VINICIUS DE LIMA VAZQUEZ

**Fatores prognósticos em portadores de
carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e
extremidades localmente avançado**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. André Lopes Carvalho

São Paulo

2009

VINICIUS DE LIMA VAZQUEZ

**Fatores prognósticos em portadores de
carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e
extremidades localmente avançado**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. André Lopes Carvalho

São Paulo

2009

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Vazquez, Vinicius de Lima

Fatores prognósticos em portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades localmente avançado / Vinicius de Lima Vazquez. -- São Paulo, 2009.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Departamento de Radiologia.

Área de concentração: Oncologia.

Orientador: André Lopes Carvalho.

Descritores: 1.Carcinoma de células escamosas 2.Marcadores genéticos 3.Prognóstico 4.Metástase linfática 5.Imunoistoquímica

Aos meus pais Eugênio e Yvete, que me mostraram com exemplo e grande motivação os primeiros passos na trilha do conhecimento; Aos meus irmãos Claus e Fabiana, incentivadores de todas as minhas conquistas; À minha esposa Fernanda e meu filho Francisco, principais razões da minha existência.

Agradecimentos

Aos pacientes e acompanhantes dos Hospitais de Câncer de Barretos e Amaral Carvalho de Jaú, que humildemente possibilitaram a realização deste trabalho.

À diretoria do Hospital de Câncer de Barretos, pelo apoio ao ensino e pesquisa e ao desenvolvimento da pós-graduação na instituição.

Ao amigo e Prof. Dr. André Lopes Carvalho, orientador presente, solícito, exemplo de saber e de ser, minha gratidão pelas lições, amizade e disponibilidade em todos os momentos da preparação desta tese.

À amiga Prof.^a M.^a Natália Martins Perpetuo, pelo trabalho árduo da coleta de dados de prontuários, busca ativa de informações, sempre com grande disposição.

Ao amigo Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto, pelo grande desprendimento, conhecimento e energia empregado na revisão histopatológica e análise dos “Tissue Micro Arrays”, qualidades estas que foram cruciais para que este estudo fosse concretizado.

Ao amigo Dr. Teóclito Sachetto, pela paciência e trabalho na revisão histopatológica e separação dos blocos de parafina.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares pela confecção dos Tissue Micro Arrays no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo.

À amiga Rute Maria Martins Capra, funcionária do Hospital Amaral Carvalho, pela preciosa colaboração, sem a qual este estudo multi-institucional não se realizaria.

Aos colegas e amigos Dr. Romeu Frisina Filho, Ary Assumpção Jr. e José Getúlio Martins Segalla do Hospital Amaral Carvalho, pelo conhecimento e companheirismo no início do meu trabalho, parte dele frutificado neste estudo.

Aos colegas e amigos do departamento de cirurgia do Hospital de Câncer de Barretos, em especial aos companheiros de todas as horas Dr.

Antônio Talvane Torres de Oliveira, Dr. Durval Renato Wohnrath e Prof. Dr. Gilberto Fava, que com dedicação e paciência preencheram minhas eventuais ausências na prática clínica e possibilitaram o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Anatomia Patológica e Arquivo (SAME) do Hospital de Câncer de Barretos pela preparação técnica das lâminas e separação dos prontuários.

À secretária Gisele Castanheira de Carvalho, de eficiência ímpar, pela inestimável ajuda.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação: 2005. Disponível on line: http://www.fm.usp.br/gdc/docs/biblioteca_74_manualfm.pdf

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

SUMÁRIO

Lista de figuras.....	X
Lista de tabelas.....	XI
Lista de gráficos.....	XIII
Lista de siglas.....	XIV
Resumo.....	XVI
Summary.....	XVIII
1 Introdução.....	2
1.1 Epidemiologia.....	2
1.2 Fatores relacionados ao prognóstico do carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades.....	4
1.2.1 Fatores clínicos.....	4
1.2.2 Fatores anatomopatológicos.....	8
1.2.3 Fatores moleculares relacionados ao carcinoma epidermóide cutâneo de tronco extremidades.....	10
2 Objetivo.....	18
3 Métodos.....	20
3.1 Amostra.....	20
3.1.1 Critérios de inclusão.....	20
3.1.2 Critérios de exclusão.....	21
3.1.3 Obtenção dos dados clínicos e epidemiológicos.....	21
3.1.4 Obtenção dos dados anatomopatológicos.....	22
3.1.5 Obtenção dos dados referentes aos marcadores moleculares.....	25
3.1.5.1 Seleção das áreas de interesse e confecção dos blocos de microarranjo de tecidos (TMA).....	25
3.1.5.2 Coleção de Lâminas a partir do TMA.....	26
3.1.5.3 Reação imunohistoquímica.....	26

3.1.5.4	Avaliação das imunoexpressões.....	29
3.2	Análise descritiva e de associação de fatores prognósticos relacionados a sobrevida e a metástases linfonodais.....	31
4	Resultados.....	41
4.1	Características demográficas/epidemiológicas e descritivas da amostra.....	41
4.1.1	Dados clínicos e epidemiológicos.....	41
4.1.2	Características anatomopatológicas das amostras.....	43
4.1.3	Características dos marcadores moleculares nos tumores primários.....	45
4.2	Análise de associação entre variáveis clínicas, anatomopatológicas e moleculares e o surgimento de metástases linfonodais.....	47
4.3	Análise comparativa de sobrevida específica por câncer univariada de acordo com as diferentes variáveis clínicas, anatomopatológicas e moleculares dos tumores primários e marcadores moleculares nas metástases.....	51
4.3.1	Tempo de seguimento e sobrevida específica por câncer em toda amostra.....	51
4.3.2	Análise das variáveis clínicas.....	52
4.3.3	Análise das variáveis anatomopatológicas.....	56
4.3.4	Análise das variáveis moleculares.....	59
4.4	Análise comparativa de sobrevida específica por câncer multivariada.....	63
5	Discussão.....	66
5.1	Análise descritiva.....	66
5.2	Fatores prognósticos relacionados ao risco de metástases linfonodais.....	70
5.3	Fatores prognósticos relacionados à sobrevida específica por câncer.....	76

6	Conclusões.....	84
7	Anexos.....	86
8	Referências.....	92
9.	Apêndice	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Microfotografia. Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo EGFR (aumento 100x).....	33
Figura 2	Microfotografia. Marcação imunohistoquímica negativa do anticorpo HER-2(aumento 100x).....	34
Figura 3	Microfotografia. Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo HER-3 (aumento 100x).....	35
Figura 4	Microfotografia. Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo HER-4 (aumento 100x).....	36
Figura 5	Microfotografia. Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo E-caderina, evidenciando a expressão membranosa (aumento 400x).....	37
Figura 6	Microfotografia. Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo E-caderina, evidenciando a expressão citoplasmática (aumento 400x).....	38
Figura 7	Microfotografia. Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo D2-40 (podoplanina) (aumento 400x).....	39

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Detalhes sobre os anticorpos utilizados e os sistemas de recuperação antigênica e de amplificação do sinal.....	27
Tabela 2	Características clínicas e epidemiológicas dos 63 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades.....	42
Tabela 3	Características clínicas e de tratamento dos 63 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidade.....	43
Tabela 4	Características histopatológicas dos 55 carcinomas epidermóides cutâneos primários de tronco e extremidades.....	44
Tabela 5	Expressão dos marcadores moleculares por imunohistoquímica em TMA de 55 carcinomas epidermóides cutâneos primários de tronco e extremidades e 25 metástases linfonodais.....	46
Tabela 6	Correlação entre variáveis clínicas e a presença ou surgimento de metástases linfonodais em 55 portadores de carcinoma epidermóide cutâneos de tronco e extremidades.....	48
Tabela 7	Correlação entre variáveis anatomopatológicas e a presença ou surgimento de metástases linfonodais em 55 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades.....	49
Tabela 8	Correlação entre variáveis moleculares e a presença ou surgimento de metástases linfonodais em 55 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades.....	50

Tabela 9	Sobrevida específica por câncer nos 63 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme diferentes variáveis clínicas.....	54
Tabela 10	Sobrevida específica por câncer nos 55 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme diferentes variáveis anatomopatológicas identificadas nos tumores primários.....	57
Tabela 11	Sobrevida específica por câncer nos 55 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme diferentes variáveis moleculares identificadas nos tumores primários pelo método de imunohistoquímica.....	60
Tabela 12	Sobrevida específica por câncer nos 25 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme diferentes variáveis moleculares identificadas nos tumores metastáticos linfonodais pelo método de imunohistoquímica.....	62
Tabela 13	Análise multivariada pelo método de regressão de Cox para sobrevida específica por câncer com a variável linfonodal N0-N1..	64
Tabela 14	Análise multivariada pelo método de regressão de Cox para sobrevida específica por câncer com a variável linfonodal N0f, N1f e N1.....	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Sobrevida específica por câncer nos 63 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo localmente avançado de tronco e extremidades.....	52
Gráfico 2	Curva de sobrevida específica por câncer nos 63 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme classificação T.....	53
Gráfico 3	Curva de sobrevida específica por câncer nos 63 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme estágio clínico.....	55
Gráfico 4	Curva de sobrevida específica por câncer nos 63 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme presença ou surgimento de metástases linfonodais.....	56
Gráfico 5	Curva de sobrevida específica por câncer nos 55 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme grau de diferenciação histológica dos tumores primários.....	58
Gráfico 6	Curva de sobrevida específica por câncer nos 55 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme expressão de podoplanina nos tumores primários pela reação de imunohistoquímica.....	61
Gráfico 7	Curva de sobrevida específica por câncer nos 25 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme expressão de HER-4 nas metástases linfonodais pela reação de imunohistoquímica.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

CECTE	Carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades
MMSS	Membros superiores
MMII	Membros inferiores
n	Número de casos
n/c	Não consta
=	Igual
/	Por
+	Positivo
x	Vezes
%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
H₂O₂	Água oxigenada
NaN₃	Ázida de sódio
p	Valor estatístico de p
mm	Milímetro
CGA	Campo de grande aumento
DP	Desvio padrão
EC	Estádio clínico
EP	Erro padrão
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EUA	Estados Unidos da América
HER	Human epidermal receptor
HR	Hazard ratio
IC	Intervalo de confiança
M	Classificação M (metástase distante)
N	Classificação N (metástase linfonodal)
PBS	Phosphat buffer solution
rt-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SC	Estado de Santa Catarina
SP	Estado de São Paulo

T	Classificação T (tumor primário)
TMA	Tissue micro array
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultravioleta

RESUMO

Vazquez, V.L. *Fatores prognósticos em portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades localmente avançado* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2009. 101p.

O carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades (CECTE) é doença localizada e tratável na maioria dos casos, com alta prevalência tanto em nosso meio como mundialmente. Apesar disto, pode cursar com progressão local, metastatização regional e distante, com morbidade e mortalidade. Fatores prognósticos relacionados a doença localmente avançada são pouco conhecidos e pesquisados. Este estudo objetiva conhecer a expressão de marcadores moleculares da família HER (EGFR, HER-2, HER-3, HER-4), E-caderina e podoplanina além de fatores clínicos, anatomopatológicos e dos próprios marcadores moleculares relacionados a metástases linfonodais e prognóstico em portadores de CECTE localmente avançado. A análise realizada foi retrospectiva com 63 pacientes de duas instituições – Hospital de Câncer de Barretos e Amaral Carvalho de Jaú, portadores de CECTE localmente avançado (T3 e T4), através de pesquisa em prontuário dos pacientes, revisão dos blocos de parafina e lâminas para análise de dados anatomopatológicos e confecção de “Tissue Micro Array” para análise por técnica de imunohistoquímica da expressão dos marcadores da família HER, E-caderina e podoplanina nos tumores primários e nas metástases linfonodais quando presentes. Como resultados, tivemos no tumor primário EGFR com expressão aumentada (positiva) em 25,5% dos casos, HER-2 negativa em todos, HER-3 positiva em 87,3% e HER-4 em 47,3%, E-caderina positiva na membrana em 47,3% e citoplasma em 29,1%, podoplanina positiva em 29,1%. Nas metástases linfonodais EGFR teve expressão positiva em 40,0%, HER-2 negativa em todos, HER-3 positiva em 84%, HER-4 positiva em 44,0%, E-caderina positiva na

membrana em 28,0% e 3,6% no citoplasma, e a podoplanina em 40,0%. O infiltrado linfocitário intratumoral foi o único fator associado a presença de metástases linfonodais (53,3% contra 16,4%; $p=0,046$). Pacientes com tumores T3 tiveram maior taxa de sobrevida específica por câncer em cinco anos que os T4 (62,5% contra 26,8%; $p=0,012$) e pacientes sem metástases linfonodais tiveram maior taxa de sobrevida que pacientes com metástases durante o seguimento e metástases à apresentação (79,4% contra 39,6% contra 20,6%; $p=0,021$). Pacientes com tumores indiferenciados tiveram menor taxa de sobrevida (23,8% contra 82,2%; $p=0,010$), assim como aqueles portadores de tumores com expressão aumentada de podoplanina (23,5% contra 71,9%; $p=0,018$). A diferença de sobrevida dos fatores acima relacionados manteve-se na análise multivariada. Nas metástases linfonodais a maior expressão de HER-4 foi relacionada a menor taxa de sobrevida (37,5% contra 53,3%; $p=0,038$). Como conclusão determinou-se a expressão dos marcadores da família HER, E-caderina e podoplanina no CECTE localmente avançado; O infiltrado linfocitário intratumoral foi associado ao surgimento de metástases linfonodais; portadores de tumores T3, baixo grau histológico, N0 e podoplanina negativos tiveram maiores taxas de sobrevida. Os pacientes com metástases linfonodais HER-4 positivas apresentaram menor taxa de sobrevida.

Descritores: Carcinoma de células escamosas; Marcadores genéticos; Prognóstico; Metástase linfática; Imunoistoquímica

SUMMARY

Vazquez, V.L. *Prognostic factors in patients with locally advanced cutaneous squamous cell carcinoma of trunk and extremities* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2009. 101p.

Cutaneous squamous cell carcinoma of trunk and extremities is a local and easily treatable disease in most of cases, with high prevalence in our community and worldwide. Despite of this, it can present local progression, regional (lymph node) and distant metastasis with morbidity and mortality. Prognostic factors related to locally advanced disease are not well established being reported in few studies. The aim of this study is to determine the expression of molecular markers as HER family (EGFR, HER-2,HER-3, HER-4), E-cadherin, podoplanin, and clinical and histopathological factors related to lymph node metastasis and prognosis in patients with locally advanced cutaneous squamous cell carcinoma of trunk and extremities (CSCCTE). There were 63 patients studied from two institutions: Hospital Amaral Carvalho de Jaú and Hospital de Câncer de Barretos with locally advanced CSCCTE (T3 and T4), retrospectively analyzed through review of medical records and tumor paraffin blocks and slides, and construction of a Tissue Micro Array for immunohistochemical analysis of molecular markers expression in the primary tumors and lymph node metastasis. The results showed in the primary tumor, EGFR positive (hyperexpression) in 25,5%, HER-2 negative in all, HER-3 positive in 87,3% and HER-4 in 47,3%. E-cadherin was positive in the membrane in 47,3% and in the cytoplasm in 29,1% and podoplanin was positive in 29,1%. Lymph node metastasis expression: EGFR was positive in 40,0%, HER-2 negative in all, HER-3 positive in 84%, HER-4 positive in 44,0%. E-cadherin was positive in the membrane in 28,0% and 3,6% in the cytoplasm. Podoplanin was positive in 40,0%. Intratumoral lymphocytic infiltrate was the only factor related to lymph node metastasis (53,3% contra 16,4%; $p=0,046$). Patients

with T3 tumors presented higher cancer specific 5-years survival rate than T4 ones (62,5% contra 26,8%; $p=0,012$) and patients without lymph node metastasis presented higher cancer survival rate than those presenting initially and during follow-up (79,4% contra 39,6% contra 20,6%; $p=0,021$). Patients with undifferentiated tumors presented lower survival rate (23,8 % contra 82,2%; $p=0,010$), as well as patients with podoplanin hyperexpression (23,5% contra 71,9%; $p=0,018$). All these differences in survival rates were sustained in multivariate analysis. Considering patients with lymph node metastasis, those with HER-4 hyperexpression presented lower survival rate (37,5% contra 53,3%; $p=0,038$). In conclusion, the expression of HER family, E-cadherin and podoplanin were determinate in this specific patient setting; Intratumoral lymphocytic infiltrate was the only factor related to lymph node metastasis; Patients with T3 tumors, low histological grade, N0 and negative primary tumor expression of podoplanin presented higher survival rates. Metastatic patients to the lymph nodes with metastasis positivity to HER-4 presented lower survival rate.

