais intensos na área peritumoral do que na intratumoral. Em ambas, os linfócitos T foram encontrados em maior quantidade do que os linfócitos B, a proporção CD4/CD8 não mostrou diferença significativa entre as áreas intra e peritumorais. Foi observado correlação inversa significativa entre a intensidade do infiltrado inflamatório geral intratumoral e a presença de metástases cervicais e estádio da doença. Houve, também, correlação inversa significativa entre intensidade de infiltrado de linfócitos B intratumoral e presença de metástases cervicais. Não foi encontrado qualquer correlação entre sobrevida e infiltrado inflamatório relacionado ao CEC na amostra estudada. **Conclusão:** Concluiu-se que, a análise do infiltrado inflamatório em biópsias pode contribuir para a avaliação do prognóstico dos doentes com CEC de cavidade oral.

Descritores: Carcinoma de Células Escamosas; Neoplasias de Cabeça e Pescoço; Neoplasias da Língua.

ABSTRACT

Introduction: Inflammatory infiltration has been considered as a likely prognostic factor in malign neoplasms. The aim of this work is to characterize, by immuno-histochemical technique, the lymphocytic inflammatory infiltration in epidermoid carcinomas biopsies of the tongue and floor of the mouth. Analyse its prognostic value by correlating the results with the data of TNM staging system and with the probability of survival. **Method:** It was studied 46 biopsies of non-treated patients with epidermoid carcinoma of the tongue and floor of the mouth in wich was analysed the following inflammatory infiltration parameters: general inflammatory infiltration intensity, T and B lymphocytes infiltration intensity in relation to the general inflammatory infiltration in tumor parenchyma, stroma region, displasia and normal epithelium, amount of CD4+ lymphocytes, amount of CD8+ lymphocytes and CD4/CD8 ratio in tumor parenchyma and stroma. **Results:** Both the general inflammatory infiltration and T and B lymphocytes infiltration were more intense in the stromal than in the parenchymal tumor. In both sites the T lymphocytes were found more frequently than the B lymphocytes. The CD4/CD8 ratio didn't show expressive difference between stroma and parenchyma tumor. It was seen a significant inverse correlation between parenchymal inflammatory infiltration intensity and presence of neck metastases and also with TNM staging. There was significant correlation between lack in B lymphocytes infiltration of the parenchyma tumor and presence of neck metastases. **Conclusion:** It wasn't found any correlation between survival and inflammatory infiltration parameters related to epidermoid carcinomas in this study. It was concluded that the analysis of inflammatory infiltration found in biopsies could aid information to the prognostic evaluation in patients with epidermoid carcinomas of the mouth.

Key words: Mouth Neoplasms; Head and Neck Neoplasms; Neoplasms, Squamous Cell.

1) Mestre em Cirurgia no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço).Cirurgião de Cabeça e Pescoço - Santa Casa de Limeira.
2) Professora Titular no Departamento de Anatomiapatológica da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.
3) Professor Associado no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. Chefe da Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço.
4) Cirurgião de Cabeça e Pescoço no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp. Médico Contratado na Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço no Departamento de Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp.
5) Professor Associado na Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço - Unicamp.

Instituição: Unicamp. Faculdade de Ciências Médicas
Campinas / SP – Brasil.
Correspondência: Alfio José Tincani - Departamento de Cirurgia Universidade Estadual de Campinas Barão Geraldo - Caixa Postal 6111 – Campinas / SP – Brasil - CEP: 13083-970 Telefone: (+55 19) 3521-9450 – E-mail: - tincani@unicamp.br
Recebido em 09/09/2010; aceito para publicação em 14/11/2010; publicado online em 30/12/2010.
Conflito de interesse: não há. Fonte de fomento: não há.

INTRODUÇÃO

Em nosso país, o carcinoma da cavidade oral figura entre os tipos de câncer mais incidentes para o sexo masculino e no feminino esta incidência vem cada vez mais aumentando[1-3]. Na cavidade oral, a língua em 30% dos casos é o sítio mais comumente envolvido por carcinoma espino celular (CEC) sendo que as metástases regionais estão presentes na avaliação inicial em aproximadamente 30% dos pacientes[4] e, o carcinoma da cavidade oral tem etiologia multifatorial, como o fumo e o álcool[4] ou ainda fatores biológicos como a infecção do epitélio oral pelo HPV[5-7]. Os fatores etiológicos inerentes ao portador ou hospedeiro da doença, tais como, sexo, idade e condições do estado físico geral são descritos há vários anos e estão diretamente ligados ao papel dos mecanismos de defesa do indivíduo contra o crescimento do tumor[6, 7]. Dentre esses últimos, o papel da vigilância do sistema imunológico do hospedeiro contra o tumor tem sido objeto de investigação devido a sua importância prognóstica e tratamento[7-9].

O infiltrado inflamatório tumoral e peritumoral, constituído predominantemente de linfócitos é comum a vários tipos de tumores, incluindo o CEC da cavidade oral[10, 11], sugerindo a existência de uma resposta imune local contra o tumor. Embora estudos relacionem diretamente a intensidade e o teor do infiltrado linfocitário a um melhor prognóstico da doença[9,12] esse assunto tem sido objeto de controvérsia. Outros autores estudaram o teor do infiltrado inflamatório no tumor, atribuindo-lhe um papel supressor da resposta imune, contribuindo para o crescimento e disseminação do câncer[13].

Existem várias técnicas para analisar o infiltrado inflamatório tumoral e entre estes se destaca o da imunoperoxidase com anticorpos monoclonais, através do método do complexo de avidina-biotina[13,14]. Tal técnica permite a localização de antígenos em tecidos fixados em formalina com boa sensibilidade e relativa simplicidade, mesmo em material estocado. Ao lado de outros fatores prognósticos, tais como, o grau histológico de malignidade a medida da espessura do tumor e o conteúdo de DNA das células neoplásicas, a análise da resposta imune do hospedeiro, através da caracterização do infiltrado linfocitário tumoral, tem por objetivo adicionar elementos que corroborem para a decisão terapêutica, além de dar subsídios para o tratamento imunoterápico que, associadas com as modalidades terapêuticas ora empregadas, ou seja, a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, aumentem a sobrevida dos pacientes portadores de CEC da cavidade oral[15,16].

O comportamento clínico incerto dos pacientes com tumores malignos levou muitos pesquisadores à procura de fatores que pudessem ser usados como índices de prognóstico. Como resultados surgiram os conceitos de estadiamento clínico e grau histológico do tumor primário, presença de linfonodos cervicais positivos (N+), espessura da invasão muscular, tratamento realizado (cirurgia só ou a combinação de cirurgia e radioterapia e ou quimioterapia). A espessura do tumor, invasão perineural, invasão vascular e tamanho do tumor primário também são muito utilizados para predizer o prognóstico dos pacientes[16]. Outros fatores foram ainda considerados, como a morfologia da lesão (exofítica, ulcerada ou outra), condição das margens cirúrgicas, avaliação da interface tumor-hospedeiro, densidade microvascular por pesquisa imuno-histoquímica do antígeno CD31 e a expressão da proteína p53[17]. Outros estudos pesquisaram a presença de margem cirúrgica positiva e a profundidade do tumor relacionando com a recorrência do CEC da cavidade oral. O prognóstico destes pacientes pode estar ainda relacionado ao hospedeiro e, podem ser divididos em imunológicos e não imunológicos.

Desde a época de Ehrlich em 1879[18], tem-se a ideia que o infiltrado linfocitário dos tecidos é um indicador da resposta imunológica do hospedeiro contra o tumor e que sua presença pode refletir uma sobrevida mais longa e, tal assunto tem sido objeto de pesquisas e discussões há muito tempo[18]. O prognóstico de pacientes portadores de câncer tende a ser melhor quando existe um infiltrado linfocitário tumoral mais intenso. Este fenômeno foi relatado pela primeira vez em melanomas e depois observado em outros tipos de câncer[13]. A presença da infiltração linfocitária é um fenômeno comum a várias neoplasias, incluindo o CEC da cavidade oral[12]. A classificação internacional de tumores malignos TNM é utilizada para a avaliação da extensão da doença e, esta classificação ainda hoje é a mais utilizada[19].

O objetivo do presente estudo é caracterizar pela técnica imuno-histoquímica, o infiltrado inflamatório linfocitário presente em biópsias de CEC da língua e soalho de boca, analisando seu valor prognóstico por correlação dos achados, com os dados do estadiamento TNM e com a probabilidade de sobrevida dos doentes.

MÉTODO

Foram revisados e analisados retrospectivamente 138 pacientes portadores de CEC da cavidade oral, levantados a partir de relatórios de biópsias do Departamento de Anatomiapatológica e aplicado um questionário aos prontuários. Foram estudados apenas doentes cujas biópsias eram de sítios primários na língua e/ou no soalho da boca e sem tratamento prévio. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (83%), entre a quarta e a sétima décadas da vida, sendo que 91% dos pacientes estudados eram tabagistas e 72% etilistas. A amostra populacional ficou constituída por 57 pacientes. Destes, foram excluídos 3 casos nos quais houve insuficiência de tecido na biópsia e 8 casos, nos quais houve perda do material fixado à lâmina. Portanto, a avaliação de parâmetros do infiltrado inflamatório foi realizada em 46 pacientes.