Descriptors: Squamous Cell; Genetic Markers; Prognosis; Lymphatic Metastasis; Immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

As neoplasias cutâneas não melanoma constituem o grupo de tumores mais incidentes na população branca mundial com aumento de casos novos com o tempo.¹⁻³ A exposição à luz ultravioleta (UV), geralmente de origem solar, é fator de risco diretamente relacionado ao câncer cutâneo não melanoma, sendo o aumento de incidência relacionado provavelmente por uma combinação de aumento de exposição solar ou luz UV com valorização das atividades ao ar livre, mudanças no modo de vestir, aumento da longevidade e depleção da camada de ozônio da atmosfera.^{2,4-5} Na Austrália, país de maior incidência, encontra-se 1.170 casos para cada 100 mil habitantes, sendo 387 casos de carcinomas epidermóides.⁶ Nos Estados Unidos da América estima-se anualmente mais de um milhão de casos novos.⁷ No Brasil o número de casos novos de câncer de pele não melanoma oficialmente estimados em 2008 é de 55.890 casos em homens e de 59.120 em mulheres.⁸ Esta incidência pode ser muito maior se imaginarmos a não notificação de casos. Em Blumenau – SC – Brasil, Nasser⁹⁻¹⁰ encontrou através de busca ativa em laboratórios de anatomia patológica 311,3 casos para 100.000 habitantes em 1999. Existe grande dificuldade de ter-se ao certo a incidência dos tumores cutâneos excetuando-se os melanomas, pois na maioria dos países estes tumores não são de registro obrigatório além de serem tumores nem sempre

submetidos a análise anatomopatológica.¹¹⁻¹³ Cerca de um terço a um quinto destes casos são devidos ao carcinoma epidermóide, com maior número proporcional em grupos de faixa etária avançada (7ª ou 8ª década de vida), sexo masculino e em populações que vivem em baixas latitudes.^{9-10,14-16} Existe predominância das lesões em áreas de maior de exposição solar, especialmente em face e cabeça e pescoço, com 60 a 70% dos casos.^{9,11,17-22} A alta incidência do carcinoma epidermóide cutâneo não reflete em alta mortalidade, sendo geralmente não computada nos estudos populacionais de mortalidade por câncer.²³⁻²⁴ Nas últimas décadas houve uma tendência à queda da mortalidade, provavelmente relacionada ao maior acesso ao diagnóstico e tratamento das lesões, sendo isso motivo de discussão pois existem poucos estudos tratando de mortalidade e carcinomas cutâneos.^{12,25-27} A mortalidade relacionada ao carcinoma epidermóide cutâneo é devida geralmente a progressão e recidiva local e/ou associada a metástase regional linfonodal. Na literatura a incidência de metástases linfonodais dessa neoplasia varia amplamente (1,4 a 20%), sendo que as lesões localizadas em cabeça e pescoço são as mais propensas a metástases linfáticas e conseqüentemente mais estudadas. Tumores localmente avançados e/ou com progressão locorregional em tronco e extremidades são mais raros e menos conhecidos.²⁸⁻³⁷

1.2 Fatores relacionados ao prognóstico do carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades

1.2.1 Fatores clínicos

Tamanho do tumor, infiltração local, classificação T

Em estudo Australiano prospectivo com 481 casos de câncer cutâneo, Czarnecki e colaboradores³² evidenciaram 73 portadores de carcinoma epidermóide e destes, dois apresentaram metástases linfonodais com progressão da doença (5,8% ajustado pelas perdas). Pelo pequeno número, não foi possível evidenciar qualquer fator de risco. Este trabalho mostra a dificuldade em estudar fatores de risco em uma grande população portadora da afecção, com uma parcela pequena em risco de progressão da doença. Estudos retrospectivos com apenas com portadores de tumores de tronco e extremidades localmente avançados mostram o tamanho do tumor, a infiltração do tecido subcutâneo, osteomuscular ou a conjunção de ambos pela classificação de tumores pelo TNM³⁸ como o principal fator de risco para o desenvolvimento de metástases linfonodais e associado a menores taxas de sobrevida.^{34,39} Isto é fato reconhecido em estudos retrospectivos e prospectivos envolvendo tumores sem discriminar a localização anatômica do tumor primário.^{16,28,31,35,36}

Metástases linfonodais

A presença de metástases linfonodais é considerada fator associado à menor taxa de sobrevida, porém a maioria dos estudos tem como alvo o risco de metastatização, já como assertiva inicial considerando-a progressão da doença e fator prognóstico relacionado a menor sobrevida. Alguns autores olharam especificamente para este aspecto em portadores de tumores de tronco e extremidades confirmando menores taxas de sobrevida em pacientes acometidos de metástases linfonodais.^{34,40} O risco associado ao surgimento de metástases linfonodais é eminentemente maior em pacientes portadores de lesões em cabeça e pescoço, porém não é desprezível no tronco e membros. Mullen e colaboradores³⁹ estudaram especificamente tumores localizados em tronco e extremidades e encontraram 17% de metástases, mas com a ressalva de provável viés de seleção dos casos por tratar-se de centro de referência oncológica de alta complexidade, diferente da grande maioria de pequenas clínicas e hospitais que preferencialmente tratam da doença em estádios iniciais. Também especificamente Joseph e colaboradores,³¹ revisando 695 casos encontraram 4,9%. North Jr. e colaboradores³⁴ aferiram 25% de metástases em casuística contando apenas 40 portadores de tumores localmente avançados e/ou já com metástases à apresentação. Em estudos gerais incluindo tumores cutâneos em tronco, cabeça e pescoço e extremidades também existe variação na incidência de metástases conforme características da metodologia aplicada, porém nota-se número menor tanto

da casuística de tumores de tronco e extremidades como das metástases deste subgrupo, dificultando análises específicas.

Imunossupressão

A imunossupressão é conhecida como fator relacionado a maior incidência de tumores cutâneos e também ao prognóstico. Estudos de séries de pacientes submetidos a transplantes de órgãos e mantidos em regime de imunossupressão evidenciam esta relação e demonstram o predomínio do carcinoma epidermóide.⁴¹⁻⁴⁴ O carcinoma epidermóide é também a neoplasia mais prevalente quando se analisa portadores de tumores cutâneos metastáticos em transplantados, chegando a 85% como demonstrado pelo Grupo Colaborativo de Transplante e Câncer de Pele.⁴² Esta relação é menos evidente quando se analisa coortes retrospectivas de portadores de carcinoma epidermóide cutâneo. Brantsch e colaboradores¹⁶ em estudo prospectivo de 615 portadores de tumores de origens anatômicas distintas como tronco, membros e cabeça e pescoço, demonstraram em análise univariada maior risco de recorrência em pacientes imunossupressos que não se manteve na análise multivariada.

Lesões pré-existentes

Lesões cutâneas crônicas, como úlceras cicatriciais (úlceras de Marjolin) ou vasculares são fatores predisponentes a neoplasias cutâneas, sendo o carcinoma epidermóide o mais prevalente, assim como a localização do tronco e extremidades. São entidades descritas em relatos ou

séries de casos, onde se aponta maior agressividade e metastatização, porém com as limitações destes estudos.⁴⁵⁻⁴⁸ Cherpelis e colaboradores,³⁶ em análise retrospectiva de 200 casos de carcinoma epidermóide não apontaram maior risco para metástases em portadores de lesões cutâneas prévias. Eroglu e colaboradores⁴⁹ em estudo retrospectivo com 1.039 casos também não. Ames e colaboradores²⁸ em estudo descritivo analisando 1.118 pacientes com tumores de extremidades, encontraram 1,4% de pacientes com metástases linfonodais. Destes pacientes, 30% tinham lesões cutâneas crônicas prévias no local da neoplasia.

Localização anatômica

A localização anatômica é assunto controverso quanto a fator de risco para metástases e efeito nas taxas de sobrevida. Estudos específicos incluindo apenas tumores de tronco e extremidades e que estudaram este aspecto são poucos e não definem localização de maior risco. North Jr. e colaboradores³⁴ em série de tumores localmente avançados não distinguiram diferença em taxas de sobrevida e também na incidência de metástases linfonodais em diferentes localizações anatômicas, assim como Joseph e colaboradores,³¹ que revisaram série de 695 casos com 34 casos metastáticos também sem correlação entre sítio anatômico e incidência maior de metástases linfonodais. Cherpelis e colaboradores³⁶ em estudo com 200 casos (25 deles metastáticos) incluindo todas as localizações anatômicas chegaram a mesma conclusão. Já Eroglu e colaboradores⁴⁹ em estudo retrospectivo com 1.039 tumores primários de todos os sítios

anatômicos encontraram risco diminuído de recorrência locorregional em tumores localizados na pálpebra em estudo univariado que não se manteve em análise multivariada.

1.2.2 Fatores anatomopatológicos

Classificação histopatológica descritiva

Uma classificação histopatológica detalhada considerando todos os subtipos de carcinoma epidermóide cutâneo, desde lesões supostamente pré-neoplásicas como a queratose actínica, até lesões raras como carcinoma epidermóide com células em anel de sinete, separando grupos por prognóstico de baixo risco, risco intermediário e alto risco, foi sugerida por Cassarino e colaboradores^{50,51} através de revisão da literatura. Além de necessitar de comprovação por estudos bem desenhados, esta classificação não faz parte do diagnóstico histopatológico rotineiro dos carcinomas cutâneos.

Medida da Infiltração tumoral tecidual

A medida da infiltração tumoral em milímetros, classicamente descrita por Breslow⁵² é bem estabelecida como relevante fator prognóstico em melanomas cutâneos localizados.⁵³ Breuninger e colaboradores⁵⁴ utilizaram a espessura e classificaram os carcinomas epidermóides cutâneos em grupos de pacientes com tumores de espessura menor que 2 milímetros, de dois até 6 milímetros e com seis ou mais milímetros, respectivamente com

0,0%, 4,5% e 15,0% de metástases, onde também encontraram como fator prognóstico a invasão de camadas profundas e o grau de diferenciação histológica, porém sem realizar análise multivariada. Outros estudos a relacionaram como fator prognóstico, sem total concordância.^{16,35,36,55-57}

Grau de diferenciação histológica

O grau de diferenciação histológica aplicável ao carcinoma epidermóide cutâneo foi proposto por Broders,⁵⁸ que classificava os tumores de I a IV, sendo que quanto maior o grau, mais indiferenciada é a neoplasia. Esta classificação foi simplificada na prática para apenas graus I, II e III.⁵⁷ Diversos autores demonstraram a influência da diferenciação celular no prognóstico, onde portadores de tumores menos diferenciados apresentaram maior tendência a metastatização e menor taxa de sobrevida.^{36,37,39,49,56,57,59} Outros estudos não a comprovaram.^{16,31,34,35}

Mitoses

O número de mitoses observadas ao exame histopatológico é aventado como possível fator relacionado ao prognóstico, mas pouco estudado. Petter e colaboradores,⁵⁶ em estudo prospectivo com 184 casos evidenciaram maior número de recidivas/progressão da doença e menores taxas de sobrevida no grupo de pacientes com mais de 10 mitoses em 3 campos de grande aumento (400x) comparado ao grupo com menos de 10 mitoses (sobrevida em 3 anos de 80% contra 97% $p=0,006$).

Desmoplasia, reação inflamatória, infiltração tumoral perineural e infiltração tumoral vascular e linfática

O carcinoma epidermóide desmoplastico é definido como o que apresenta delicadas ramificações de células tumorais em sua periferia com uma reação desmoplásica estromal ao redor.⁵⁷ Ele foi identificado como entidade mais propensa a metástases e conseqüente como fator prognóstico. Breuninger e colaboradores,⁵⁷ estudando 594 pacientes apontaram 44 casos de tumores desmoplásicos, que apresentaram seis vezes mais metástases linfonodais e recorrências que os não desmoplásicos, e eram na maioria (91%) localizadas em cabeça e pescoço. Outros autores reafirmam esta relação prognóstica,^{16,56} não comprovado por Soto Fernando e colaboradores.⁵⁹ A presença de infiltrado linfocitário peri ou intratumoral, intravascular venoso ou linfático e infiltração tumoral perineural, também têm sido estudados em vários trabalhos, com resultados conflitantes, sendo possíveis fatores relacionados a invasão e agressão tumoral.^{22,36,37}

1.2.3 Fatores moleculares relacionados ao carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades

O desenvolvimento de metástases e a progressão local dos carcinomas epidermóides cutâneos, assim como em outras neoplasias, é associado a várias vias de sinalização moleculares celulares. Várias moléculas expressam estas vias como:

Família HER

A família de receptores de fatores de crescimento epidérmico (família HER, Erb-B ou EGFR), são quatro receptores glicoproteicos transmembrana de tirosina quinase – EGFR, HER-2, HER-3, HER-4 - associados a proliferação e diferenciação celular. A primeira proteína descoberta foi o HER-2, também conhecida como p185^{HER2/neu} ou c-erbB-2, expressa pelo oncogene de mesmo nome. A sua superexpressão está associada a uma série de neoplasias como mama, ovário, carcinoma não pequenas células de pulmão entre outras.⁶⁰ No câncer de mama existe impacto clínico com correlação prognóstica bem definida e seleção terapêutica diferenciada para portadores de tumores com expressão aumentada de HER-2.⁶¹⁻⁶² No carcinoma epidermóide cutâneo a correlação entre a alteração da expressão de HER-2 e o prognóstico ou progressão tumoral é pouco estudada, menos ainda no subgrupo de tumores de tronco e extremidades. O EGFR, ou HER-1/c-erbB1 é expresso na epiderme humana, principalmente na camada basal e nos apêndices epidérmicos. Em tumores de cabeça e pescoço, esôfago e glioblastomas, a sua expressão aumentada é associada a doença mais agressiva, menores taxas de sobrevida e resistência a tratamentos citotóxicos.⁶³⁻⁶⁵ O HER-3 ou cerbB-3, assim como os anteriores, está presente em uma variedade de tecidos, e sua superexpressão também associada a menores taxas de sobrevida em neoplasias como de cólon, estômago e mama.⁶⁶⁻⁶⁸ A expressão aumentada de HER-4 ou cerbB-4 nos tecidos tumorais tem relação controversa com o prognóstico.⁶⁸⁻⁷⁰

Liu e colaboradores,⁷¹ analisando através de técnica de imunohistoquímica 26 pacientes com carcinoma epidermóide cutâneo e também 10 pacientes com pele normal, encontraram hiperexpressão para EGFR e HER-2 nos tumores e positividade respectivamente apenas na camada basal e granulosa na pele sadia. Os tumores mais indiferenciados foram os que apresentaram maior imunorreatividade ao EGFR. Ahmed e colaboradores,⁷² examinando a expressão de HER-2 também por imunohistoquímica em 24 casos de carcinoma epidermóide cutâneo, além de células de cultura com três linhagens tumorais de carcinoma epidermóide cutâneo, uma linhagem de células pré tumorais e uma com queratinócitos normais, observaram praticamente nenhuma expressão em células normais, baixa reatividade em praticamente todas as células pré-tumorais e uma reação mais intensa nas células tumorais cultivadas. Vinte dos 24 casos foram positivos, sendo 14 de 17 tumores primários e seis de sete metástases, indicando uma possível maior expressão em doença mais avançada. Krähn e colaboradores,⁷³ através de estudo por cadeia de polimerase-transcriptase reversa (rt-PCR), com 56 amostras entre pele normal e acometida por carcinoma basocelular e carcinoma epidermóide, encontraram expressão de HER-2 isolado e de EGFR/HER-2 predominantemente em pele normal, enquanto HER-2/HER-3 e a tripla expressão EGFR/HER-2/HER-3 mais comumente nas neoplasias. HER-4 não foi expresso em nenhuma amostra. Shimizu e colaboradores,⁷⁴ analisando cinco tumores primários e respectivamente cinco metástases linfonodais, evidenciaram a expressão de EGFR por imunohistoquímica

onde quatro tumores primários foram fracamente positivos e um negativo, com quatro metástases fortemente positivas e uma negativa, considerando a hiperexpressão associada a metastatização. Maubec e colaboradores,⁷⁵ estudaram a expressão de EGFR e HER-2 por imunohistoquímica apenas em carcinomas epidermóides cutâneos metastáticos, onde 13 amostras originavam-se de metástases sendo 11 linfonodais, uma cutânea e outra subcutânea, e apenas duas de tumores primários. Houve forte expressão de EGFR em todas as amostras metastáticas, diferente do HER-2 que foi fracamente expresso em apenas quatro casos, indicando uma relação direta entre aumento da expressão de EGFR e metastatização. Fogarty e colaboradores,⁷⁶ investigaram a expressão de EGFR em 21 carcinomas epidermóides cutâneos localmente avançados tanto por imunofluorescência quanto por imunohistoquímica, encontrando uma expressão aumentada em 43% dos casos, porém sem conseguir correlacionar a fatores prognósticos. Son e colaboradores,⁷⁷ buscando correlacionar achados de invasão e diferenciação histológica a marcadores moleculares (imunohistoquímica), encontraram em 94 carcinomas epidermóides cutâneos, positividade de 41,6% para EGFR, sem conseguir relacioná-la a dados histopatológicos.

E-caderina

A progressão tumoral, invasão de tecidos adjacentes e a metastatização estão relacionadas entre outras coisas, com a capacidade das células se desprenderem ou perderem adesividade. As caderinas são glicoproteínas de membrana que promovem adesão celular cálcio

dependente e são parte importante neste processo. Nas células epiteliais como na epiderme, a adesão intercelular é feita pela caderina epitelial (E-caderina), onde o domínio extracelular da E-caderina interage com o mesmo domínio extracelular das células vizinhas através de uma estrutura dimérica, mantendo as células coesas. A porção intracelular é ligada ao citoesqueleto via moléculas chamadas cateninas, que são ao menos quatro e classificadas de acordo com seu peso molecular em alfa, beta, gama e p120^{ctn}, que por sua vez são reguladas por uma série de genes.⁷⁸ A perturbação ou modificação de um dos componentes deste sistema catenina/caderina pode levar a perda ou alteração da adesividade e conseqüentemente possíveis células não adesivas e metastáticas. A expressão da E-caderina pode ser medida por imunohistoquímica, e a perda da sua expressão é correlacionada a progressão neoplásica e a metástases.⁷⁹ Wu e colaboradores,⁸⁰ analisando carcinomas epidermóides de diversas localizações, inclusive pele, encontraram através de imunohistoquímica, uma expressão de E-caderina de 93 a 100% nos tumores bem diferenciados e de 40% nos pouco diferenciados. Nos tumores cutâneos a relação foi respectivamente 100% e 50%. Lyakhovitsky e colaboradores,⁸¹ estudando pele normal, pele com elastose solar, queratose actínica e carcinoma epidermóide cutâneo, mostraram uma expressão regressiva de E-caderina nas respectivas lesões, evidenciando uma possível associação entre progressão morfológica da pele lesada pelas ondas UV e progressão molecular, com perda de expressão de E-caderina. Koseki e colaboradores,⁸² analisando 55 carcinomas cutâneos primários, entre portadores de doença localizada e portadores de doença

metastática linfonodal, encontraram por imunohistoquímica expressão de E-caderina reduzida ou ausente em 71% dos pacientes não metastáticos contra 91,3% nos pacientes que desenvolveram metástase, sugerindo a E-caderina como possível marcador de progressão da neoplasia.

Podoplanina

A podoplanina é uma glicoproteína de membrana expressa especificamente no endotélio dos vasos linfáticos. Embora sua função não esteja completamente elucidada, a sua ausência em estudos experimentais animais causa defeitos nos vasos linfáticos e conseqüentemente linfedema, e em estudos “in vitro” evidenciam que a podoplanina tem papel na motilidade endotelial e na formação vascular linfática.⁸³ Alguns estudos recentes encontraram expressão aumentada ou alterada da podoplanina em várias neoplasias, entre elas tumor das células granulosas, carcinomas epidermóides da cavidade oral e mesotelioma, sugerindo que a podoplanina pode estar relacionada a atividade proliferativa e/ou invasiva.⁸⁴⁻⁸⁶ Schacht e colaboradores,⁸³ ao explorar a expressão da podoplanina em tecidos normais e tumores humanos, evidenciaram em 28 carcinomas epidermóides cutâneos positividade em 22, sendo que tumores bem diferenciados não a expressaram, e os três tumores que eram recorrentes apresentaram altos níveis de expressão. Yang e colaboradores,⁸⁷ pesquisando a expressão da podoplanina em tumores sebáceos cutâneos, carcinomas basocelulares e carcinomas epidermóides cutâneos, evidenciaram positividade leve a moderada nos carcinomas epidermóides mas relacionaram o aumento de

imunorreatividade com a desdiferenciação celular. A relação entre a expressão tumoral de podoplanina e outros fatores associados a progressão da doença e prognóstico é desconhecida no carcinoma epidermóide cutâneo em geral e também especificamente no que acomete tronco e extremidades.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

O objetivo desta pesquisa é investigar em portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades localmente avançado:

- A expressão dos marcadores moleculares EGFR, HER-3, HER-4, E-caderina e podoplanina nos tumores primários e nas metástases linfonodais;
- Fatores clínicos, anatomopatológicos e moleculares relacionados ao surgimento de metástases linfonodais;
- Fatores clínicos anatomopatológicos e moleculares associados ao prognóstico (sobrevivência).