Em relação ao estadiamento, 8 eram estádio I, 4 estádio II, 18 estádio III e 16 estádio IV. Em relação ao 'N', 18 eram 'N0' e 28 eram 'N+'. Ao final do estudo, 26 pacientes tinham ido a óbito pela doença ou estavam com

evidência de doença (CED), um paciente foi a óbito por outro motivo, enquanto que 11 encontravam-se sem evidência de doença (SED). Em 8 pacientes não puderam ser obtidas informações quanto à evolução da doença. O período de seguimento variou de no mínimo três anos a no máximo seis anos.

Todas as biópsias dos 46 pacientes foram fixadas em formalina 10% e incluídas em parafina. As reações imuno-histoquímicas em secções de parafina foram realizadas, usando-se o método avidina-biotina-peroxidase, utilizando-se os seguintes anticorpos (DAKO Co.®): CD45RO, UCHL1: anticorpo monoclonal que reconhece especificamente o marcador de superfície CD45 que ocorre na maioria das células T. CD20, L26: anticorpo monoclonal que é dirigido contra um antígeno presente na maioria das células B. CD45RO, OPD4: anticorpo monoclonal OPD4, pertencente ao grupo do CD45RO, que fixa-se fortemente na membrana de linfócitos com fenótipos auxiliares/indutores. CD8, C8/144B: anticorpos monoclonais que reagem com uma proteína equivalente à molécula de CD8, fixando-se nas células T citotóxicas/supressoras.

Após o preparo dos cortes de parafina em lâminas siliconizadas para aumentar a sua aderência, realizaram-se as reações de imunoperoxidase, utilizando os anticorpos acima descritos. A reação de imunoperoxidase compreendeu as etapas de desparafinização e de coloração, como descrito por Hsu *et al* [20]. Foram avaliadas as características do infiltrado linfocitário em biópsias de CEC de língua e soalho da boca, associando os achados a índices de prognóstico conhecidos (TNM) e também a sobrevida. Estas características foram: infiltrado inflamatório geral nas regiões intra e peritumoral, displasia e epitélio normal, infiltrado de linfócitos T (CD45RO+) nas regiões intra e peritumoral, displasia e epitélio normal, infiltrado de linfócitos B (CD20+) nas regiões intra e peritumoral, displasia e epitélio normal, quantidade de linfócitos T CD4+ nas regiões intra e peritumoral, quantidade de linfócitos T CD8+ nas regiões intra e peritumoral, razão CD4/CD8 nas regiões intra e peritumoral.

Os índices de prognóstico a serem confrontados com os dados do infiltrado inflamatório foram agrupados da seguinte forma: ausência ou presença de metástases cervicais (N0 ou N+), estadiamento TNM da doença (Estádio I+II ou estádio III+IV), sobrevida dos pacientes (SED-sem evidência de doença e CED-com evidência de doença ou óbito), Com o objetivo de se avaliar a associação dos parâmetros do infiltrado inflamatório estudados com o prognóstico, os dados foram analisados através de tabelas cruzadas, sendo utilizado o Teste Qui-Quadrado, quando válido, e o Teste Exato de Fisher, com exceção das análises do CD4 e CD8, para as quais foi utilizado o Teste Não-Paramétrico de Wilcoxon. As lâminas foram analisadas em microscopia óptica, utilizando-se aumento de 40X e objetiva de 10mm, sendo avaliados os seguintes parâmetros histopatológicos: grau de diferenciação do CEC, padrão de invasão, intensidade do infiltrado inflamatório geral, intensidade do infiltrado de linfócitos T, intensidade do infiltrado de linfócitos B, contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ em três campos distintos e em cortes seriados. Todos os parâmetros foram analisados, em parte dos casos, na região intratumoral, na região peritumoral, no epitélio displásico e no epitélio normal.

O grau de diferenciação foi avaliado como bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado. O padrão de invasão foi avaliado como compressivo, cordões grossos, cordões finos, células isoladas ou como *in situ* (não invasivo). A intensidade do infiltrado inflamatório geral foi avaliada semiquantitativamente, sendo denominado como intenso (+ + +), moderado (+ +), discreto (+) ou ausente (0). A intensidade do infiltrado inflamatório de linfócitos T e B foi avaliada semiquantitativamente, sendo chamado de intenso (maior que 60 células/campo), moderado (30 a 60 células/campo) e escasso (menor que 30 células/campo) ou ausente. A avaliação dos linfócitos CD4+ e CD8+ foi realizada de modo quantitativo, contando-se as células em três campos distintos e obtendo-se a média aritmética.

As proporções entre as contagens de linfócitos CD4+ e linfócitos CD8+ foram obtidas no tecido peri e intratumoral, quando possível, estabelecendo-se a proporção maior ou menor que a unidade como parâmetro para a análise. Os casos foram, avaliados também, quanto ao aspecto das lesões neoplásicas, descrito nos prontuários, como úlcero-infiltrativo, úlcero-vegetante, vegetante, ulcerado, leucoplásico ou eritroplásico. Os dados obtidos da análise do infiltrado inflamatório foram confrontados com dados do estadiamento TNM e com a sobrevida dos doentes. Construíram-se grupos de acordo com o estádio TNM (I+II e III+IV) e a situação do 'N' (N0 e N+). Os achados do infiltrado inflamatório geral e dos subtipos linfocitários (B, T, CD4+ e CD8+) foram confrontados com cada um dos grupos e com curvas de probabilidade de sobrevida, visando à obtenção de correlação anatomoclínica, bem como, inferências prognósticas.

RESULTADOS

A análise do infiltrado inflamatório geral intratumoral foi possível em 44 doentes, do total de 46 que foram avaliados. Na maioria dos casos, o infiltrado inflamatório geral intratumoral era leve (65,9%), sendo moderado em 29,5% e intenso em raros casos (4,5%). Ao se confrontar essa análise com a presença de metástases cervicais (N+) e com o estadiamento TNM, obteve-se um índice de significância de p=0,0029 e p=0,0047 respectivamente. As curvas de sobrevida para as diversas intensidades do infiltrado inflamatório geral intratumoral não mostraram diferenças significativas (p=0,7957).

A análise do infiltrado inflamatório geral peritumoral foi possível em 28 casos dos 46 pacientes estudados. Em contraste com o infiltrado intratumoral, era intenso em 17 casos (60,7%), sendo leve e moderado em 11 (39,2%).

As correlações desse parâmetro com o "N+" e com o

estadiamento TNM não obtiveram significância (p=0,435 e p= 0,419, respectivamente). As curvas de sobrevida para as diversas intensidades do infiltrado inflamatório geral peritumoral não mostraram diferenças significativas (p=0,6932).

A análise do infiltrado inflamatório geral no epitélio normal e no epitélio displásico foi possível em 20 casos e em seis casos, respectivamente. Observou-se que o infiltrado era leve em 60% dos epitélios normais, contrastando com as áreas de epitélio displásico, nas quais o infiltrado inflamatório sempre era moderado ou intenso. Notou-se que, à medida que se afastava do tumor, ocorria uma diminuição do infiltrado inflamatório.

A análise do infiltrado linfocitário T intratumoral foi possível em 44 casos. Observou-se que era leve, moderado e intenso em 31,8%, 38,6% e 29,5% dos casos respectivamente, não havendo correlação significativa entre esse parâmetro e o "N+" ou com o estadiamento TNM. As curvas de probabilidade de sobrevida para as diversas intensidades do infiltrado linfocitário T intratumoral não apresentaram diferenças significativas (p=0,5504).

A análise do infiltrado linfocitário T peritumoral foi possível em 27 casos. Na maioria dos casos ele era intenso (81,5%). As suas correlações com o 'N+'e com o estadiamento TNM não se mostraram significativas (p=0,621 e p=1,000 respectivamente).

A análise do infiltrado linfocitário B intratumoral foi possível em 44 casos. Em 52,2% dos casos, o infiltrado mostrava-se ausente e era leve ou moderado em 47,7% dos casos. Em nenhum caso foi observado como intenso.

A correlação com o 'N+' mostrou significância (p=0,0072), sendo que quando o infiltrado estava ausente havia presença de metástases cervicais em 82,61% dos casos, enquanto que quando o infiltrado estava presente esta porcentagem era de 42,86%. As curvas de sobrevida para as diversas intensidades do infiltrado linfocitário B intratumoral não mostraram diferenças significativas (p=0,8486).

A análise do infiltrado de linfócitos B peritumoral foi possível em 27 casos. Era ausente ou leve em aproximadamente metade dos casos, diferindo do infiltrado linfocitário T que se mostrava intenso na maioria dos casos. As correlações com o 'N+' e com o estadiamento TNM não mostraram significância (p=0.440 e p=0,209 respectivamente). As curvas de sobrevida para as diversas intensidades de infiltrado linfocitário B peritumoral não apresentaram diferenças significativas (p=0,7905).

A análise do infiltrado de linfócitos T, CD4+, foi possível em 44 casos nas áreas intratumorais e em 27 casos nas áreas peritumorais. Observou-se uma maior concentração desse subtipo de linfócito nas áreas peritumorais em relação às áreas intratumorais, áreas de displasia e epitélio normal. As correlações dos achados com o 'N+' e com o estadiamento TNM não mostraram significância.