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Amostra

O estudo foi realizado de forma retrospectiva com pacientes portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades do Hospital de Câncer de Barretos, admitidos no período de janeiro de 1997 a dezembro de 2006, e do Hospital Amaral Carvalho de Jaú, de janeiro de 2002 a dezembro de 2003, baseado em consulta a dados clínicos em prontuários dos pacientes e dados anatomopatológicos e moleculares das peças de parafina dos arquivos de anatomia patológica das referidas instituições. Foi preservada a confidencialidade dos pacientes e houve análise e aprovação do estudo pelos Comitês de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos, Hospital Amaral Carvalho e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (anexos A, B e C).

3.1.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades:
 - Com confirmação histopatológica.
 - Localmente avançados, classificados de acordo com a classificação TNM ³⁸ como:
 - T3 – tumores com mais de 5 cm de extensão radial.

- T4 - Invadindo partes moles ou estrutura óssea adjacente.

3.1.2 Critérios de exclusão

- Portadores de segunda neoplasia primária excetuando carcinoma cutâneo basocelular.
- Tumores invadindo área genital ou cervical.
- Tumores metastáticos em órgãos distantes (M1) ao diagnóstico inicial.

3.1.3 Obtenção dos dados clínicos e epidemiológicos

Através de consulta ao registro hospitalar de câncer e setor de prontuário dos pacientes do Hospital de Câncer de Barretos e Hospital Amaral Carvalho foram identificados respectivamente 55 e oito pacientes que preenchiam os critérios de inclusão do estudo, totalizando amostra de 63 casos. Os aspectos clínicos e epidemiológicos analisados foram: Idade, sexo, tipo de pele, origem rural ou urbana, exposição solar ocupacional, localização da lesão, presença de lesão não neoplásica crônica prévia no local da neoplasia, imunossupressão, classificação TNM, modalidade terapêutica empregada, dados de progressão local, regional e sistêmica da doença.

Nas metástases linfonodais, analisou-se o tempo do surgimento a partir do diagnóstico do tumor primário, a localização e o tratamento

realizado, e ainda classificaram-se os pacientes em três grupos distintos em relação ao seu surgimento:

- N0f – Pacientes sem metástases linfonodais ao diagnóstico e que não desenvolveram metástases linfonodais em nenhum tempo durante o estudo;
- N1f – Pacientes sem metástases linfonodais ao diagnóstico e que desenvolveram metástases linfonodais durante o seguimento;
- N1 – Pacientes que apresentaram metástases linfonodais na primeira avaliação clínica.

Por fim, para análise de sobrevivência, o estado clínico da última informação no prontuário médico e/ou data e causa do óbito. Os dados foram coletados em formulário (anexo D) e armazenados em banco de dados eletrônico.

3.1.4 Obtenção dos dados anatomopatológicos

Os blocos e lâminas correspondentes aos casos foram inicialmente revistos e tiveram confirmação diagnóstica por dois médicos patologistas do Hospital de Câncer de Barretos. Do total de casos, blocos referentes a 55 tumores primários e 25 metástases linfonodais foram obtidos para análise. Após isso, coletaram-se em banco de dados eletrônico as seguintes informações do tumor primário:

- Índice mitótico – O índice mitótico foi definido pela leitura e contagem do número de mitoses em 10 campos de grande aumento (CGA) em

400 vezes ao microscópio óptico, em lâmina representativa do tumor corada em hematoxilina e eosina. Para facilitação analítica, foi calculada a mediana do número de mitoses e este número utilizado para a classificação em dois grupos – um grupo variando de nenhuma mitose até o número mediano, e o outro grupo com mais mitoses que a mediana.

- Medida da espessura do tumor primário (Breslow)

A medida da espessura tumoral foi realizada através de micrômetro ocular acoplado ao microscópio óptico e constitui-se da medida em milímetros da espessura do tumor primário medida da borda livre (superfície epidérmica tumoral) do tumor até a área mais profunda de invasão, feita de maneira vertical, conforme descrito por Breslow.⁵² Também para cálculo foi utilizada a mediana das espessuras encontradas para classificação em dois grupos, o primeiro com espessuras até o valor mediano e o segundo com medidas maior que a mediana.

- Graus de diferenciação histológica da neoplasia – Os tumores foram classificados da seguinte maneira:⁸⁸
 - Grau I – Tumores bem diferenciados caracterizados por epitélio escamoso que freqüentemente apresenta queratinização abundante e facilmente reconhecível. Pontes intercelulares são facilmente aparentes com mínimo pleomorfismo. As raras mitoses são localizadas principalmente na camada basal.

- Grau II – Tumores moderadamente diferenciados que apresentam maior desorganização estrutural na qual a origem escamosa do epitélio é menos óbvia. O pleomorfismo nuclear e citoplasmático é mais pronunciado e as figuras mitóticas não são raras. Normalmente é evidente menor formação de queratina, freqüentemente limitada a formação de pérolas e cistos córneos, e em células queratinizadas isoladas esparsas.
- Grau III – Tumores pouco diferenciados que se apresentam anaplásicos e identificados através de pontes intercelulares ou pequenos focos de queratinização. A presença de mitoses é mais evidente.
- Presença de infiltrado linfocitário peritumoral e intratumoral – Quando se observou em lâmina representativa do tumor corada em hematoxilina e eosina, infiltração linfocitária intra ou peritumoral os casos foram classificados como infiltração linfocitária intratumoral e peritumoral positivas.
- Invasão tumoral vascular sanguínea e linfática - Quando se observou em lâmina representativa do tumor corada em hematoxilina e eosina, presença indubitável de blocos de células tumorais no interior de vasos linfáticos ou sanguíneos, considerou-se o caso como infiltração vascular sanguínea ou linfática positiva.
- Invasão perineural - Os tumores que em lâmina representativa corada em hematoxilina e eosina, infiltraram os filetes neurais ou o perineuro,

circundando total ou parcialmente o filete neural foram considerados como infiltração perineural positiva.

3.1.5 Obtenção dos dados referentes aos marcadores moleculares

3.1.5.1 Seleção das áreas de interesse e confecção dos blocos de micro arranjo de tecidos (tissue micro arrays, ou TMA)

Após a revisão das variáveis anatomopatológicas pelos médicos patologistas e preenchimento da planilha com as alterações observadas, selecionaram-se e demarcaram-se as áreas de interesse nas lâminas coradas pela hematoxilina e eosina com uma caneta de retroprojeção de ponta grossa. Mediante sobreposição das lâminas, os respectivos blocos foram também marcados. Foram selecionadas áreas de carcinoma primário e de metástase linfonodal. Dois blocos de TMA foram confeccionados no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo – São Paulo, utilizando o aparelho “Manual Tissue Arrayer I”, Beecher Instruments, EUA. De cada bloco de parafina selecionado foram obtidos dois cilindros de 1,0 milímetros de diâmetro que foram implantados no bloco receptor (bloco de TMA).

3.1.5.2 Coleção de Lâminas à partir do TMA

A partir de cada bloco de TMA, cinquenta lâminas foram confeccionadas e numeradas de 1 a 50. As lâminas 1, 25 e 50 foram coradas pela hematoxilina e eosina, permitindo reanálise para garantia de permanência da área representada naquela série. As Lâminas com menor perda de fragmentos foram selecionadas para a realização do estudo imunohistoquímico. Todas as lâminas remanescentes foram rapidamente submersas uma única vez em paraplast derretido para proteção da secção histológica.

3.1.5.3 Reação imunohistoquímica

As reações de imunohistoquímica foram realizadas no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo de São Paulo e as reações foram interpretadas por um patologista do Hospital de Câncer de Barretos.

Anticorpos primários, titulação, sistema de recuperação antigênica e de amplificação do sinal

Na tabela 1 estão listados os anticorpos primários utilizados, assim como seus fabricantes, as titulações usadas, os sistemas de recuperação antigênica utilizados para cada anticorpo e o sistema de amplificação de cada anticorpo.

Tabela 1 - Detalhes sobre os anticorpos utilizados e os sistemas de recuperação antigênica e de amplificação do sinal

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição	Recuperação antigênica	Amplificação
HER-1	DAKO	H11	1/100	Panela/EDTA/pH8,0	Advance (DAKO)
HER-2	DAKO	Policlonal	1/1500	BM/citrato/pH6,0	LSAB (DAKO)
HER-3	Neomarkers	Policlonal	1/100	Panela/citrato/pH6,0	Advance (DAKO)
HER-4	Neomarkers	Policlonal	1/300	Panela/citrato/pH6,0	Novolink (Novocastra)
E-caderina	DAKO	NCH-38	1/600	BM/EDTA/TRISpH9,0	Advance (DAKO)
D2-40	DAKO	D2-40	1/200	BM/EDTA/TRISpH9,0	Advance (DAKO)

Panela =panela de pressão
BM = Banho Maria (calor úmido)

Técnica utilizada para a detecção dos antígenos

A desparafinação dos cortes foi feita mediante incubação com xilol a 60°C por 15 minutos, seguida de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 15 minutos. Após foi feita hidratação dos cortes em concentrações de etanol a 100% com três banhos de 30 segundos cada, etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos, lavagem em água corrente e água destilada. A recuperação antigênica, conforme ilustrado na tabela 1, com os respectivos anticorpos, da seguinte maneira: Lavagens em água corrente e água destilada, bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída volume / volume em metanol, em três banhos de 10 minutos cada. Novas lavagens em água corrente e água destilada e lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos. A reação aqui efetuada segue os princípios propostos por Hsu e colaboradores,⁸⁹ adaptado às nossas condições laboratoriais: Incubação das lâminas com anticorpo primário específico diluído em tampão PBS contendo soroalbumina bovina (SIGMA, E.U.A.) 1,0% e NaN₃ (Inlab,

São Paulo) 0,1%, inicialmente por 30 min. a 37° C e em seguida durante 16 a 18 horas a 4°C; Lavagens com tampão PBS com três trocas de três a 5 minutos cada; Utilização do sistema de amplificação conforme ilustrado na tabela 1, que variou de acordo com o antígeno pesquisado; Lavagens com tampão PBS com três trocas de três a 5 minutos cada; Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, E.U.A.) a 0,06%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfóxido (Labsynth, Brasil) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, em câmara escura e a 37 °C. O produto final da reação apresenta coloração acastanhada, depositado na região da célula em que ocorreu a ligação do antígeno com o anticorpo primário. Realizamos então lavagens em água corrente e água destilada e contra coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagem em água corrente e água destilada e após, imersão rápida em água amoniacal (solução de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada. Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 80%, a 95% e absoluto (três trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol e montagem em Entellan (Merck, Alemanha) com lamínula.

Controles positivos e negativos

Os controles utilizados na reação imunohistoquímica compreenderam um controle positivo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário e adição de imunoglobulina do mesmo isotipo, sendo efetuados todos os demais procedimentos

imunohistoquímicos. Como as reações foram realizadas em micro arranjos de tecidos, os demais cilindros representados no TMA serviram também de controle de qualidade da reação.

3.1.5.4 Avaliação das imunoexpressões

EGFR, HER-3 e HER-4

O resultado da imunoexpressão do EGFR foi semiquantificado de acordo com o método descrito por Lager e colaboradores,⁹⁰ que também foi utilizado para as reações para HER-3 e HER-4. Os focos com reação mais intensa foram selecionados e então a intensidade da imunorreação citoplasmática e/ou membranosa foi classificada assim como segue: 0: negativo; +: reação com positividade fraca; ++: reação com positividade moderada; +++: reação com intensa positividade. Para nossa análise, definimos os casos semiquantificados 0 ou + como negativos e aqueles ++ ou +++ como positivos (figuras 1, 3 e 4).

HER-2

A imunorreação para o HER-2 foi semiquantificada de acordo com a intensidade de coloração da membrana citoplasmática assim como segue: 0: reação negativa ou fracamente positiva em menos de 10% das células; +: positividade membranosa fraca em mais de 10% das células tumorais; ++: positividade membranosa moderada em toda a membrana citoplasmática em mais de 10% das células tumorais; +++: positividade membranosa forte em

toda a membrana citoplasmática em mais de 10% das células tumorais. Consideramos negativos os casos classificados como 0 e +, e positivos os casos ++ e +++ (figura 2).

E-caderina

As imunoexpressões citoplasmáticas e membranosas de E-caderina foram semiquantificadas separadamente como 0: negativa ou até 10% das células positivas; +: positividade entre 11 e 25% das células; ++: positividade entre 26 e 50% das células; +++: positividade entre 51 e 75% das células e ++++: positividade em mais de 75% das células. Para análise foram considerados positivos somente os casos com imunoexpressão em mais de 50% das células (figuras 5 e 6).

D2-40 (podoplanina)

A imunorreatividade para a podoplanina foi semiquantificada da seguinte forma, de acordo com Padgett e colaboradores:⁹¹ Negativa - ausência de imunorreatividade, imunomarcacão fraca independente do número de células ou moderada a intensa imunomarcacão em até 10% das células tumorais e positiva - imunomarcacão moderada a intensa membranosa e/ou citoplasmática em mais de 10% das células (figura 7).

3.2 Análise descritiva e de associação de fatores prognósticos relacionados a sobrevida e a metástases linfonodais

Os dados coletados foram analisados da seguinte maneira, utilizando-se o programa estatístico SPSS 10.0 for Windows:⁹²

1. Análise descritiva da distribuição dos casos conforme cada dado;
2. Análise de associação entre as variáveis qualitativas através de teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, considerando testes bicaudados e valores de “p” significativos menor ou igual a 0,05;
3. Análise comparativa de sobrevida específica por câncer através de curvas construídas pela técnica de Kaplan-Meier e teste não paramétrico univariado do log-rank de acordo com as diferentes variáveis. O tempo de seguimento utilizado para cálculo de sobrevida foi calculado da data da primeira consulta médica no centro do estudo (Hospital de Câncer de Barretos ou Amaral Carvalho) e a data da ocorrência do óbito ou data do último seguimento (para os pacientes vivos). Os critérios de censura para curva de sobrevida específica por câncer pelo método de Kaplan-Meier ou para utilização da regressão de Cox foram: Pacientes vivos na data do último seguimento ou pacientes que foram a óbito e cuja causa da morte não foi relacionada ao câncer; pacientes que não compareceram ao hospital em um período maior do que duas vezes o período estipulado pelo médico para seus retornos foram considerados como perdidos de seguimento na data da última informação. Estes pacientes contribuíram para

curva de sobrevida até esta data, sendo então classificados como sob censura. O tempo de seguimento foi truncado para 120 meses, ou seja, todos pacientes que ultrapassaram este tempo tiveram considerado sua informação aos 120 meses de seguimento. As variáveis que foram relacionadas a diferentes prognósticos na análise univariada, com valores de “p” até 0,20 foram submetidas a análise multivariada de regressão de Cox com o cálculo das “hazard ratio” para óbito (HR). A técnica “stepwise forward” foi utilizada para construção do modelo multivariado, sempre com ajuste pela variável instituição no modelo (variável de maior interesse).⁹³ Foi considerado significativo valor de “p” menor ou igual a 0,05.

Figura 1 – Microfotografia. Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo EGFR (aumento 100x)

Figura 2 - Microfotografia. Marcação imunohistoquímica negativa do anticorpo HER-2 (aumento 100x)

Figura 3 – Microfotografia. Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo HER-3 (aumento 100x)

Figura 4 – Microfotografia. Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo HER-4 (aumento 100x)

Figura 5 - Microfotografia. Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo E-caderina, evidenciando a expressão membranosa (aumento 400x)

Figura 6 - Microfotografia. Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo E-caderina, evidenciando a expressão citoplasmática (aumento 400x)

Figura 7 - Microfotografia. Marcação imunohistoquímica positiva do anticorpo D2-40 (podoplanina) (aumento 400x)

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Características demográficas/epidemiológicas e descritivas da amostra

4.1.1 Dados clínicos e epidemiológicos

A amostra foi constituída de 63 pacientes que preencheram os critérios de inclusão, sendo 55 do Hospital de Câncer de Barretos e oito do Hospital Amaral Carvalho. A distribuição dos pacientes conforme aspectos clínicos e demográficos estão contidos na tabela 1. A idade variou entre 19 e 90 anos com média de 62,8 anos. Houve ligeira predominância masculina (58,7%), com pacientes na sétima década de vida (23,8%). Pacientes de pele branca foram mais prevalentes (85,7%). Apenas um (1,6%) paciente apresentava imunossupressão documentada, por transplante renal e uso crônico de drogas imunossupressoras. A maioria era de origem urbana (79,4%) e com história de exposição solar crônica (42,9%). Em 41,3% a localização da lesão foi em membros inferiores (41,3%) e 23,8% apresentavam história clínica de lesão crônica prévia no local da lesão. Mais pacientes foram classificados inicialmente como T3 (60,3%), e a maior parte N0 (74,6%). A distribuição entre estádios II e III foi praticamente igual (50,8% e 49,2% respectivamente) (tabela 2).

Tabela 2 - Características clínicas e epidemiológicas dos 63 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades

Característica	n(%)
Sexo	
Masculino	37 (58,7)
Feminino	26 (41,3)
Cor	
Branca	54 (85,7)
Negra/parda	9 (14,3)
Ambiente	
Rural	10 (15,9)
Urbano	50 (79,3)
n/c	3 (4,8)
Exposição solar crônica	
Sim	27 (42,9)
Não	13 (20,6)
n/c	23 (36,5)
Localização anatômica	
MMII	26 (41,3)
MMSS	24 (38,1)
Tronco	13 (20,6)
Lesão não neoplásica prévia	
Sim	15 (23,8)
Não	48 (76,2)
Classificação T	
T3	38 (60,3)
T4	25 (39,7)
Classificação N	
N0	47 (74,6)
N1	16 (25,4)
Estadiamento clínico	
Estádio clínico II	32 (50,8)
Estádio clínico III	31 (49,2)

O tratamento cirúrgico foi predominante (79,3%) e 47,6% dos pacientes apresentaram metástases linfonodais, sendo 16 (25,4%) à apresentação (N1) e 14 (22,2%) durante o seguimento (N1f). A axila foi a localização mais comum das metástases (53,3%). A progressão e morte pela doença ocorreram em 35,0% dos pacientes, sendo a recidiva local ou regional a principal causa (82,6%) (tabela 3).