A análise do infiltrado de linfócitos T, CD8+, foi possível em 40 casos nas áreas intratumorais e em 25 casos nas áreas peritumorais. Observou-se um maior número desse subtipo de linfócito nas áreas peritumorais em relação às outras áreas estudadas (intratumorais, displasia e epitélio normal). Não se encontrou correlação significativa com o 'N+' ou com o estadiamento TNM.

A análise da razão entre os linfócitos auxiliares ou indutores e os linfócitos citotóxicos ou supressores no parênquima tumoral foi possível de ser medida em 40 casos. Observou-se que ela era menor ou igual a 1 em 60% dos casos e maior que 1 em 40% dos casos, ou seja, na maior parte dos casos havia mais ou igual número de linfócitos citotóxicos ou supressores (CD8+) dentro do tumor do que linfócitos auxiliares ou indutores (CD4+). As correlações com o 'N+' e com o estadiamento TNM não mostraram significância. As curvas de probabilidade de sobrevida dos dois grupos não mostraram diferenças significativas (p=0,6836).

A análise da proporção entre linfócitos auxiliares ou indutores (CD4+) e linfócitos citotóxicos ou supressores (CD8+) no estroma peritumoral foi possível em 25 casos. Observou-se que essa proporção era menor ou igual a 1 em 48% dos casos e era maior que 1 em 52%, indicando que, na maior parte dos casos, havia um número menor de linfócitos CD8+ em relação ao número de linfócitos CD4+ na periferia do tumor, inversamente ao observado nas áreas intratumorais. As correlações com o 'N+' e com o estadiamento TNM não mostraram significância. As curvas de probabilidade de sobrevida dos dois grupos não mostraram diferenças significativas (p=0,3093) entre si.A avaliação da sobrevida foi possível em 38 doentes dos 46 estudados. A probabilidade de sobrevida global destes doentes foi de 20% em 5 anos. As análises de probabilidade de sobrevida conforme o 'N' e conforme o estadiamento TNM, mostraram diferenças com significância estatística ($p < 0,05$). O grau de diferenciação pôde ser analisado em 44 casos dos 46 estudados, sendo que a maioria foi classificada como moderadamente diferenciado (34 casos) e oito como pouco diferenciados. Em dois casos, o carcinoma era *in situ* noepitélio. Não houve casos de carcinomas bem diferenciados na amostra e dois pacientes não puderam ser analisados. O modo de invasão foi analisado nos fragmentos das biópsias, sendo que a maioria foi classificada como de cordões grossos em 34 casos (77%), oito como cordões finos (18%) e dois como infiltração em células isoladas (5%).

DISCUSSÃO

A avaliação dos parâmetros do infiltrado inflamatório estudados, não foi possível em todos os casos da amostra, por causa de insuficiência de tecido nas biópsias, perda do material fixado à lâmina ou problemas na técnica imuno-histoquímica que não permitiram a identificação das áreas ou das células a serem analisadas. Dos 46 casos estudados, em 44, obteve-se a análise qualitativa do infiltrado inflamatório geral intratumoral, que se apresentou como leve (+) na maioria, ou seja, em 29 casos. Esse infiltrado mostrou-se constituído pre-

dominantemente por linfócitos e encontrava-se no tecido conjuntivo que permeava os blocos tumorais.

Em 28 casos obteve-se a avaliação do infiltrado inflamatório geral peritumoral que se mostrou leve (+) em 2 casos, moderado em 9 casos (+ +) e intenso (+ + +) em 17 casos. Esse infiltrado era constituído predominantemente por linfócitos, sendo que plasmócitos e neutrófilos polimorfonucleares também estavam presentes em menor quantidade, a não ser em áreas adjacentes a focos de necrose, onde a quantidade de neutrófilos predominava, de acordo com o que relataram outros autores[21]. A intensidade do infiltrado inflamatório geral peritumoral era nitidamente superior à intensidade do infiltrado inflamatório intratumoral em todos os casos, semelhante ao encontrado por outros autores[8]. A análise do infiltrado peritumoral foi possível em uma quantidade menor de casos, em relação à análise intratumoral, pelo fato de que em várias biópsias obteve-se, apenas, amostra do tumor, sem representação da sua periferia. O infiltrado inflamatório geral foi também analisado no epitélio normal adjacente ao tumor e nas áreas de displasia, sendo que tais avaliações foram possíveis em 20 e em 6 casos, respectivamente. Observou-se que ao nível do epitélio normal, 12 casos tinham infiltrado leve (+) enquanto que, ao nível do epitélio displásico, todos os casos apresentavam infiltrado moderado (+ +) ou intenso (+ + +). As células predominantes nesses infiltrados também eram linfócitos. A diferenciação semiquantitativa entre linfócitos T e linfócitos B mostrou predominância dos linfócitos T, tanto dentro do tumor, como ao redor do mesmo, da mesma forma encontrada por outros autores[8, 22].