Tabela 3 - Características clínicas e de tratamento dos 63 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades

Característica	n(%)
Tratamento da lesão primária	
Cirurgia	
Ressecção com sutura simples	1 (1,6)
Ressecção com reconstrução	19 (30,1)
Amputação/desarticulação	25 (39,7)
Ressecção com cicatrização 2ª intenção	5 (7,9)
Radioterapia	11 (17,5)
Não tratou	2 (3,2)
Acometimento linfonodal	
Sem acometimento linfonodal (N0f)	33 (52,4)
Metástase linfonodal à apresentação (N1)	16 (25,4)
Metástase linfonodal no seguimento (N1f)	14 (22,2)
Localização das metástases linfonodais	
Axilar	16 (53,3)
Inguinal	14 (46,7)
Tratamento das metástases linfonodais	
Linfadenectomia	28 (93,3)
Não tratou	2 (6,7)
Recidiva locorregional após linfadenectomia	
Não	13 (46,4)
Local	8 (28,6)
Linfonodal	7 (25,0)
Metástases à distância	
Não	60 (92,3)
Cutâneas	1 (1,6)
Viscerais	4 (6,1)

4.1.2 Características anatomopatológicas das amostras

Dos 63 pacientes, oito não apresentavam bloco de parafina disponível para análise. Dos 55 analisados, o número de mitoses variou de zero a 42 por 10 campos de grande aumento (400 vezes), com mediana de cinco

mitoses. A espessura de Breslow foi obtida em 42 casos e variou de 1 a 19mm com mediana de 8mm. Em relação ao grau de diferenciação histológica, 94,5% eram tumores de grau I ou II. Tanto o infiltrado linfocitário intratumoral como peritumoral ocorreram respectivamente em 21,8% e 16,4%. A invasão vascular linfática ou sanguínea e a invasão perineural foram positivas respectivamente em 12,7% e 1,8% dos casos. (tabela 4).

Tabela 4 - Características histopatológicas dos 55 carcinomas epidermóides cutâneos primários de tronco e extremidades

Características histopatológicas	n(%)
Grau de diferenciação histológica	
I	25 (45,5)
II	27 (49,0)
III	3 (5,5)
Infiltrado linfocitário intratumoral	
Ausente	12 (21,8)
Presente	43 (78,2)
Infiltrado linfocitário peritumoral	
Ausente	9 (16,4)
Presente	46 (83,6)
Invasão vascular sanguínea ou linfática	
Ausente	48 (87,3)
Presente	7 (12,7)
Invasão perineural	
Ausente	54 (98,2)
Presente	1 (1,8)

4.1.3 Características dos marcadores moleculares nos tumores primários

As características da expressão dos marcadores nos tumores primários dos 55 casos disponíveis para análise e os 25 tumores metastáticos estão expostos na tabela 5. Em relação ao tumor primário, na família HER, o EGFR foi positivo em 25,5% dos casos, HER-2 foi negativo em todos, HER-3 foi positivo em 87,3% e HER-4 47,3%. A E-caderina foi positiva na membrana em 47,3% dos casos e no citoplasma em 29,1%. A podoplanina foi positiva em 29,1%. Em relação às metástases, o EGFR foi positivo 40%, HER-2 foi negativo em todos os casos, HER-3 foi positivo em 84% e HER-4 em 44%. A E-caderina de membrana foi positiva 28% e a citoplasmática em 40%. A podoplanina foi positiva em 40%.

Tabela 5 - Expressão dos marcadores moleculares por imunohistoquímica em TMA de 55 carcinomas epidermóides cutâneos primários de tronco e extremidades e 25 metástases linfonodais

Marcador molecular	Número de casos Tumor primário (%)	Número de casos metástases linfonodais (%)
EGFR		
Negativo	41 (74,5)	15 (60,0)
Positivo	14 (25,5)	10 (40,0)
HER-2		
Negativo	55 (100,0)	25 (100,0)
Positivo	0 (00,0)	0 (00,0)
HER-3		
Negativo	7 (12,7)	4 (16,0)
Positivo	48 (87,3)	21 (84,0)
HER-4		
Negativo	28 (50,9)	13 (52,0)
Positivo	26 (47,3)	11 (44,0)
Não avaliável	1 (01,8)	1 (04,0)
E-caderina membrana		
Negativo	26 (47,3)	16 (64,0)
Positivo	26 (47,3)	7 (28,0)
Não avaliável	3 (05,4)	2 (08,0)
E-Caderina citoplasma		
Negativo	37 (67,3)	13 (52,0)
Positivo	16 (29,1)	10 (40,0)
Não avaliável	2 (03,6)	2 (08,0)
Podoplanina		
Negativo	37 (67,3)	15 (60,0)
Positivo	16 (29,1)	10 (40,0)
Não avaliável	2 (03,6)	

4.2 Análise de associação entre variáveis clínicas, anatomopatológicas e moleculares e o surgimento de metástases linfonodais

Na análise realizada entre as variáveis clínicas, o sexo, cor da pele, ambiente (rural ou urbano), e a presença de exposição solar crônica, nenhuma se associou ao risco de metástases linfonodais. Também não se associaram a localização anatômica (42,3% de metástases nas lesões dos membros inferiores, contra 58,4% em membros superiores e 38,5% em tronco ($p=0,467$)), a presença de lesão não neoplásica prévia (60% de metástases em portadores contra 43,8% dos não portadores ($p=0,376$)) e a classificação T (TNM) (39,5% de metástases nos tumores T3 contra 60,0 nos T4 ($p=0,129$)) (tabela 6).

Tabela 6 - Correlação entre variáveis clínicas e a presença ou surgimento de metástases linfonodais em 55 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades

Variável	Pacientes sem Metástases (n)	Pacientes com Metástases (n)	p
Sexo			
Masculino	17 (45,9%)	20 (54,1%)	0,306
Feminino	16 (61,5%)	10 (38,5%)	
Cor			
Branca	29 (53,7%)	25 (46,3%)	0,725
Negra/parda	4 (44,4%)	5 (55,6%)	
Ambiente			
Rural	5 (50,0%)	5 (50,0%)	0,742
Urbano	28 (56,0%)	22 (44,0%)	
Exposição solar crônica			
Sim	13 (48,1%)	14 (51,9%)	1,000
Não	6 (46,2%)	7 (53,8%)	
Localização anatômica			
MMII	15 (57,7%)	11 (42,3%)	0,467
MMSS	10 (41,6%)	14 (58,4%)	
Tronco	8 (61,5%)	5 (38,5%)	
Lesão não neoplásica prévia			
Sim	6 (40,0%)	9 (60,0%)	0,376
Não	27 (56,2%)	21 (43,8%)	
Classificação TNM			
T3	23 (60,5%)	15 (39,5%)	0,129
T4	10 (40,0%)	15 (60,0%)	

Entre as variáveis anatomopatológicas, a presença de infiltrado linfocitário intratumoral no tumor primário foi a única correlacionada com o risco de metástases linfonodais. Dos tumores com infiltrado linfocitário intratumoral presente, 53,3% apresentaram metástases, contra 16,4% dos tumores sem o infiltrado ($p=0,046$). O número de mitoses por 10 campos de grande aumento, a espessura tumoral, o grau de diferenciação histológica, o

infiltrado linfocitário peri e intratumoral e a invasão tumoral linfática, sanguínea ou perineural não foram associados ao risco de metástases linfonodais (tabela 7).

Tabela 7 - Correlação entre variáveis anatomopatológicas e a presença ou surgimento de metástases linfonodais em 55 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades

Variável	Pacientes sem Metástases (n)	Pacientes com Metástases (n)	p
Número de mitoses por 10 CGA			
Até 5	16 (55,2%)	13 (44,80%)	1,000
Mais que 5	14 (53,8%)	12 (46,2%)	
Espessura tumoral*			
Breslow até 8mm	14 (63,6%)	8 (36,4%)	0,533
Breslow maior 8mm	10 (50,0%)	10 (50,0%)	
Grau de diferenciação histológica			
I	14 (54,0%)	11 (46,0%)	1,000
II ou III	16 (53,3%)	14 (46,7%)	
Infiltrado linfocitário intratumoral			
Ausente	10 (83,3%)	2 (16,4%)	0,046
Presente	20 (46,5%)	23 (53,3%)	
Infiltrado linfocitário peritumoral			
Ausente	7 (77,7%)	2 (22,3%)	0,160
Presente	23 (50,0%)	23 (50,0%)	
Invasão vascular sanguínea ou linfática			
Ausente	28 (58,3%)	20 (41,7%)	0,226
Presente	2 (28,6%)	5 (71,4%)	
Invasão perineural			
Ausente	30 (55,5%)	24 (44,5%)	0,455
Presente	0 (0,0%)	1 (100%)	

*Apenas 42 casos

Entre as variáveis moleculares nos tumores primários, EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, E-caderina de membrana e citoplasma, e podoplanina, nenhuma teve correlação com o risco de metástases linfonodais (tabela 8).

Tabela 8 - Correlação entre variáveis moleculares e a presença ou surgimento de metástases linfonodais em 55 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades

Variável	Pacientes sem Metástases (n)	Pacientes com Metástases (n)	p
EGFR			
Negativo	24 (58,5%)	17 (41,5%)	0,363
Positivo	6 (42,8%)	8 (57,2%)	
HER-2			
Negativo	30 (54,5%)	25 (45,5%)	Não calculado
Positivo	0	0	
HER-3			
Negativo	6 (85,7%)	1 (14,3%)	0,112
Positivo	24 (50%)	24 (50%)	
HER-4			
Negativo	12 (42,9%)	16 (57,1%)	0,083
Positivo	17 (65,4%)	9 (34,6%)	
E-caderina membrana			
Negativo	14 (53,8%)	12 (46,2%)	0,779
Positivo	16 (61,5%)	10 (38,5%)	
E-Caderina citoplasma			
Negativo	20 (54,0%)	17 (46,0%)	0,764
Positivo	10 (62,5%)	6 (37,5%)	
Podoplanina			
Negativo	19 (59,3%)	13 (40,7%)	0,425
Positivo	11 (47,8%)	12 (52,2%)	

4.3 Análise comparativa de sobrevida específica por câncer univariada de acordo com as diferentes variáveis clínicas, anatomopatológicas e moleculares dos tumores primários e marcadores moleculares nas metástases

4.3.1 Tempo de seguimento e sobrevida específica por câncer em toda amostra

O tempo de seguimento de toda amostra variou de um a 120 meses, com média de 32,2 meses (DP 28,2). Na última informação disponível, 22 pacientes encontravam-se vivos sem doença (34,9%), um vivo com doença (1,6%), 21 mortos pela doença (33,3%), 11 mortos por outra causa (17,5%) e oito “perdidos de vista” (12,7%). Os pacientes classificados como “perdidos de vista” tiveram tempo médio de seguimento de 30,7 meses (DP 26,7) com apenas dois pacientes seguidos por menos de 1 ano e três pacientes seguidos por menos de 22 meses.

Os 14 pacientes que tiveram metástases linfonodais durante o seguimento (N1f) as apresentaram em uma mediana de 11,3 meses. Os 33 pacientes que não apresentaram metástases linfonodais (N0f) foram seguidos por uma mediana de 38,1 meses.

A sobrevida específica por câncer em 5 anos foi de 51,3% (E.P. 9,0%) (gráfico 1).

Gráfico 1 - Sobrevida específica por câncer nos 63 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo localmente avançado de tronco e extremidades

4.3.2 Análise das variáveis clínicas

Das variáveis clínicas, o estadiamento T, o estágio clínico e a presença inicial de metástases linfonodais revelaram-se fatores prognósticos em análise univariada com diferentes taxas de sobrevida específica por câncer. O sexo, a cor da pele, o ambiente rural ou urbano, localização anatômica, localização da metástase linfonodal e a presença de lesão não oncológica prévia não foram relacionadas a diferentes taxas de sobrevida (tabela 9).

Em relação ao estadiamento (TNM), Pacientes com tumores classificados como T3 tiveram sobrevida específica por câncer em 5 anos esperada em 62,5% contra 26,8% nos pacientes com tumores classificados como T4 ($p=0,012$) (gráfico 2).

Gráfico 2 - Curva de sobrevida específica por câncer nos 63 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme classificação T

Tabela 9 - Sobrevida específica por câncer nos 63 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme diferentes variáveis clínicas

Variável	Sobrevida em 5 anos (%)	Erro Padrão	p
Sexo			
Masculino	44,2	10,3	0,153
Feminino	68,7	14,2	
Cor			
Branca	56,8	9,5	0,189
Negra/parda	23,8	19,3	
Ambiente			
Rural	75,0	15,3	0,429
Urbano	45,3	10,7	
Exposição solar crônica			
Sim	47,5	11,5	0,855
Não	00,0	00,0	
Localização anatômica			
MMII	67,6	12,7	0,153
MMSS	43,9	14,2	
Tronco	29,2	21,8	
Localização das metástases linfonodais			
Axilar	26,3	14,6	0,488
Inguinal	33,7	18,2	
Lesão não neoplásica prévia			
Sim	47,3	17,0	0,189
Não	53,4	10,3	
Classificação T			
T3	62,5	10,8	0,012
T4	26,8	14,6	
Estádio clínico			
II	74,7	10,0	0,001
III	23,2	12,4	
Acometimento linfonodal			
Sem acometimento linfonodal (N0f)	79,4	7,6	0,021
Metástase linfonodal à apresentação (N1f)	39,6	16,8	
Metástase linfonodal no seguimento (N1)	20,6	16,1	

Pacientes com tumores classificados de acordo com estágio clínico (TNM) como estágio clínico II tiveram sobrevida de 74,7%, diferente dos 23,2% encontrados nos pacientes estágio clínico III ($p=0,001$) (gráfico 3).

Gráfico 3 - Curva de sobrevida específica por câncer nos 63 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme estágio clínico

Pacientes sem metástases linfonodais (N0f) tiveram sobrevida de 79,4% contra 39,6% nos pacientes que apresentaram metástases durante o seguimento (N1f) e 20,6% nos pacientes que apresentaram metástases ao diagnóstico (N1) ($p=0,021$) (gráfico 4).

Gráfico 4 - Curva de sobrevida específica por câncer nos 63 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme presença ou surgimento de metástases linfonodais

4.3.3 Análise das variáveis anatomopatológicas

As taxas de sobrevida em 5 anos específicas por câncer comparadas conforme variáveis anatomopatológicas: - Mitoses por CGA, espessura tumoral, Infiltrado linfocitário intratumoral, Infiltrado linfocitário peritumoral, invasão vascular sanguínea ou linfática e invasão perineural não foram associadas a diferentes taxas de sobrevida. O grau de diferenciação histológica foi a única variável relacionada a diferentes taxas de sobrevivência específica por câncer. Pacientes com lesões bem

diferenciadas (grau I) apresentaram sobrevida estimada em 5 anos de 82,2% contra 23,8% em portadores de lesões moderadamente ou pouco diferenciadas (graus II e III) ($p=0,010$) (tabela 10) (gráfico 5).

Tabela 10 - Sobrevida específica por câncer nos 55 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme diferentes variáveis anatomopatológicas identificadas nos tumores primários

Variável	Sobrevida em 5 anos (%)	Erro Padrão	p
Índice mitótico			
Até 5 mitoses por 10 CGA	50,5	15,6	0,671
Maior que 5 mitoses por 10CGA	49,3	11,7	
Espessura tumoral (Breslow)			
Até 8mm	57,3	13,2	0,659
Mais que 8mm	68,4	10,6	
Grau histológico			
GI	82,2	8,1	0,010
GII/III	23,8	12,7	
Infiltrado linfocitário peritumoral			
Sim	46,7	10,6	0,623
Não	77,8	13,9	
Infiltrado linfocitário intratumoral			
Sim	47,3	10,7	0,927
Não	72,7	13,4	
Invasão vascular			
Sim	31,3	24,5	0,504
Não	54,2	10,0	
Invasão perineural			
Sim	0,0	0,0	0,689
Não	54,4	9,4	

Gráfico 5 - Curva de sobrevida específica por câncer nos 55 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme grau de diferenciação histológica dos tumores primários

4.3.4 Análise das variáveis moleculares

De todos os marcadores moleculares testados nos tumores primários apenas a podoplanina foi relacionada a diferentes taxas de sobrevivência específica por câncer. EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, E-caderina de membrana e citoplasma não tiveram aumento de expressão associada a diferentes taxas de sobrevida. Pacientes com lesões que não expressaram podoplanina apresentaram sobrevida específica por câncer em 5 anos de 71,9% contra 23,5% das que apresentaram expressão ($p=0,018$) (tabela 11) (gráfico 6).

Tabela 11 – Sobrevida específica por câncer nos 55 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme diferentes variáveis moleculares identificadas nos tumores primários pelo método de imunohistoquímica

Variável	Sobrevida em 5 anos (%)	Erro padrão	p
EGFR			
Negativo	52,1	10,8	0,592
Positivo	34,6	25,3	
HER-2			
Negativo	Todos os casos negativos – não comparável		
Positivo			
HER-3			
Negativo	0,0	0,0	0,231
Positivo	52,5	10,3	
HER-4			
Negativo	49,6	12,4	0,632
Positivo	44,0	17,0	
E-caderina membrana			
Negativo	38,3	12,7	0,112
Positivo	65,5	13,9	
E-caderina citoplasma			
Negativo	35,6	12,5	0,296
Positivo	72,5	11,8	
Podoplanina			
Negativo	71,9	10,1	0,018
Positivo	23,5	13,2	

Gráfico 6 - Curva de sobrevida específica por câncer nos 55 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme expressão de podoplanina nos tumores primários pela reação de imunohistoquímica

A análise realizada nas lesões metastáticas demonstrou uma maior taxa de sobrevida quando HER-4 foi negativo com sobrevida estimada em 3 anos de 53,3% nas metástases HER-4 negativas contra 37,5% nas positivas ($p=0,038$). Nenhum outro marcador identificado nas metástases mostrou relação com o prognóstico (tabela 12) (gráfico 7).

Tabela 12 – Sobrevida específica por câncer nos 25 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme diferentes variáveis moleculares identificadas nos tumores metastáticos linfonodais pelo método de imunohistoquímica

Variável	Sobrevida em 3 anos (%)	Erro padrão	p
EGFR			
Negativo	56,2	13,6	0,783
Positivo	55,6	16,6	
HER-2			
Negativo	Não comparado - Todos os casos negativos		
Positivo			
HER-3			
Negativo	75,0	21,7	0,185
Positivo	51,8	11,7	
HER-4			
Negativo	53,3	16,1	0,038
Positivo	37,5	16,1	
E-caderina membrana			
Negativo	53,0	13,1	0,597
Positivo	44,4	22,2	
E-caderina citoplasma			
Negativo	59,8	14,0	0,593
Positivo	38,9	17,6	
Podoplanina			
Negativo	57,1	13,2	0,604
Positivo	50,0	18,6	

Gráfico 7 - curva de sobrevida específica por câncer nos 25 portadores de carcinoma epidermóide cutâneo de tronco e extremidades conforme expressão de HER-4 nas metástases linfonodais pela reação de imunohistoquímica

4.4 Análise comparativa de sobrevida específica por câncer multivariada

Das variáveis associadas a diferentes taxas de sobrevivência na análise univariada: - Classificação T, acometimento linfonodal, grau de diferenciação histológica e positividade para podoplanina, no modelo final da análise multivariada, todas permaneceram como fatores independentes

associados à sobrevida específica por câncer. Foi feita duas análises distintas. A primeira demonstra o modelo incluindo a variável linfonodal separada em N0 e N1, e a segunda tem a variável linfonodal separada em N0f, N1f e N1 (tabelas 13 e 14).