A avaliação quantitativa dos subtipos de linfócitos mostrou um discreto predomínio de linfócitos CD8+ nas áreas intratumorais, achado semelhante ao encontrado por Wolf *et al.*[21] que descreveram um proporção maior de linfócitos CD8+ intraparenquimatosos. Apesar dessa preponderância, segundo Wolf *et al.*[21], tais células não teriam atividade citotóxica efetiva (mediada pela produção de interleucina-2) que dependeria da presença e da função normal de linfócitos CD4+. Encontrou-se um discreto predomínio de linfócitos CD4+ nas áreas peritumorais, enquanto outros autores[21, 23] relataram um equilíbrio. Alguns autores,[8, 24] encontraram os subtipos de linfócitos CD4+ e CD8+, mais frequentemente, no tecido peritumoral do que no intratumoral.

A implicação prognóstica dos parâmetros do infiltrado inflamatório foi analisada através de tabelas de dados cruzados que permitiram cálculos estatísticos.

As correlações entre a avaliação qualitativa do infiltrado inflamatório geral e a presença de metástases cervicais (N+) mostraram nível de significância ($p < 0,05$), quando analisamos as áreas intratumorais, que foram aquelas que nos permitiram um maior número de casos para análise. Quanto menor a intensidade do infiltrado, maior a chance de comprometimento neoplásico do pescoço. Esse mesmo parâmetro apresentou significância, quando correlacionado com o estadiamento TNM em que foram confrontados 10 casos em estádio I e II e 34 casos em estádio III e IV. Dentre os pacientes com infiltrado leve (+), 10,34% apresentavam-se no estádio I ou II enquanto que, 89,66% encontravam-se no estádio III ou IV. A avaliação semiquantitativa do infiltrado linfocitário B intratumoral mostrou significância ($p < 0,05$), quando confrontada com a presença de linfonodos cervicais comprometidos (N+) nos 44 casos em que esse parâmetro foi estudado. Assim, entre os casos que tinham infiltrado nulo, 82,61% apresentavam metástases cervicais, enquanto que, entre aqueles que apresentavam infiltrados leve ou moderado, somente 42,86% eram N+. Tais achados contradizem a pouca importância dada ao infiltrado de linfócitos B nas neoplasias malignas, uma vez que não se encontraram achados semelhantes na literatura. Sabe-se que ocorre um aumento nas concentrações séricas de IgA em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço[25], indicando que, talvez, a resposta imune humoral possa desempenhar algum papel nesses tumores.

Os outros parâmetros de infiltrado inflamatório estudados não apresentaram graus de significância estatística, quando confrontados com os grupos de N0, N+, I+II e III+IV, embora, em determinados resultados, observaram-se algumas tendências que, talvez, devido ao número de casos insuficientes não mereceram confirmação estatística.

Assim, notou-se uma quantidade menor de linfócitos CD4+ intratumorais nos casos mais avançados da doença, conforme relatado por outros autores[21,23]. Sabendo-se do pior prognóstico desses casos, os autores sugerem que isso pode refletir um importante defeito na resposta imune ao tumor, explicando que a função intacta dos linfócitos CD4+ é necessária para a ativação dos linfócitos CD8+ citotóxicos. Não se observou aumento significativo nas taxas de metástases linfonodais cervicais, quando a proporção de linfócitos CD4/CD8 era maior que um.

A análise da probabilidade de sobrevida foi possível em 38 pacientes estudados. O período de acompanhamento variou de 3 a 6 anos. Para fins de construção das curvas de Kaplan-Meyer, atribuíram-se valores que variaram de 0,5 a 6, de acordo com o número de anos de sobrevida, a partir do momento da primeira consulta. Os pacientes que apresentaram recidiva da doença foram considerados no mesmo grupo dos que foram a óbito, para efeito de análise estatística.

A curva de sobrevida global dos 38 pacientes mostrou uma probabilidade de 20% de se estar vivo, após um período de 6 anos de acompanhamento. Esse índice global, incluindo todos os estádios da doença, é semelhante ao da literatura para os estádios avançados que apontam uma taxa de sobrevida de 20 a 30% em cinco anos para as lesões avançadas e entre 10 e 65% para os estádios III e IV, sendo que, tais dados da literatura, consideraram todas as áreas anatômicas da boca e não somente a língua e o soalho, como foram considerados neste estudo. A análise das curvas de probabilidade de sobrevida, conforme os parâmetros do infiltrado inflamatório estudados não mostraram diferenças significativas

entre si. Tais curvas de sobrevida foram consideradas para pacientes em diferentes estádios de doença, o que pode confundir a implicação real do valor prognóstico dos parâmetros estudados.