Tabela 13 - Análise multivariada pelo método de regressão de Cox para sobrevida específica por câncer com a variável linfonodal N0-N1

Variáveis	HR	IC 95%	p
Classificação T			
T3	1		
T4	5,069	1,786-14,388	0,002
Acometimento linfonodal			
N0	1		
N1	3,594	1,355-9,530	0,010
Grau de diferenciação histológica			
Grau I	1		
Graus II e III	3,594	1,066-11,447	0,039
Podoplanina			
Negativo	1		
Positivo	2,974	1,121-7,891	0,025

Tabela 14 - Análise multivariada pelo método de regressão de Cox para sobrevida específica por câncer com a variável linfonodal N0f, N1f e N1

Variáveis	HR	IC 95%	P
Classificação T			
T3	1		
T4	5,673	1,870 - 17,211	0,002
Acometimento linfonodal			
N0f	1		
N1f	0,635	0,161 – 2,506	0,517
N1	3,048	1,048 – 8,869	0,041
Grau de diferenciação histológica			
Grau I	1		
Graus II e III	3,665	1,102 - 12,284	0,034
Podoplanina			
Negativo	1		
Positivo	3,089	1,151 – 8,295	0,025

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Poucos estudos avaliam especificamente fatores prognósticos em carcinomas epidermóides localmente avançados de tronco e extremidades, não havendo consenso em variáveis relacionadas, excetuando-se o estadiamento TNM. A determinação de outros fatores, incluindo variáveis moleculares, pode melhorar o diagnóstico, estadiamento e seleção terapêutica disponível, guiando ainda o estudo de novas terapias.

5.1 Análise descritiva

Dados clínicos e epidemiológicos

Este estudo retrospectivo conteve todos os pacientes com tumores localmente avançados identificados que foram tratados no Hospital de Câncer de Barretos e Hospital Amaral Carvalho de Jaú nos períodos previamente especificados. Confirmando dados da literatura, o predomínio da pele branca (85,7%) e a exposição solar freqüente (42,7%) indicam a relação direta entre radiação solar e a neoplasia.⁵ A localização também foi relacionada a exposição de raios UV: Maior parte dos casos apresentou lesões em áreas expostas – membros superiores ou inferiores. A maior prevalência do sexo masculino pode estar relacionada a exposição ocupacional que é mais comum aos homens, porém isto não pode ser concluído com este tipo de estudo. O maior número de pacientes em idade mais avançada também confirma dados de outros trabalhos, e explica-se

pelo caráter crônico da indução da neoplasia pela radiação UV.¹¹ A presença de lesão não oncológica prévia no local da neoplasia foi muito alta nesta casuística (23,8%), apesar deste dado não relacionar-se a fator prognóstico neste estudo, a alta prevalência pode indicar uma relação direta entre a presença da lesão e o surgimento de tumores mais avançados, do mesmo modo como já demonstrado por Ames e colaboradores.²⁸ A imunossupressão não foi fator investigado neste estudo, pois apenas um caso tinha história clínica relevante, com progressão para doença linfonodal metastática e recidiva regional após linfadenectomia e posterior óbito (transplantado renal em uso de imunossupressores), tornando-se impossível qualquer inferência relacionada a isto. Nos dados revistos, a relação de agressividade tumoral neste grupo de pacientes só foi aventada em estudos de coorte envolvendo apenas populações imunossupressas, levando então a crer que existe risco de menores taxas de sobrevida neste subgrupo de pacientes com dificuldade em comprová-la em estudos de populações heterogêneas.⁴²

O tratamento realizado refletiu em boa parte o estágio avançado que é característico da casuística, com alto índice de amputações e desarticulações e apenas um caso de ressecção e fechamento da ferida sem reconstrução complexa. O alto número de metástases linfonodais à apresentação (N1) ou ao seguimento (N1f) pode estar relacionado a dois fatores principais: -Doença localmente avançada – T3 e T4, e viés de seleção, pois as duas instituições envolvidas são centros terciários de oncologia que tradicionalmente tratam pacientes com metástases

linfonodais. Outros estudos confirmam alto índice de metástases linfonodais em pacientes com doença localmente avançada. North Jr. e colaboradores³⁴ e Mullen e colaboradores,³⁹ em estudos com casuística similar a este também demonstraram índices semelhantes de metástases linfonodais (17 e 25% respectivamente). As metástases linfonodais puderam e foram cirurgicamente tratadas na grande maioria dos casos (93,3%), com recidiva local e regional em cerca de metade delas. Já as metástases distantes foram apenas cinco casos (8%), revelando conforme a literatura, tratar-se de doença de recrudescimento ou progressão predominantemente local ou regional.⁹⁴

Dados anatomopatológicos

Em relação ao grau de diferenciação grande parte da casuística foi grau I (45,5%), o que pode explicar a característica de doença pouco metastática à distância. Rowe e colaboradores⁹⁵ encontraram da mesma forma alto número de tumores bem diferenciados, em casuística de tumores metastáticos linfonodais onde 63,7% eram bem diferenciados, diferente de Petter e colaboradores⁵⁶ que em casuística só com pacientes com tumores T1 e T2 encontraram apenas 33% de tumores bem diferenciados. A espessura tumoral (medida de Breslow) encontrada foi alta, porém este valor é variável na literatura de três a 10mm. Isto pode ser explicado por diferenças na casuística.^{16,35,96} Em relação às mitoses, grande parte dos pacientes apresentavam menos de 10 mitoses por campo de grande aumento ao microscópio óptico (89,1%), diferente do achado de Petter e

colaboradores⁵⁶ com tumores iniciais e 66% com menos de 10 mitoses. O infiltrado linfocitário peri e intratumoral ocorreu em cerca de 80%. Já a presença de infiltrado intravascular foi baixo (12,7%), assim como o perineural (1,8%), porém semelhante a outros achados.²²

Variáveis moleculares

A positividade do EGFR é variável nos carcinomas cutâneos, não existindo estudo de grandes séries, tendendo a maior reatividade em tumores metastáticos ou avançados, variando de 40 a mais de 90%.^{71,75-77} O achado em nosso estudo foi de uma menor positividade, em cerca de 25% dos tumores primários e 40% nas metástases linfonodais. Podemos considerar que a casuística utilizada é única na comparação a outros estudos, pois é de uma subpopulação específica e também que não consideramos como positivos em nossa metodologia os casos fracamente reativos. De qualquer maneira houve uma maior reatividade nas metástases, podendo indicar envolvimento da via do EGFR na metastatização dos carcinomas epidermóides cutâneos. O estudo do HER-2 nesta amostra mostrou negatividade em todos os casos, tanto nos tumores primários como nas metástases. Alguns estudos corroboram este achado, também correlacionando baixa expressão de HER-2 a tumores e a positividade a pele normal ou tumores bem diferenciados.^{73,75} Entretanto, outros autores associaram a positividade a neoplasia,^{71,72} não existindo portanto um padrão estabelecido. O HER-3, assim como o HER-4, é menos estudado em neoplasias cutâneas. A positividade de HER-3 de 87,3% nos tumores

primários e 84% nas metástases indica hiperexpressão associada a doença avançada. Já o HER-4 foi positivo em 47,3% nos tumores primários e 44% nas metástases. No estudo de Krähn e colaboradores,⁷³ HER-3/HER-2 positivo ou HER-2/EGFR positivo foram mais associados a neoplasias cutâneas e HER-4 foi pouco expresso, diferente do encontrado no presente estudo. A E-caderina apresentou positividade de 47,3% na membrana e 29,1% no citoplasma nos tumores primários e 28% e 40% respectivamente na membrana e citoplasma das lesões metastáticas. Sabe-se que possivelmente o processo de progressão das neoplasias pode estar associado a perda da expressão da E-caderina na membrana e expressão não funcional no citoplasma, pois a adesão e polaridade celular requerem uma localização membranosa.^{97,98} Os achados neste estudo favorecem esta teoria com perda de expressão membranosa e aumento da expressão citoplasmática na progressão de doença local para metástase. A podoplanina foi positiva em 29% dos tumores primários e 40% das metástases linfonodais. Este padrão de positividade, com maior expressão na doença metastática é em acordo com a literatura que associa a positividade da podoplanina a desdiferenciação celular e progressão da doença, apesar de poucos estudos.^{83,87}

5.2 Fatores prognósticos relacionados ao risco de metástases linfonodais

Ao separarmos os pacientes N0 entre N0f e N1f, existiu a possibilidade de ocorrer em um seguimento futuro o surgimento de lesão metastática em pacientes classificados como N0f. Neste estudo, verificamos o tempo de seguimento dos pacientes sem metástases (mediana de 38,1 meses) e também o tempo em que ocorreram as metástases nos pacientes classificados como N1f (mediana de 11,3 meses). Como houve um seguimento adequado dos pacientes N0f, o risco deste tipo de erro é minimizado, possibilitando a análise de correlação entre fatores prognósticos e o surgimento das metástases.

Fatores clínicos

Vários autores demonstraram associação entre a classificação T – TNM e o surgimento de metástases linfonodais, porém nenhum deles especificamente estudou casos isolados de tronco e extremidades.^{16,36,49,59} O achado negativo neste estudo pode ser devido a presença de apenas tumores avançados, excluindo T1 e T2. Outra hipótese, devido a esta casuística ser pequena, é que esta influência existe, mas não pôde ser comprovada (39,5% de metástases em tumores T3 contra 60% em tumores T4, $p=0,129$). Outros fatores testados como cor da pele, ambiente rural ou urbano e a história de exposição solar crônica, são fatores relacionados ao surgimento da neoplasia e não esperados como relacionados a metástases. Os estudos clínicos prognósticos não incluem estas variáveis.

A localização anatômica como fator predisponente ao surgimento de metástases é assunto controverso. Estudos que correlacionam a localização

anatômica como fator de risco para metástases linfonodais evidenciam localizações de cabeça e pescoço, como lábio e orelha a maior frequência de metástases.^{16,59,99} Estudos gerais e/ou exclusivos de tumores localizados em extremidades e tronco chegam a mesma conclusão que este estudo, não relacionando a localização anatômica ao risco de metástases linfonodais.

31,34

A presença de lesões pré-neoplásicas prévias tem sido associada a maior risco de metastatização. Em análise anterior com parte da casuística deste estudo, Vazquez e colaboradores⁴⁰ através de análise univariada associaram em 57 pacientes com carcinoma epidermóide de tronco e extremidades um maior risco de surgimento de metástases linfonodais aos portadores de lesões prévias (cinco em 11 metastáticos apresentaram lesões prévias contra 6 em 35 ($p=0,050$)), que com o aumento da casuística do presente estudo não se manteve com diferença estatisticamente significativa (9 em 30 metastáticos contra 6 em 27 não metastáticos ($p=0,376$)), achado corroborado também por Ames²⁸ e colaboradores em estudo descritivo com 30% de lesões prévias nos casos metastáticos. Outros autores confirmam o achado deste estudo, onde não houve associação de risco entre a presença de lesões pré-neoplásicas como úlceras de estase ou cicatriciais e o surgimento de metástases linfonodais.^{36,49}

Fatores anatomopatológicos

O número de mitoses no tumor primário foi relacionado à sobrevida livre de metástases ou recidiva em estudo de Petter e colaboradores,⁵⁶ onde

tumores com menor número de mitoses tiveram maiores taxas de sobrevida. A maioria dos estudos de prognóstico não olhou para este aspecto. Neste estudo a proporção de metástases foi muito semelhante nos dois grupos, com 45% dos pacientes com até cinco mitoses por campo de grande aumento a apresentar metástases linfonodais e 55% a não apresentar, contra 46% e 54% respectivamente em pacientes com tumores com mais de cinco mitoses ($p=1,000$), descartando a associação testada. Neste estudo, diferenças na espessura tumoral (Breslow) não se associaram a maior ou menor número de metástases linfonodais, ao contrário de outros.^{36,54} A mediana alta da espessura provavelmente invalidou a variável como fator relacionado a metástases, o que talvez fosse possível em tumores mais finos. O estudo agrupado dos pacientes conforme diferente número de mitoses e diferentes espessuras de Breslow foi realizado também sem demonstrar a associação com o surgimento de metástases. O grau de diferenciação histológica da neoplasia primária, da mesma maneira que o número de mitoses apresentou distribuição semelhante e homogênea entre os pacientes que apresentaram metástases ou não. A literatura não apresenta consenso sobre esta relação, com estudos divergentes havendo, portanto, coerência nos achados com os dados disponíveis.^{31,35,36,49,59} O infiltrado perineural, vascular e linfocitário peritumoral, e suas relações com o surgimento de metástases linfonodais, são conflitantes em estudos prévios, sendo o achado negativo deste estudo de acordo com possibilidades esperadas.^{22,36} O infiltrado linfocitário intratumoral neste estudo esteve associado ao surgimento de metástases linfonodais, onde apenas dois em

12 pacientes com infiltrado negativo tiveram metástases (16,4%), contra 23 em 43 pacientes com infiltrado positivo (53,3%) ($p=0,046$). A explicação para este achado pode relacionar-se a maior resposta inflamatória devido a maior exposição antigênica dos tumores que invadiram (metastatizaram) os vasos linfáticos. De qualquer maneira, pouco se refere a este achado na literatura, também com dados conflitantes.^{36,59}

Variáveis moleculares

Família HER

Nenhuma variável molecular deste grupo esteve associada ao risco de metástases linfonodais. Não existem estudos relacionados à família HER em carcinoma epidermóide cutâneo associando expressão e risco de metastatização linfonodal. Trabalhos publicados em geral ou analisam a expressão absoluta em tumores metastáticos, ou caracterizam a expressão em lesões pré-neoplásicas, neoplásicas bem diferenciadas, pouco diferenciadas e lesões metastáticas, sem associação de risco.^{71-72,74-75} No presente estudo, a positividade para EGFR foi praticamente homogênea entre os pacientes que apresentaram metástases ou não. HER-3 apresentou maior positividade no grupo metastático, o contrário ocorrendo em relação ao HER-4, porém sem poder estatístico. Não houve análise de associação de HER-2, negativo em toda a amostra. A progressão de doença localizada para doença metastática linfonodal nesta patologia pode ocorrer com alterações das vias que envolvem os receptores de crescimento epitelial,

porém de maneira indireta. Como os receptores relacionam-se em si, a presença de positividade ou negatividade para associação de receptores como EGFR/HER-2 ou EGFR/HER-2/HER-3/HER-4 ou de outra combinação entre eles pode indicar propensão metastática no tumor primário, não comprovado em um estudo com poucas amostras. Outra possibilidade é que apesar de tratar-se de via que quando exacerbada reflete, em última análise, sinalização celular anômala, não há relação direta entre esta alteração no tumor primário e o surgimento de metástases linfonodais.

E-caderina

A proporção da expressão da E-caderina no tumor primário tanto de membrana como de citoplasma não foi significativamente diferente entre os grupos com ou sem metástases linfonodais. Koseki e colaboradores⁸² compararam pacientes com e sem metástases linfonodais, concluindo uma menor expressão membranosa em pacientes metastáticos, mas sem considerar risco para o desenvolvimento de metástases. No presente estudo houve inclusive uma grande semelhança entre os resultados da E-caderina mensurada na membrana e no citoplasma, diferente do esperado, conforme anteriormente explanado, que seria uma maior expressão citoplasmática nos casos de progressão metastática e uma relação inversa da expressão membranosa, com maior número de casos nos tumores não metastáticos. Como isso ocorreu quando se analisa a expressão total nos tumores primários e nas metástases, provavelmente esta mudança de perfil deve ocorrer, porém em momento diferente, ou apenas nas células que

efetivamente geram metástases e não observado no tumor primário que irá apresentar ou apresenta metástases.

Podoplanina

A podoplanina é molécula menos estudada que as demais. Como é relacionada a angiogênese e mais especificamente a linfangiogênese, a sua expressão aumentada pode ser um mecanismo facilitador ao desenvolvimento de metástases linfáticas, portanto quando presente no tumor primário, um possível marcador para o surgimento de metástases linfonodais em uma série de neoplasias que as têm em alta prevalência em detrimento a metástases em outros órgãos, assim como o carcinoma epidermóide cutâneo. Em nossa casuística, não houve associação entre positividade ou expressão aumentada de podoplanina no tumor primário e o surgimento das metástases. Isto pode representar que realmente não há relação entre esta via e a metastatização. De outro modo, Kyzas e colaboradores¹⁰⁰, diferentemente deste estudo, focaram a expressão da podoplanina no tecido peritumoral, ou seja, mediram a neolinfangiogênese peritumoral que também poder ser o mecanismo de metastatização linfática, e o associaram a maior número de metástases e menor taxa de sobrevida em tumores de cabeça e pescoço.

5.3 Fatores prognósticos relacionados à sobrevida específica por câncer

Apesar de tratar-se apenas de tumores localmente avançados, a sobrevida específica por câncer em 5 anos foi de 51,3%, caracterizando um índice relativamente alto de controle da doença e de acordo com os estudos que focam tumores de tronco e extremidades de alto risco para metástases.^{34,39}

Variáveis clínicas

Como esperado, por não haver indícios de causalidade, não houve diferença na sobrevida em relação a sexo, cor da pele, ambiente rural ou a presença de exposição solar crônica. A localização anatômica e a presença de lesões não neoplásicas na área do tumor, apesar de associação controversa com o surgimento de metástases e prognóstico, da mesma maneira que os resultados obtidos em relação às metástases não se relacionaram a diferentes taxas de sobrevida, favorecendo a idéia que não são fatores indicativos de progressão da doença. A classificação do tumor primário (T) foi associada ao prognóstico – onde pacientes com lesões classificadas como T3 tiveram maior taxa de sobrevida que pacientes com lesão T4 de modo independente, sustentado pela análise multivariada, indicando que a classificação é válida como prognóstica neste grupo específico e de acordo com outros estudos.^{34,39} A presença de metástases linfonodais, que também é fator prognóstico conhecido na literatura,^{31,39} não só se mostrou independentemente relacionada a sobrevida, como evidenciou prognósticos distintos conforme a sua distribuição temporal: Pacientes sem metástases (N0f) tiveram maior taxa de sobrevida que

pacientes que tiveram metástases durante o seguimento (N1f) que por sua vez tiveram maior taxa de sobrevida que pacientes com metástases sincrônicas ao tumor primário (N1) ($p=0,021$). Entretanto, na análise multivariada observa-se que os pacientes N1f tiveram o mesmo prognóstico que os pacientes N0f, o que nos leva a crer que os pacientes que desenvolvem metástase linfonodal ao seguimento apresentam menor taxa de sobrevida decorrente de outras variáveis associadas a estes pacientes como estágio T, grau de diferenciação e positividade para podoplanina. Nota-se que nesta casuística 93,3% dos pacientes N1f foram submetidos a tratamento cirúrgico efetivo das lesões – linfadenectomia terapêutica. A justificativa em separar os pacientes N0 em N0f e N1f na tentativa de identificar eventual benefício prognóstico se faz, pois este grupo de pacientes seria candidato a tratamento cirúrgico profilático (linfadenectomia eletiva) antes do surgimento de metástases. Quatorze (29,8%) dos 47 pacientes N0 apresentaram metástases linfonodais. As taxas de sobrevivência que ajustadas não se mostraram diferentes, condizem com o conceito de não realização de linfadenectomia profilática nestes casos, pois além de tratar desnecessariamente 70% dos pacientes com uma terapia agressiva e não isenta de complicações agudas e crônicas, a metástase que surgir, desde que tratada como ocorreu nesta casuística, não tem impacto direto no prognóstico.

Variáveis anatomopatológicas

Da mesma forma que em relação ao surgimento de metástases não houve associação entre o número de mitoses e a sobrevida, diferente ao aventado por Petter e colaboradores.⁵⁶ A espessura tumoral também não se associou a diferentes taxas de sobrevida, como inferido por Brantsch e colaboradores,¹⁶ que não incluíram apenas tumores localmente avançados. Houve poucos tumores finos, o que influenciou o achado, pois provavelmente em tumores muito espessos, diferentes espessuras (Breslow) não se associam a diferentes prognósticos. O grau de diferenciação é uma variável mais estudada, onde diversos autores demonstraram sua influência no prognóstico,^{36,39,49,56,59} apesar de outros estudos não a comprovarem.^{16,31,34,35} Neste estudo, apesar de não verificar-se associação entre o grau histológico e o risco de metástases, pacientes com tumores menos diferenciados tiveram menor taxa de sobrevida independente de outras variáveis na análise multivariada, confirmando a tese que associa a anaplasia como fator prognóstico. O Infiltrado vascular, neural e linfocitário intra e peritumoral têm associação conflitante ao prognóstico na literatura e em tese representam sinais de agressividade tumoral que nem sempre refletem no prognóstico.^{22,36} Não foi encontrada associação entre nenhum destes fatores ao prognóstico no atual estudo, apesar da associação entre o infiltrado linfocitário intratumoral e o surgimento de metástases linfonodais. O evento de infiltração observado ao microscópio pode ter outro significado que simplesmente agressão local, ou mesmo tendo, pode não implicar diretamente ao prognóstico.

Variáveis moleculares

Família HER

A expressão aumentada dos marcadores da família HER no tumor primário não foi associada a menor taxa de sobrevida neste estudo, diferente do encontrado em estudos de outras neoplasias.⁶⁰ A pequena casuística não comportou a análise da associação de positividade com dupla reação positiva EGFR e HER-2, tripla ou mesmo quádrupla entre todos os marcadores que em outros estudos identificaram associações relacionadas a diferentes prognósticos.^{68,73} Mesmo a determinação isolada de cada marcador também pode ser influenciada pela pequena amostragem, não identificando pequenas mas reais diferenças prognósticas relacionadas a eles. A expressão aumentada de HER-4 nas metástases foi associada a menor taxa de sobrevida em análise univariada contando apenas a população dos portadores de metástases, com uma sobrevida estimada de 53,3% em 3 anos para pacientes com tumores metastáticos negativos contra 37,5% para pacientes com tumores positivos ($p=0,038$). Este achado favorece a tese que a via da tirosina quinase é associada à progressão e agressividade tumoral nesta neoplasia, apesar da negatividade dos outros marcadores, pois o receptor HER-4 forma heterodímeros com HER-2, ligação necessária para sua ativação.¹⁰¹ Os achados também são condizentes com a literatura onde a relação prognóstica da positividade de HER-4 é controverso em diversos tumores.^{68-70,102} A hiperexpressão de

HER-4 nos tumores metastáticos pode ser a alteração final de uma série de sinalizações envolvidas na progressão desta neoplasia.

E-caderina

A expressão da E-caderina tanto no tumor primário quanto na metástase não foi associada a diferentes prognósticos no presente estudo, em ambas as localizações membranosa e citoplasmática. Os estudos em carcinoma cutâneo indicam uma redução da expressão nos tumores em relação à evolução de pele normal para neoplasia e de neoplasia para metástase de modo observacional, não havendo associação conhecida com o prognóstico.⁸⁰⁻⁸² O achado deste estudo não confirma a premissa que a perda da expressão de E-caderina e conseqüente progressão da neoplasia e tenha impacto negativo no prognóstico. Talvez este evento ocorra em um momento anterior e em tumores localmente avançados esta alteração molecular já não corresponda a diferença no prognóstico.

Podoplanina

A podoplanina foi fator prognóstico independente na análise univariada e multivariada com acentuada diferença nas curvas de sobrevida entre os pacientes positivos e negativos, com sobrevida específica por câncer estimada em 5 anos de 71,9% para pacientes com tumores primários negativos contra 23,5% nos tumores primários positivos ($p=0,018$). Os achados indicam uma relação direta entre aumento de expressão da podoplanina no tumor primário e maior agressividade neoplásica,

provavelmente relacionada a recidiva local ou regional, já que não relacionou-se ao risco de metástases. A análise da positividade apenas nos tumores metastáticos não revelou diferença nas taxas de sobrevida para os portadores de lesões mais expressas, apesar do número de pacientes metastáticos avaliado ter sido muito pequeno (apenas 25). Estes achados sugerem que a podoplanina é um marcador prognóstico em carcinoma epidermóide cutâneo localmente avançado de tronco e extremidades independente da presença de metástases linfonodais.

Os achados deste estudo poderão indicar novas propostas terapêuticas, além de consolidar outras terapias já em uso. A linfadenectomia profilática não é usual neste tipo de paciente e pelos achados não precisa ser realizada desde que os pacientes sejam seguidos adequadamente e prontamente tratados no caso do surgimento de metástases linfonodais. Pacientes com tumores pouco diferenciados, com invasão óssea, cartilagem ou musculatura, metástases linfonodais sincrônicas ou com expressão aumentada de podoplanina são pacientes candidatos a tratamentos mais agressivos de forma adjuvante e possivelmente a protocolos terapêuticos investigacionais incluindo quimioterapia, radioterapia e drogas alvo moleculares.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- A expressão dos marcadores EGFR, HER-2, HER-3, HER-4, E-caderina e podoplanina, previamente desconhecida para o carcinoma epidermóide cutâneo localmente avançado de tronco e extremidades foi determinada na casuística, tanto em lesões primárias como em metástases linfonodais.
- O infiltrado linfocitário intratumoral dentre todas as variáveis foi o único fator associado ao risco de metástases linfonodais em carcinoma epidermóide cutâneo avançado de tronco e extremidades.
- Portadores de tumores classificados como T3 apresentaram maior taxa de sobrevida específica por câncer que portadores de tumores T4, assim como pacientes N0 apresentaram maior taxa de sobrevida específica por câncer que pacientes N1. Pacientes com metástases ao seguimento, devidamente tratados (N1f) não tiveram menores taxas de sobrevida específica por câncer que pacientes N0. A expressão aumentada de podoplanina no tumor primário resultou em menor taxa de sobrevida específica por câncer. A expressão aumentada do marcador molecular HER-4 na metástase linfonodal tem correlação com menor sobrevida específica por câncer nos pacientes com metástases linfonodais.

ANEXOS

7 ANEXOS

Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos

**Fundação
Pio XII**
HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS
Reg. no C. N. S. S. 242.299/78
Utilidade Pública Federal Lei Nº 90.935/85
Utilidade Pública Estadual Lei Nº 2.224/79
Utilidade Pública Municipal Lei Nº 3.166/78
Inscrição no C.N.P.J. 49.150.352/0001-12
Inscrição Estadual 204.032.103.118

Barretos, 25 de outubro de 2006.

Prezado (a) Sr.(a). Investigador (a)

Vinicius de Lima Vazquez

Protocolo 053/2006: "Fatores preditivos para metástase linfodonal em pacientes portadores de carcinoma epidermóide de pele localmente avançados em extremidade e tronco"

Foram analisadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII, em reunião ordinária realizada no dia 19/10/06, as pendências respondidas e a emenda da troca do título do projeto encaminhadas pelo investigador, com a seguinte decisão do Comitê: está enquadrado na categoria **APROVADO**, de acordo com a Resolução CNS 196/96, do Conselho Nacional de Saúde, 10/10/96.

Atenciosamente,

Dr. Eduardo José A. Paton
Vice- Coordenador do CEP
Fundação Pio XII

**Anexo B - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital
Amaral Carvalho de Jaú**

**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Fundação Hospital Amaral Carvalho**

Rua da Palmeiras, 116, Vila Assis - CEP 17.210-120 - Jaú - SP - ☎ (014) 3602-1194 - Ramal - 1552

Parecer CEPFHAC – 93/07.

Protocolo de Estudo

Fatores Preditivos para Metástase Linfonodal em Pacientes Portadores de Carcinoma Epidermóide de Pele Localmente Avançados em Extremidade e Tronco

Documentos avaliados:

✓ Projeto de Pesquisa Completo.

Pesquisador Responsável:

Autoria: Dr. Vinicius de Lima Vazquez – Médico do Hospital de Câncer de Barretos

Orientação: Dr. José Getulio Martins Segalla – Médico do Hospital Amaral Carvalho.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Hospital Amaral Carvalho analisou os documentos supracitados na 32ª reunião ordinária realizada no dia 14 de setembro de 2007. Segue abaixo as considerações feitas no parecer consubstanciado elaborado por mim:

"O projeto de pesquisa supracitado tem por objetivo analisar de forma retrospectiva, descritiva e comparativa as características clínicas, anátomo-patológicas e a expressão da E-cadherina, HER – 2 e c-MET, através de estudo imunohistoquímico dos carcinomas epidermóides de extremidades metastáticos e não metastáticos, buscando correlação com a sobrevida e caracterização de fatores prognósticos.

A metodologia utilizada será a análise de prontuários clínicos dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de extremidade e tronco que desenvolveram metástases linfonodais, matriculados no Hospital de Câncer de Barretos e Hospital Amaral Carvalho entre os anos de 1987 a 2006.

O projeto possui Termo de Confidencialidade devidamente assinado, declaração de orçamento financeiro da pesquisa isentando o Hospital Amaral Carvalho de qualquer ônus, bem como autorização do chefe do serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia, Dr. Francisco Carlos Quevedo.

Diante do exposto, em de acordo com a Resolução 196/96 e suas complementares, emito parecer favorável à realização desse estudo em nossa instituição."

Diante do exposto, manifestamo-nos pela aprovação sem restrições dos documentos avaliados.

Informamos que os referidos documentos são rubricados pelo colaborador do CEPFHAC, Ricardo Augusto Sartori, e que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou da votação.

Aproveito para recordar-lhe do compromisso de enviar relatórios semestrais referentes à evolução do estudo.

Jaú, 14 de setembro de 2007.

Dra. Cláudia Teresa de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Fundação Hospital Amaral Carvalho

Anexo C – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP de São Paulo

Ao
Departamento de Radiologia

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 14.02.07, tomou ciência da execução do Protocolo de Pesquisa nº **0049/07**, intitulado: **"FATORES PREDITIVOS PARA METÁSTASE LINFONODAL EM PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE PELE LOCALMENTE AVANÇADOS EM EXTREMIDADE E TRONCO"**.

No que tange à sua parte empírica será desenvolvido no **Hospital do Câncer de Barretos – Fundação Pio XII**, tendo seu Comitê de Ética aprovado o estudo em 19.10.06.

Pesquisador(a) Responsável: **Dr. Vinicius de Lima Vazquez**

Orientador(a): **Dr. André Lopes Carvalho**

CAPPesq, 14 de fevereiro de 2007.

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Anexo D – Ficha utilizada para coleta de dados dos pacientes

01	RGH REGISTRO GERAL HOSPITALAR	01	
02	PRIMEIRA CONSULTA DIA/MÊS/ANO	02	
03	NOME (INICIAIS)	03	
04	DN DIA/MÊS/ANO	04	
05	SEXO 1-MASCULINO; 2-FEMININO.	05	
06	COR 1-BRANCA; 2-PRETA; 3-PARDA; 4-AMARELA; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	06	
07	TIPO DE AMBIENTE 1-RURAL; 2-URBANO; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	07	
08	EXPOSIÇÃO AO SOL FREQUENTE 1-NÃO; 2-SIM; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	08	
09	TRANSPLANTADO 1-NÃO; 2-RENAL; 3-OUTROS.	09	
10	OUTRAS LESÕES 1-NÃO; 2-CBC; 3-CEC; 4-MELANOMA TRATADO; 5-BENÍGNAS; 6-OUTRAS NEOPLASIAS; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	10	
11	SITUAÇÃO À ADMISSÃO 1-DOENÇA LOCAL; 2-DOENÇA LINFONODAL; 3-DOENÇA METASTÁTICA À DISTÂNCIA; 4- 1 + 2; 5- 1 + 2 + 3; 6- 2 + 3; 7- 1 + 3; 8-SEM DOENÇA; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	11	
12	LOCAL DA LESÃO (PRIMÁRIA) 1-TRONCO; 2-MS; 3-MI; 4-MÃO; 5-PÉ; 6-GENITAL; 7-SEM LESÃO; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	12	
13	LESÃO PRÉVIA (NO LOCAL DO TUMOR) 1-NÃO; 2-QUEIMADURA; 3-CICATRIZ; 4-OUTROS; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	13	
14	BIÓPSIA 1-BIÓPSIA PRÉVIA; 2-BIÓPSIA INCISIONAL; 3-BIÓPSIA EXCISIONAL; 4- OUTROS; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	14	
15	CIRURGIA – RECONSTRUÇÃO (TUMOR PRIMÁRIO) 1-NÃO OPEROU; 2-SÍNTESE; 3-RETALHO; 4-ENXERTO; 5-AMPUTAÇÃO; 6-OUTROS; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	15	
16	CIRURGIA – MARGENS EM (mm); 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	16	
17	DATA DA CIRURGIA DIA/MÊS/ANO; 1-NÃO; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	17	
18	TRATAMENTO ADJUVANTE 1-NÃO; 2-QT; 3-RXT; 4-OUTROS; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	18	
19	LINFADENECTOMIA 1-NÃO; 2-POSITIVA; 3-NEGATIVA; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	19	
20	Nº DE LINFONODOS DISSECADOS NA LINFADENECTOMIA 99-NÃO CONSTA / IGNORADO	20	
21	Nº DE LINFONODOS POSITIVOS NA LINFADENECTOMIA 99-NÃO CONSTA / IGNORADO	21	
22	SÍTIO LINFONODAL 1-AXILA DIREITA; 2-AXILA ESQUERDA; 3-INGUINAL DIREITA; 4-INGUINAL ESQUERDA; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	22	
23	NÚMERO DE BLOCOS DE PARAFINA NO HOSPITAL PARA ESTUDO 99-NÃO CONSTA / IGNORADO	23	
24	BLOCO Nº 99-NÃO CONSTA / IGNORADO	24	
25	BLOCO Nº 99-NÃO CONSTA / IGNORADO	25	
26	BLOCO Nº 99-NÃO CONSTA / IGNORADO	26	
27	BLOCO Nº 99-NÃO CONSTA / IGNORADO	27	
28	ÍNDICE MITÓTICO Nº POR 10 CAMPOS EM GRANDE AUMENTO; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	28	

29	INFILTRADO INFLAMATÓRIO LINFOCITÁRIO PERITUMORAL 1-SIM; 2-NÃO; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	29	
30	INFILTRADO INFLAMATÓRIO LINFOCITÁRIO INTRATUMORAL 1-SIM; 2-NÃO; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	30	
31	INVASÃO VASCULAR LINFÁTICA E SANGÜÍNEA 1-SIM; 2-NÃO; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	31	
32	INVASÃO PERINEURAL 1-SIM; 2-NÃO; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	32	
33	PROFUNDIDADE TUMORAL (BRESLOW) (mm)	33	
34	GRAU DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR 1-I; 2-II; 3-III 99-NÃO CONSTA/IGNORADO	34	
35	T 99-NÃO CONSTA / IGNORADO	34	
36	N 99-NÃO CONSTA / IGNORADO	35	
37	M 99-NÃO CONSTA / IGNORADO	36	
38	ESTÁDIO 1-I; 2-II; 3-III; 4-IV; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	37	
39	METÁSTASES PÓS-TRATAMENTO PRIMÁRIO 1-NÃO; 2-EM TRÂNSITO; 3-CUTÂNEAS FORA DE TRÂNSITO; 4-PULMÃO; 5-FÍGADO; 6-CÉREBRO; 7-OSSOS; 8-TCSC; 9-MEDULA ÓSSEA; 10-PLEURA; 11-PERITÔNIO; 12-OUTROS; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	39	
40	DATA DO SURGIMENTO DA METÁSTASE MÊS/ANO; 1-NÃO; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	40	
41	TRATAMENTO DA METÁSTASE 1-NÃO; 2-QT; 3-RXT; 4-RESSECÇÃO; 5-AMPUTAÇÃO; 6-RESSECÇÃO HIGIÊNICA; 7-LINFADENECTOMIA; 8-OUTROS; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	41	
42	RECIDIVA LOCOREGIONAL 1-NÃO; 2-PELE; 3-LINFONODO; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	42	
43	DATA DA RECIDIVA LOCOREGIONAL MÊS/ANO; 1-NÃO; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	43	
44	TRATAMENTO DA RECIDIVA LOCOREGIONAL 1-NÃO; 2-RESSECÇÃO LIMITADA; 3-AMPUTAÇÃO; 4-RESSECÇÃO HIGIÊNICA; 5-QT; 6-RXT; 7-LINFADENECTOMIA; 8-OUTROS; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	44	
45	STATUS 1-VIVO SEM DOENÇA; 2-VIVO COM DOENÇA; 3-MORTO PELA DOENÇA; 4-MORTO POR OUTRAS CAUSAS; 5-MORTO POR CAUSA DESCONHECIDA; 6-PERDA DE CONTATO; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO.	45	
46	DATA DIA/MÊS/ANO; 99-NÃO CONSTA / IGNORADO	46	

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

1. Marks R. An overview of skin cancers. Incidence and causation. *Cancer*. 1995;75:607-12.
2. Diepgen TL, Mahler V. The epidemiology of skin cancer. *Br J Dermatol*. 2002;146 Suppl 61:1-6.
3. Cancer incidence in five continents. *IARC Sci Publ*. 2008;IX:1-837.
4. Mettlin CJ. Skin cancer and ozone depletion: the case for global action. *J Surg Oncol*. 2001;77:76-8.
5. Leiter U, Garbe C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer-the role of sunlight. *Adv Exp Med Biol*. 2008;624:89-103.
6. Staples MP, Elwood M, Burton RC, Williams JL, Marks R, Giles GG. Non-melanoma skin cancer in Australia: the 2002 national survey and trends since 1985. *Med J Aust*. 2006;184:6-10.
7. Nguyen TH, Ho DQ. Nonmelanoma skin cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2002;3:193-203.
8. Brasil. Ministério da Saúde. *Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA; 2008.
9. Nasser N. Epidemiology of squamous cell cancers in Blumenau - SC - Brazil, from 1980 to 1999. *An Bras Dermatol*. 2004;79:669-77.
10. Nasser N. Epidemiology of basal cell carcinomas in Blumenau, SC, Brazil, from 1980 to 1999. *An Bras Dermatol*. 2005;80:363-8.
11. Trakatelli M, Ulrich C, del Marmol V, Euvrard S, Stockfleth E, Abeni D. Epidemiology of nonmelanoma skin cancer (NMSC) in Europe: accurate and comparable data are needed for effective public health monitoring and interventions. *Br J Dermatol*. 2007;156 Suppl 3:1-7.
12. Lucas R, McMichael T, Smith W. *Environmental Burden of Disease Series* Geneva: World Health Organization; 2006.
13. England. *Cancer Statistics: registrations of cancer diagnosed in 1992, England and Wales*. London: National Statistics; 1998.