Quanto ao grau de diferenciação do tumor, mostrou-se moderado em 34 casos. Oito biópsias foram classificadas como CEC pouco diferenciados, sendo que nesse grupo observaram-se seis pacientes em estádios avançados III ou IV e seis evoluíram para o óbito. Esses dados não puderam ser analisados do ponto de vista estatístico, pois o número de casos foi insuficiente, mas mostraram uma forte tendência de pior prognóstico para esse grau de diferenciação histológica (pouco diferenciado), denotando que o grau de diferenciação pode ser um fator prognóstico, ao contrário do que relatam outros autores[26, 27]. Observa-se que 87,5% desses pacientes apresentaram uma proporção CD4/CD8 intratumoral menor ou igual a um.

O modo ou padrão de invasão encontrado com maior frequência (34 casos) foi o de cordões grossos, infiltrando os tecidos vizinhos, conforme cita Anneroth *et al*.,[15] em sua graduação de malignidade do CEC da cavidade oral, ao qual chama padrão de invasão tipo 2. Oito casos foram classificados como tipo 3, ou seja, pequenos agrupamentos de células tumorais infiltrativos (cordões finos) e dois casos como tipo 4, ou seja, células individuais e espalhadas (células isoladas ou padrão sarcomatoide). Dos dez casos classificados nesses dois grupos (tipos 3 e 4), oito encontravam-se em estádios avançados da doença (III ou IV) e sete foram a óbito. Observamos que, nesse grupo, 80% dos casos apresentavam a proporção CD4/CD8 intratumoral menor ou igual a um e podem representar um grupo de pior prognóstico.

O principal achado desse estudo é que os linfócitos T constituem o principal componente do infiltrado inflamatório do estroma e do parênquima dos carcinomas espinocelulares da cavidade oral, como evidenciado em outras neoplasias malignas. Ao lado de estudos anteriores da resposta imunológica no câncer da cavidade oral, nos quais foram demonstradas deficiências nas funções dos linfócitos, a análise das subpopulações de linfócitos sugerem que o crescimento progressivo do tumor pode estar associado à falhas na função, regulação ou migração de subtipos de linfócitos, como por exemplo, os linfócitos CD4+, ou mesmo os linfócitos B, no local do tumor[21]. Portanto, o estudo do infiltrado inflamatório que se estabelece no tecido tumoral e peritumoral, pode fornecer dados importantes para o prognóstico e para o tratamento do câncer da cavidade oral, recomendando-se estudos prospectivos com peças cirúrgicas, para a adequada avaliação das áreas intra e peritumorais.

CONCLUSÃO

O linfócito T foi o principal componente da resposta inflamatória (intra e peritumoral) ao CEC da língua e do soalho da boca, sendo que não houve diferença significativa entre a proporção de linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+. A intensidade do infiltrado inflamatório intratumoral (sem discriminar entre linfócitos T ou B) apresentou correlação inversa, estatisticamente significativa, com metástases cervicais e com o estadiamento da doença. A ausência de linfócitos B na região intratumoral apresentou correlação, estatisticamente significativa, com o comprometimento metastático do pescoço. Não houve diferenças estatisticamente significativas, entre as curvas de sobrevida analisadas para os diferentes parâmetros de infiltrado inflamatório, nos casos estudados.