14. Giles GG, Marks R, Foley P. Incidence of non-melanocytic skin cancer treated in Australia. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1988;296:13-7.
15. Boi S, Cristofolini M, Micciolo R, Polla E, Dalla Palma P. Epidemiology of skin tumors: data from the cutaneous cancer registry in Trentino, Italy. *J Cutan Med Surg*. 2003;7:300-5.
16. Brantsch KD, Meisner C, Schonfisch B, Trilling B, Wehner-Caroli J, Rocken M, et al. Analysis of risk factors determining prognosis of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. *Lancet Oncol*. 2008;9:713-20.
17. Sociedade Brasileira de Dermatologia. Análise dos dados das campanhas de prevenção ao câncer de pele promovidas pela Sociedade Brasileira de Dermatologia de 1999 a 2005. *An Bras Dermatologia*. 2006;81:533-39.
18. Gray DT, Suman VJ, Su WP, Clay RP, Harmsen WS, Roenigk RK. Trends in the population-based incidence of squamous cell carcinoma of the skin first diagnosed between 1984 and 1992. *Arch Dermatol*. 1997;133:735-40.
19. Collins GL, Nickoonahand N, Morgan MB. Changing demographics and pathology of nonmelanoma skin cancer in the last 30 years. *Semin Cutan Med Surg*. 2004;23:80-3.
20. Athas WF, Hunt WC, Key CR. Changes in nonmelanoma skin cancer incidence between 1977-1978 and 1998-1999 in Northcentral New Mexico. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12:1105-8.
21. Buettner PG, Raasch BA. Incidence rates of skin cancer in Townsville, Australia. *Int J Cancer*. 1998;78:587-93.
22. Clayman GL, Lee JJ, Holsinger FC, Zhou X, Duvic M, El-Naggar AK, et al. Mortality risk from squamous cell skin cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:759-65.
23. Ries LAG, Melbert D, Krapcho M, Stinchcomb DG, Howlader N, Horner MJ, et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2005. Bethesda: National Cancer Institute; 2007 [updated 2007; cited 2007 November, 2007]; Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/.

24. Brasil. Ministério da saúde. Secretaria de atenção à saúde. *Atlas de mortalidade por câncer no Brasil 1979-1999*. Rio de Janeiro: INCA; 2002.
25. Lewis KG, Weinstock MA. Nonmelanoma skin cancer mortality (1988-2000): the Rhode Island follow-back study. *Arch Dermatol*. 2004;140:837-42.
26. Lewis KG, Weinstock MA. Trends in nonmelanoma skin cancer mortality rates in the United States, 1969 through 2000. *J Invest Dermatol*. 2007;127:2323-7.
27. Boyle P, Smans M. *Cancer mortality atlas of European Union* Oxford, UK: Oxford University Press; 2003.
28. Ames FC, Hickey RC. Metastasis from squamous cell skin cancer of the extremities. *South Med J*. 1982;75:920-3, 32.
29. Epstein E. Malignant sun-induced squamous-cell carcinoma of the skin. *J Dermatol Surg Oncol*. 1983;9:505-6.
30. Nixon RL, Dorevitch AP, Marks R. Squamous cell carcinoma of the skin. Accuracy of clinical diagnosis and outcome of follow-up in Australia. *Med J Aust*. 1986;144:235-9.
31. Joseph MG, Zulueta WP, Kennedy PJ. Squamous cell carcinoma of the skin of the trunk and limbs: the incidence of metastases and their outcome. *Aust N Z J Surg*. 1992;62:697-701.
32. Czarnecki D, Staples M, Mar A, Giles G, Meehan C. Metastases from squamous cell carcinoma of the skin in southern Australia. *Dermatology*. 1994;189:52-4.
33. Rosenblatt L, Marks R. Deaths due to squamous cell carcinoma in Australia: is there a case for a public health intervention? *Australas J Dermatol*. 1996;37:26-9.
34. North JH, Jr., Spellman JE, Driscoll D, Velez A, Kraybill WG, Petrelli NJ. Advanced cutaneous squamous cell carcinoma of the trunk and extremity: analysis of prognostic factors. *J Surg Oncol*. 1997;64:212-7.

35. Kraus DH, Carew JF, Harrison LB. Regional lymph node metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998;124:582-7.
36. Cherpelis BS, Marcusen C, Lang PG. Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin. *Dermatol Surg.* 2002;28:268-73.
37. Moore BA, Weber RS, Prieto V, El-Naggar A, Holsinger FC, Zhou X, et al. Lymph node metastases from cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope.* 2005;115:1561-7.
38. Sobin LH, Wittekind C, International Union against Cancer. *TNM: classification of malignant tumours.* 6th ed. New York: Wiley-Liss; 2002.
39. Mullen JT, Feng L, Xing Y, Mansfield PF, Gershenwald JE, Lee JE, et al. Invasive squamous cell carcinoma of the skin: defining a high-risk group. *Ann Surg Oncol.* 2006;13:902-9.
40. de Lima Vazquez V, Sachetto T, Perpetuo NM, Carvalho AL. Prognostic factors for lymph node metastasis from advanced squamous cell carcinoma of the skin of the trunk and extremities. *World J Surg Oncol.* 2008;6:73.
41. Lindelof B, Sigurgeirsson B, Gabel H, Stern RS. Incidence of skin cancer in 5356 patients following organ transplantation. *Br J Dermatol.* 2000;143:513-9.
42. Martinez JC, Otley CC, Stasko T, Euvrard S, Brown C, Schanbacher CF, et al. Defining the clinical course of metastatic skin cancer in organ transplant recipients: a multicenter collaborative study. *Arch Dermatol.* 2003;139:301-6.
43. Falsarella PM, Alves-Filho G, Mazzali M. Skin malignancies in renal transplant recipients: a Brazilian center registry. *Transplant Proc.* 2008;40:767-8.
44. Navarro MD, Lopez-Andreu M, Rodriguez-Benot A, Aguera ML, Del Castillo D, Aljama P. Cancer incidence and survival in kidney transplant patients. *Transplant Proc.* 2008;40:2936-40.

45. Smith J, Mello LF, Nogueira Neto NC, Meohas W, Pinto LW, Campos VA, et al. Malignancy in chronic ulcers and scars of the leg (Marjolin's ulcer): a study of 21 patients. *Skeletal Radiol.* 2001;30:331-7.
46. Copcu E, Aktas A, Sisman N, Oztan Y. Thirty-one cases of Marjolin's ulcer. *Clin Exp Dermatol.* 2003;28:138-41.
47. Kowal-Vern A, Criswell BK. Burn scar neoplasms: a literature review and statistical analysis. *Burns.* 2005;31:403-13.
48. Kerr-Valentic MA, Samimi K, Rohlen BH, Agarwal JP, Rockwell WB. Marjolin's ulcer: modern analysis of an ancient problem. *Plast Reconstr Surg.* 2009;123:184-91.
49. Eroglu A, Berberoglu U, Berreroğlu S. Risk factors related to locoregional recurrence in squamous cell carcinoma of the skin. *J Surg Oncol.* 1996;61:124-30.
50. Cassarino DS, Derienzo DP, Barr RJ. Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification. Part one. *J Cutan Pathol.* 2006;33:191-206.
51. Cassarino DS, Derienzo DP, Barr RJ. Cutaneous squamous cell carcinoma: a comprehensive clinicopathologic classification--part two. *J Cutan Pathol.* 2006;33:261-79.
52. Breslow A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg.* 1970;172:902-8.
53. Balch CM, Soong SJ, Milton GW, Shaw HM, McGovern VJ, Murad TM, et al. A comparison of prognostic factors and surgical results in 1,786 patients with localized (stage I) melanoma treated in Alabama, USA, and New South Wales, Australia. *Ann Surg.* 1982;196:677-84.
54. Breuninger H, Black B, Rassner G. Microstaging of squamous cell carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 1990;94:624-7.
55. Khanna M, Fortier-Riberdy G, Smoller B, Dinehart S. Reporting tumor thickness for cutaneous squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol.* 2002;29:321-3.

56. Petter G, Haustein UF. Squamous cell carcinoma of the skin--histopathological features and their significance for the clinical outcome. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 1998;11:37-44.
57. Breuninger H, Schaumburg-Lever G, Holzschuh J, Horny HP. Desmoplastic squamous cell carcinoma of skin and vermilion surface: a highly malignant subtype of skin cancer. *Cancer*. 1997;79:915-9.
58. Broders AC. Squamous-Cell Epithelioma of the Skin: A Study of 256 Cases. *Ann Surg*. 1921;73:141-60.
59. Soto Fernando PP, Bosca AR, Hernandez CD, Marco PA, Rodellas AC. Epitelioma espinocelular. Factores de riesgo en la aparición de metástasis. *Med Cutan Ibero Lat Am*. 1988;16:277-80
60. Roskoski R, Jr. The ErbB/HER receptor protein-tyrosine kinases and cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;319:1-11.
61. Seshadri R, Firgaira FA, Horsfall DJ, McCaul K, Setlur V, Kitchen P. Clinical significance of HER-2/neu oncogene amplification in primary breast cancer. The South Australian Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 1993;11:1936-42.
62. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med*. 2001;344:783-92.
63. Kalyankrishna S, Grandis JR. Epidermal growth factor receptor biology in head and neck cancer. *J Clin Oncol*. 2006;24:2666-72.
64. Wang KL, Wu TT, Choi IS, Wang H, Resetkova E, Correa AM, et al. Expression of epidermal growth factor receptor in esophageal and esophagogastric junction adenocarcinomas: association with poor outcome. *Cancer*. 2007;109:658-67.
65. Murat A, Migliavacca E, Gorlia T, Lambiv WL, Shay T, Hamou MF, et al. Stem cell-related "self-renewal" signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J Clin Oncol*. 2008;26:3015-24.

66. Kapitanovic S, Radošević S, Slade N, Kapitanovic M, Andelinovic S, Ferencic Z, et al. Expression of erbB-3 protein in colorectal adenocarcinoma: correlation with poor survival. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2000;126:205-11.
67. Hayashi M, Inokuchi M, Takagi Y, Yamada H, Kojima K, Kumagai J, et al. High expression of HER3 is associated with a decreased survival in gastric cancer. *Clin Cancer Res.* 2008;14:7843-9.
68. Wiseman SM, Makretsov N, Nielsen TO, Gilks B, Yorlida E, Cheang M, et al. Coexpression of the type 1 growth factor receptor family members HER-1, HER-2, and HER-3 has a synergistic negative prognostic effect on breast carcinoma survival. *Cancer.* 2005;103:1770-7.
69. Gilmour LM, Macleod KG, McCaig A, Gullick WJ, Smyth JF, Langdon SP. Expression of erbB-4/HER-4 growth factor receptor isoforms in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001;61:2169-76.
70. Xu S, Kitayama J, Yamashita H, Souma D, Nagawa H. Nuclear translocation of HER-4/c-erbB-4 is significantly correlated with prognosis of esophageal squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol.* 2008;97:44-50.
71. Liu B, Zhang H, Li S, Chen W, Li R. The expression of c-erbB-1 and c-erbB-2 oncogenes in basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma of skin. *Chin Med Sci J.* 1996;11:106-9.
72. Ahmed NU, Ueda M, Ichihashi M. Increased level of c-erbB-2/neu/HER-2 protein in cutaneous squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol.* 1997;136:908-12.
73. Krahm G, Leiter U, Kaskel P, Udart M, Utikal J, Bezold G, et al. Coexpression patterns of EGFR, HER2, HER3 and HER4 in non-melanoma skin cancer. *Eur J Cancer.* 2001;37:251-9.
74. Shimizu T, Izumi H, Oga A, Furumoto H, Murakami T, Ofuji R, et al. Epidermal growth factor receptor overexpression and genetic aberrations in metastatic squamous-cell carcinoma of the skin. *Dermatology.* 2001;202:203-6.

75. Maubec E, Duvillard P, Velasco V, Crickx B, Avril MF. Immunohistochemical analysis of EGFR and HER-2 in patients with metastatic squamous cell carcinoma of the skin. *Anticancer Res.* 2005;25:1205-10.
76. Fogarty GB, Conus NM, Chu J, McArthur G. Characterization of the expression and activation of the epidermal growth factor receptor in squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Dermatol.* 2007;156:92-8.
77. Son KD, Kim TJ, Lee YS, Park GS, Han KT, Lim JS, et al. Comparative analysis of immunohistochemical markers with invasiveness and histologic differentiation in squamous cell carcinoma and basal cell carcinoma of the skin. *J Surg Oncol.* 2008;97:615-20.
78. Potter E, Bergwitz C, Brabant G. The cadherin-catenin system: implications for growth and differentiation of endocrine tissues. *Endocr Rev.* 1999;20:207-39.
79. Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg.* 2000;87:992-1005.
80. Wu H, Lotan R, Menter D, Lippman SM, Xu XC. Expression of E-cadherin is associated with squamous differentiation in squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 2000;20:1385-90.
81. Lyakhovitsky A, Barzilai A, Fogel M, Trau H, Huszar M. Expression of e-cadherin and beta-catenin in cutaneous squamous cell carcinoma and its precursors. *Am J Dermatopathol.* 2004;26:372-8.
82. Koseki S, Aoki T, Ansai S, Hozumi Y, Mitsunashi Y, Kondo S. An immunohistochemical study of E-cadherin expression in human squamous cell carcinoma of the skin: relationship between decreased expression of E-cadherin in the primary lesion and regional lymph node metastasis. *J Dermatol.* 1999;26:416-22.
83. Schacht V, Ramirez MI, Hong YK, Hirakawa S, Feng D, Harvey N, et al. T1alpha/podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. *EMBO J.* 2003;22:3546-56.
84. Yu H, Pinkus GS, Hornick JL. Diffuse membranous immunoreactivity for podoplanin (D2-40) distinguishes primary and metastatic seminomas

- from other germ cell tumors and metastatic neoplasms. *Am J Clin Pathol.* 2007;128:767-75.
85. Xuan M, Fang YR, Wato M, Hata S, Tanaka A. Immunohistochemical co-localization of lymphatics and blood vessels in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 2005;34:334-9.
 86. Ordonez NG. D2-40 and podoplanin are highly specific and sensitive immunohistochemical markers of epithelioid malignant mesothelioma. *Hum Pathol.* 2005;36:372-80.
 87. Yang HM, Cabral E, Dadras SS, Cassarino DS. Immunohistochemical expression of D2-40 in benign and malignant sebaceous tumors and comparison to basal and squamous cell carcinomas. *Am J Dermatopathol.* 2008;30:549-54.
 88. Brenn T, Mckee P. Tumor of the surface epithelium: Squamous cell carcinoma. In: *Pathology of the skin with clinical correlations* Mckee PC, E. Granter, SR., editor. 3 ed. London: Elsevier Mosby; 2005. p. 1199-209.
 89. Hsu SM, Raine L. Protein A, avidin, and biotin in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 1981;29:1349-53.
 90. Lager DJ, Slagel DD, Palechek PL. The expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor alpha in renal cell carcinoma. *Mod Pathol.* 1994;7:544-8.
 91. Padgett DM, Cathro HP, Wick MR, Mills SE. Podoplanin is a better immunohistochemical marker for sarcomatoid mesothelioma than calretinin. *Am J Surg Pathol.* 2008;32:123-7.
 92. SPSS. Statistical package for social science, statistical data analysis for Windows. 10.0 ed. Chicago; 2004.
 93. Cox DR. Regression Models and Life-Tables. *J R Stat Soc B.* 1972;34:187-220.
 94. Johnson TM, Rowe DE, Nelson BR, Swanson NA. Squamous cell carcinoma of the skin (excluding lip and oral mucosa). *J Am Acad Dermatol.* 1992;26:467-84.

95. Rowe DE, Carroll RJ, Day CL, Jr. Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell carcinoma of the skin, ear, and lip. Implications for treatment modality selection. *J Am Acad Dermatol.* 1992;26:976-90.
96. Griffiths RW, Feeley K, Suvarna SK. Audit of clinical and histological prognostic factors in primary invasive squamous cell carcinoma of the skin: assessment in a minimum 5 year follow-up study after conventional excisional surgery. *Br J Plast Surg.* 2002;55:287-92.
97. Nollet F, Berx G, van Roy F. The role of the E-cadherin/catenin adhesion complex in the development and progression of cancer. *Mol Cell Biol Res Commun.* 1999;2:77-85.
98. Nawrocki B, Polette M, Van Hengel J, Tournier JM, Van Roy F, Birembault P. Cytoplasmic redistribution of E-cadherin-catenin adhesion complex is associated with down-regulated tyrosine phosphorylation of E-cadherin in human bronchopulmonary carcinomas. *Am J Pathol.* 1998;153:1521-30.
99. Veness MJ. Defining patients with high-risk cutaneous squamous cell carcinoma. *Australas J Dermatol.* 2006;47:28-33.
100. Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2005;206:170-7.
101. Linggi B, Carpenter G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends Cell Biol.* 2006;16:649-56.
102. Haugen DR, Akslen LA, Varhaug JE, Lillehaug JR. Expression of c-erbB-3 and c-erbB-4 proteins in papillary thyroid carcinomas. *Cancer Res.* 1996;56:1184-8.