REFERÊNCIAS

1. Afonso Junior W, Sposto MR, Scully C, Navarro CM, Onofre MA. Oral carcinoma and potentially malignant lesions in Brazil. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1994;30B(2):142.
2. Antunes JL, Biazevic MG, de Araujo ME, Tomita NE, Chinellato LE, Narvai PC. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in Sao Paulo, Brazil, 1980-1998. Oral Oncol. 2001 Jun;37(4):345-50.
3. Araujo Filho VJ, De Carlucci Junior D, Sasaki SU, Montag E, Azato FN, Cordeiro AC, et al. [Incidence of oral cancer profile at a general hospital in Sao Paulo]. Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo. 1998 May-Jun;53(3):110-3.
4. Stucken E, Weissman J, Spiegel JH. Oral cavity risk factors: experts opinions and literature support. J Otolaryngol Head Neck Surg. 2010 Feb 1;39(1):76-89.
5. Mannarini L, Kratochvil V, Calabrese L, Gomes Silva L, Morbini P, Betka J, et al. Human Papilloma Virus (HPV) in head and neck region: review of literature. Acta Otorhinolaryngol Ital. 2009 Jun;29(3):119-26.
6. Stell PM. Prognosis in mouth cancer: host factors. J Laryngol Otol. 1992 May;106(5):399-402.
7. Watanabe Y, Katou F, Ohtani H, Nakayama T, Yoshie O, Hashimoto K. Tumor-infiltrating lymphocytes, particularly the balance between CD8(+) T cells and CCR4(+) regulatory T cells, affect the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. May;109(5):744-52.
8. Hirota J, Ueta E, Osaki T, Ogawa Y. Immunohistologic study of mononuclear cell infiltrates in oral squamous cell carcinomas. Head Neck. 1990 Mar-Apr;12(2):118-25.
9. Hiratsuka H, Imamura M, Ishii Y, Kohama G, Kikuchi K. Immunohistologic detection of lymphocyte subpopulations infiltrating in human oral cancer with special reference to its clinical significance. Cancer. 1984 Jun 1;53(11):2456-66.
10. Wadia P, Rao D, Pradhan T, Pathak A, Chiplunkar S. Impaired lymphocyte responses and their restoration in oral cancer patients expressing distinct TCR variable region. Cancer Invest. 2008 Jun;26(5):471-80.
11. Liavaag PG, Johannessen AC, Nilsen R, Jonsson R. Analysis of T-cell receptor expressing lymphocytes infiltrating squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. Eur Arch Otorhinolaryngol. 1994;251(8):452-6.
12. Stephens M, Lim K, Stephens P, Thomas DW, Lim SH. Molecular characterisation of tumour infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. Cancer Immunol Immunother. 1998 Mar;46(1):34-40.
13. Young MR, Wright MA, Lozano Y, Matthews JP, Benefield J, Prechel MM. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of the cancer. Int J Cancer. 1996 Jul 29;67(3):333-8.
14. Hartmann E, Wollenberg B, Rothenfusser S, Wagner M, Wellisch D, Mack B, et al. Identification and functional analysis of tumor-infiltrating plasmacytoid dendritic cells in head and neck cancer. Cancer Res. 2003 Oct 1;63(19):6478-87.
15. 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 Jun;95(3):229-49.
16. Kligerman J, Lima RA, Soares JR, Prado L, Dias FL, Freitas EQ, et al. Supraomohyoid neck dissection in the treatment of T1/T2 squamous cell carcinoma of oral cavity. Am J Surg. 1994 Nov;168(5):391-4.
17. Bidaud P, Chasle J, Sichel F, Rousseau S, Petit P, Pottier D, et al. Expression of p53 family members and CD44 in oral squamous cell car-

cinoma (OSCC) in relation to tumorigenesis. Histol Histopathol. 2010 Mar;25(3):331-9.
18. Kreider JW, Bartlett GL, Butkiewicz BL. Relationship of tumor leucocytic infiltration to host defense mechanisms and prognosis. Cancer Metastasis Rev. 1984;3(1):53-74.
19. Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. CA Cancer J Clin. 2005 Jul-Aug;55(4):242-58; quiz 61-2, 64.
20. Hsu SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. J Histochem Cytochem. 1981 Apr;29(4):577-80.
21. Wolf GT, Hudson JL, Peterson KA, Miller HL, McClatchey KD. Lymphocyte subpopulations infiltrating squamous carcinomas of the head and neck: correlations with extent of tumor and prognosis. Otolaryngol Head Neck Surg. 1986 Sep;95(2):142-52.
22. Rabin BS, Johnson J, Claassen D. Identification of subsets of lymphocytes infiltrating head and neck tumor tissue: a preliminary report. Laryngoscope. 1984 May;94(5 Pt 1):688-90.
23. Kobayashi J, Hirohashi Y, Torigoe T, Michifuri Y, Yamamoto T, Tamura Y, et al. Clonal diversity of cytotoxic T lymphocytes that recognize autologous oral squamous cell carcinoma. Hum Immunol. 2009 Feb;70(2):89-95.
24. Feinmesser M, Okon E, Schwartz A, Kaganovsky E, Hardy B, Aminov E, et al. Histologic and immunohistochemical characterization of tumor and inflammatory infiltrates in oral squamous cell carcinomas treated with local multikine immunotherapy: the macrophage at the front line. Eur Arch Otorhinolaryngol. 2004 Aug;261(7):359-68.
25. Scully C. Immunology and oral cancer. Br J Oral Surg. 1983 Jun;21(2):136-46.
26. Scholl P, Byers RM, Batsakis JG, Wolf P, Santini H. Microscopic cut-through of cancer in the surgical treatment of squamous carcinoma of the tongue. Prognostic and therapeutic implications. Am J Surg. 1986 Oct;152(4):354-60.
27. Gleich LL, Ryzenman J, Gluckman JL, Wilson KM, Barrett WL, Redmond KP. Recurrent advanced (T3 or T4) head and neck squamous cell carcinoma: is salvage possible? Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2004 Jan;130(1):35-8.