Apêndice

Research

Open Access

Prognostic factors for lymph node metastasis from advanced squamous cell carcinoma of the skin of the trunk and extremities

Vinicius de Lima Vazquez*¹, Teoclito Sachetto², Natalia Martins Perpetuo¹ and Andre Lopes Carvalho¹

Address: ¹Department of Surgery, Hospital de Cancer de Barretos, Rua Antenor Duarte Villela, 1331 Barretos – SP, 14784-400, Brazil and ²Department of pathology, Hospital de Cancer de Barretos, Rua Antenor Duarte Villela, 1331 Barretos – SP, 14784-400, Brazil

Email: Vinicius de Lima Vazquez* - viniciusvazquez@gmail.com; Teoclito Sachetto - teosc@usp.br; Natalia Martins Perpetuo - fnatalia@gmail.com; Andre Lopes Carvalho - cyan@uol.com.br

* Corresponding author

Published: 4 July 2008

Received: 3 March 2008

World Journal of Surgical Oncology 2008, 6:73 doi:10.1186/1477-7819-6-73

Accepted: 4 July 2008

This article is available from: <http://www.wjso.com/content/6/1/73>

© 2008 Vazquez et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Squamous cell carcinoma (SCC) of the skin of the trunk and extremities may present lymph node metastasis with difficult disease control and poor survival. The purpose of this study was to identify risk factors for lymph node metastasis and outcome.

Patients/Methods: Retrospective review of 57 patients with locally advanced SCC of the trunk and extremities was performed and several clinical variables including age, gender, ethnicity, previously injured skin (burns, scars, ulcers and others), patient origin (rural or urban), anatomic site and treatment were studied.

Results: Fifteen patients presented with previous skin lesions. Thirty-six were classified as T3 tumors and 21 as T4; 46 were N0, and 11, N1. Eleven N0 patients presented lymph node metastasis during follow up. Univariate analysis identified previous skin lesions (ulcers and scars) as risk factor for lymph node metastasis ($p = 0.047$). Better survival was demonstrated for T3 ($p = 0.018$) classification. N0 patients who presented lymph node metastasis during follow up (submitted to lymphadenectomy) had similar survival to patients without lymph node recurrence ($p = 0.219$).

Conclusion: Local advanced tumors are at risk of lymph node metastasis. Increased risk is associated to previous lesions at tumor site. T4 classification have worse prognosis. Lymph node recurrences in N0 patients, once treated, did not affect survival. For these patients, we propose close follow up and prompt treatment of lymph node metastasis. These results do not support indication for elective lymphadenectomy or sentinel node mapping. Further prospective studies must address this issue.

Background

Squamous cell carcinoma of the skin (SCCS) is one of the most common cancers around the world [1,2], with an increasing incidence at a rapid rate among Caucasians in Europe, America and Australia [3-6]. It affects typically

white skin populations and usually in body areas under sun exposure. In majority of cases the progression is indolent, and is easily cured by simple excision or radiotherapy.

Different from head and neck skin squamous cell carcinomas that present a higher incidence of lymph node addressed by several studies [7-9], trunk and extremities tumors usually do not present metastasis and the biological behavior is less aggressive [10,11]. Although it may be uncommon for a practicing dermatologist to observe a metastasis, locally advanced tumors, more frequent observed in referral hospitals, may present higher local recurrence and tissue invasion, regional lymphatic and even distant metastasis, consisting in a high risk group [11,12]. Most of those cases have a late progress to lymph node metastasis, with advanced local and regional disease. Nevertheless, at this point, disease control is difficult and survival is poor [10-13].

The frequency of lymph node metastasis is debatable and the reported rates vary considerable among investigators, from 0.1 to 28%, with a resulting mortality from 50-75%. Also, the inclusion of head and neck tumors in those series is common [13,14]. Few studies have addressed specifically the SCCS of the trunk and extremities [10,11,15,16]. Some have looked at several prognostic factors, but most of them are heterogeneous or include also initial stage lesions and head and neck tumors [10-16].

The present study investigates a consecutive series of only localized advanced SCCS of the trunk and extremities, in order to define prognostic factors to lymph node metastasis and survival.

Methods

Patients with locally advanced SCCS (T3 and T4 classification - AJCC) [17] were identified from the Hospital do Cancer de Barretos database - Barretos - Brazil. Patients with tumors from head and neck or genital origin were excluded. Patients with previous cancer diagnosis with exception to cutaneous basal cell carcinoma were also excluded due the difficulty to diagnosis the possible origin of metastasis or death of cancer. A total of 57 consecutive patients admitted and treated from October 1987 to November 2005 were evaluated. Pathologic diagnosis of SCC was confirmed in all cases. All of them were classified according to the 2002 American Joint Committee on Cancer staging system and have T3 (tumor >5 cm) or T4 (invasive of deep extra-dermal structures) classification. Institutional Review Board approval was obtained and all information retrospectively collected from medical records.

Several clinical variables were examined. These include age, gender, ethnicity, preceding chronic skin lesions (burns, scars, varicosae ulcers and others) at the site of the tumor, patient origin (rural or urban), anatomic

site and treatment. Patterns of lymph node metastasis, recurrence and survival outcomes were also recorded.

We classified the patients related to lymph node metastasis as: N0 - patients with no evidence of lymph node metastasis at presentation; N0f - patients with no evidence of lymph node metastasis at any time; N1 - patients with lymph node metastasis at presentation; N1f - patients with lymph node metastasis during follow up.

We considered lymph node metastasis at presentation (N1) or during follow up (N1f) as endpoint. To analyze the association between clinical variables and lymph node metastasis the chi square, Fisher exact and T-test was used. Overall survival (OS) was also studied, and curves were constructed using the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. All tests were two-sided, and a p-value of ≤ 0.05 was considered statistically significant.

Results

We included 57 patients in this study. They were 34 men and 23 women; mean age was 61.9 years (range 30-91 years). 48 were Caucasians and 48 came from urban areas. Preceding chronic skin lesions at the site of SCC occurred in 15 cases. The tumors were sited at: the trunk, 14 patients; upper extremity (shoulder, arm and forearm), 7; lower extremity (thigh and leg) 16; hand 12 and foot 8. The T classification was T3 in 36 cases and T4 in 21 cases. 11 patients initially presented with lymph node metastasis (N1).

Surgery was performed in 46 patients; exclusive radiation therapy in 11. Eight patients received adjuvant radiation therapy. Four of them on the area of lymph node metastasis after lymphadenectomy, at discretion of the attending physician. Major concerns were coalescent tumor and more than 4 lymph node metastasis. Other 4 patients received neoadjuvant radiation on the site of primary tumor, with intention of local response and posterior limb sparing surgery, what was possible in one patient. Lymph node dissection was performed in 21 patients, 11 at the time of primary surgery and 10 during the follow up period. No elective lymph node dissection or sentinel node dissection was performed (Table 1). From 46 patients submitted to surgery, 38 had local control (82.6%) and 8 (17.4%) local recurrence. From 11 patients who received radiation therapy, 9 achieved local control. Recurrence occurred in 2 (18.2%). There was no difference between the treatment modalities ($p = 1.0$).

From all patients, 22 presented nodal disease. 11 of them presented lymph node metastasis at diagnosis (N1), another 11 cases presented lymph node disease during follow up (N1f) and the median time for it be diagnosed

Table 1: Treatment of 57 patients and characteristics of lymph node metastasis

Treatment	Number	%
Surgery		
Wide local excision	1	1.8
Graft or flap	21	38.6
Amputation/desarticulation	24	42.1
Radiation therapy	11	19.3
Characteristics of lymph node metastasis		
Anatomic site		
Right axilla	4	7.0
Left axilla	7	12.3
Right inguinal groin	4	7.0
Left inguinal groin	7	12.3
None	35	61.4
Time of presentation		
Initial (N1)	11	19.6
Recurrence (N1f)	11	19.6
None	35	60.8

was 11.5 months (ranging from 1.6 to 33.8 months). The distribution of the lymph node metastasis in all cases is presented in Table 1. 21 of those patients underwent lymph node dissection, and 6 of them recurred at the lymph node basin.

Of 11 patients who presented lymph node metastasis during follow up, 7 (63.6%) were T3 and 4 (36.4%) were T4. Nine were submitted to lymphadenectomy, 01 was treated with radiotherapy and 01 refused treatment. The treatment of choice of the primary tumor was radiotherapy in 2 (18.2%). Five (45.5%) had surgery with local reconstruction and 4 (36.4%) amputation. All patients achieved local control of the primary tumor.

Considering the other recurrences, local ones occurred in 6 cases and 4 patients presented distant metastasis: one patient had lung metastasis only, 2 had lung and bone metastasis and the other one had disseminated metastatic disease (lung, bone, liver and skin). The untreated patient with lymph node metastasis had advanced local disease and refused any treatment.

At the time of last follow up, 19 patients were alive without evidence of disease, 17 died due to disease and 12 died from other causes. Nine patients were lost of follow up. Actuarial 5-years overall survival was 40.6%.

The only statistically significant clinical variable associated to increased number of lymph node metastasis was the presence of previous lesions on the skin. 9 of 22 patients with lymph node metastasis over the time pre-

sented previous lesions, versus 6 who did not ($p = 0.047$). Lesions located in upper extremity presented more lymph node metastasis, but did not reach statistical significance. 5 of 7 cases presented metastasis versus 17 of 50 from other locations ($p = 0.095$). Regarding the N0 patients, 11 presented lymph node metastasis during the follow up period (N1f) and again previous lesion was the only statistically significant factor: 5 of 11 patients with preceding chronic skin lesion at the site of SCC presented lymph node metastasis, versus 6 of 35 ($p = 0.050$). The mean time of presentation of lymph node metastasis in the 11 N1f group was 12.7 months (median, 11.5 months). Yet, the mean follow up of patients that never presented lymph node metastasis over the time (N0f) was 30.6 months (median, 22.7 months) (Table 2).

Comparative survival curves demonstrate differences in actuarial overall survival among patients with T3 and T4 classification (5 years overall survival 48.7% vs. 24.2%, $p = 0.018$) (Figure 1). Among N0 and N1, there was difference, but it was not statistically significant (43.3% vs. 34.1%, $p = 0.070$) (Figure 2). The treatment of choice of the primary tumor did not show differences in overall survival. Actuarial 5-years survival was 42.15% in the surgery group versus 40.91% ($p = 0.659$) in the radiation group. Overall survival estimative for N0 patients did not show difference regarding the presentation of lymph node metastasis over the time (N1f vs. N0f): (33.9% vs. 46.2%, $p = 0.948$) (Figure 3) (Table 3). Despite the risk for development of lymph node metastasis, comparative survival did not show difference between patients with previous skin lesions or not (37.7% vs. 42.2%, $p = 0.507$) (Figure 4).

Discussion

In our series of 57 locally advanced SCCS of the trunk and extremities, we observed a high frequency of lymph node metastasis. However, univariate analysis identified only one significant risk factor for development of lymph node metastasis, the presence of scar or ulcers previously in the area of the tumor. This was observed also in other studies [10,18]. The association of UV damage and a burn or chronic wound may be associated to the aggressiveness and metastasis in these patients. The anatomic site may be a risk factor (upper extremity presented with more lymph node metastasis), but the number of our cases was not able to show statistical significance. Other studies reported anatomic sites as high risk for metastasis, but with conflicting results, and including head and neck tumors [7,19,20].

The 24 cases of amputations (42.1%) also reflected the selection of local advanced disease. Sixteen of 24 cases (66.7%) were T4. Most of them had no possibility to try other local treatment. Clinical difficulty to major recon-

Table 2: Univariate analysis of risk factors for lymph node metastasis

Variable	LN - (N0f) n (%)	LN + (N1+N1f) n (%)	p value
Age (mean)	64.22	58.38	0.154*
Gender			0.407*
Male	19 (33.3)	15 (26.3)	
Female	16 (28.1)	7 (12.3)	
Ethnicity			0.514†
Caucasian	31 (54.4)	17 (29.8)	
African	1 (1.7)	1 (1.7)	
Residence			0.408*
Urban	30 (52.6)	18 (31.6)	
Rural	5 (8.8)	1 (1.7)	
Lesion location			0.095*
Upper extremity (without hand)	2 (3.5)	5 (8.8)	
Trunk, hand and lower extremity	33 (57.9)	17 (29.9)	
Previous lesion			0.047†
Present	6 (10.5)	09 (15.8)	
Absent	29 (50.9)	13 (22.8)	
Treatment modality			0.309*
Surgery	27 (47.4)	19 (33.3)	
Radiation therapy	8 (14.0)	3 (5.3)	
T stage			0.158*
T3	25 (43.8)	11 (19.3)	
T4	10 (17.5)	11 (19.3)	

* T – test

† Chi square

* Fisher exact

Figure 1
Overall survival for T3 and T4 patients.

struction was a concern in some cases, like diminished vascular irrigation, old age, cardiovascular diseases or other morbidities.

From our patients, 22 presented lymph node metastasis. The high incidence of metastasis in this selected group, confirms that tumors greater than 5 cm or invasive to soft tissue or bones (T3 and T4) are high risk for lymphatic spread. The 11 patients with metastasis at presentation, also reflects possible referral bias to tertiary cancer center and is similar to other reports [10,15]. Comparative survival demonstrates that more advanced tumors (T4) had worse prognosis with poor outcome. This was expected and confirms the value of T stage from the TNM classification as a prognostic tool. The diagnosis of lymph node metastasis during follow-up in N0 patients occurred in 24.4% of cases. This information would be enough for indication of elective lymphadenectomy or sentinel node dissection in most tumors. However, survival analysis among patients without initial lymph node metastasis (N0), showed no difference considering those who devel-

Figure 2
Overall survival for N0 and N1 patients.

oped lymph node metastasis during the follow up or not (N0f versus N1f). One comment is that all the patients were closely followed, and lymph node disease was treated by lymph node dissection soon after diagnosis. So, similar survival might be explained by the prompt therapy. It is important to advert this was a retrospective study with a relatively small sample with heterogeneous treatment options, submitted to Univariate analyze. The results show no indication for elective lymph node dissection, or sentinel node mapping in these specific setting of patients, since careful surveillance and early surgery after clinical/radiological diagnosis is performed, but this affirmation needs confirmation in prospectively randomized

Figure 3
Overall survival for N0 patients considering presence of lymph node metastasis during follow-up.

Figure 4
Overall survival considering the presence of previous skin lesions.

studies. Distant metastasis is not usual even in locally advanced or after lymph node metastasis in SCCS of the trunk and extremities. Only 4 patients had metastasis in distant organs. Despite of this, approximately 1/3 of patients died of disease, mainly due to loco-regional failure, which is the major problem in control disease of these patients.

Conclusion

Local advanced tumors are at risk of lymph node metastasis. Increased risk is associated to previous lesions at tumor site, and T4 classification tumors have worse prognosis. Lymph node recurrences in N0 patients, once treated, did not affect survival. For these patients, we propose close follow up and prompt treatment of lymph

Table 3: Overall survival of 57 patients with advanced SCCS according to clinical variables

Groups	N	5-years survival (%)	p value
T stage			0.018
T3	36	48.7	
T4	21	24.2	
N stage			0.070
N0	46	43.3	
N1	11	34.1	
Anatomic site			0.378
Upper extremity	07	47.6	
Other	50	40.0	
Previous lesion			0.507
Present	15	37.7	
Absent	42	42.2	
Lymph node metastasis			0.948
Present (N1f)	11	33.9	
Absent (N0f)	35	46.2	

node metastasis. These results do not support indication for elective lymphadenectomy or sentinel node mapping. Further prospective studies must address this issue.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

VLV: Conception, design, analysis of data; TS: Acquisition and analysis of data; NMP: Acquisition and analysis of data; ALC: Interpretation of data, critical review, design. All authors read and approved the final manuscript.

References

1. Marks R: **An overview of skin cancers. Incidence and causation.** *Cancer* 1995, **75**:607-612.
2. Diepgen TL, Mahler V: **The epidemiology of skin cancer.** *Br J Dermatol* 2002, **146**(suppl 61):1-6.
3. Glass AG, Hoover RN: **The emerging epidemic of melanoma and squamous cell skin cancer.** *JAMA* 1989, **262**:2097-2100.
4. Gray DT, Suman VJ, Su WP, Clay RP, Harmsen WS, Roenigk RK: **Trends in the population-based incidence of squamous cell carcinoma of the skin first diagnosed between 1984 and 1992.** *Arch Dermatol* 1997, **133**:735-740.
5. Trakatelli M, Ulrich C, del Marmol V, Euvrard S, Stockfleth E, Abeni D: **Epidemiology of nonmelanoma skin cancer (NMSC) in Europe: accurate and comparable data are needed for effective public health monitoring and interventions.** *Br J Dermatol* 2007, **156**(Suppl 3):1-7.
6. Staples M, Marks R, Giles G: **Trends in the incidence of non-melanocytic skin cancer (NMSC) treated in Australia 1985-1995: are primary prevention programs starting to have an effect?** *Int J Cancer* 1998, **78**:144-148.
7. Dinehart SM, Pollack SV: **Metastases from squamous cell carcinoma of the skin and lip.** *J Am Acad Dermatol* 1989, **21**:241-248.
8. Vauterin TJ, Veness MJ, Morgan GJ, Poulsen MG, O'Brien CJ: **Patterns of lymph node spread of cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck.** *Head Neck* 2006, **28**:785-791.
9. O'Brien CJ, McNeil EB, McMahon JD, Pathak I, Lauer CS: **Incidence of cervical node involvement in metastatic cutaneous malignancy involving the parotid gland.** *Head Neck* 2001, **23**:744-748.
10. Joseph MG, Zulueta WP, Kennedy PJ: **Squamous Cell Carcinoma of the skin of the trunk and limbs: The incidence of metastases and their outcome.** *Aust N Z J Surg* 1992, **62**:697-701.
11. Ames FC, Hickey RC: **Squamous cell carcinoma of the skin of the extremities.** *Int Adv Surg Oncol* 1980, **3**:179-199.
12. Mullen JT, Feng L, Xing Y, Mansfield PF, Gershenwald JE, Lee JE, Ross MI, Cormier JN: **Invasive squamous cell carcinoma of the skin: Defining a high-risk group.** *Ann Surg Oncol* 2006, **13**:902-909.
13. Johnson TM, Rowe DE, Nelson BR, Swanson NA: **Squamous cell of the skin (excluding lip and oral mucosa).** *J Am Acad Dermatol* 1992, **26**:267-284.
14. Chapell BS, Marcusen C, Lang PG: **Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin.** *Dermatol Surg* 2002, **28**:268-73.
15. Ames FC, Hickey RC: **Metastasis from squamous cell skin cancer of the extremities.** *South Med J* 1982, **75**:920-923.
16. North JH Jr, Spellman JE, Driscoll D, Velez A, Kraybill WG, Petrelli NJ: **Advanced cutaneous squamous cell carcinoma of the trunk and extremity: analysis of prognostic factors.** *J surg Oncol* 1997, **64**:212-217.
17. International Union Against Cancer (UICC): **TNM Classification of malignant tumors** Sixth edition. 2002:72-76.
18. Edwards MJ, Hirsch RM, Broadwater JR, Netscher DT, Ames FC: **Squamous cell carcinoma arising in previously burned or irradiated skin.** *Arch Surg* 1989, **124**:115-117.
19. Roenigk RK: **Mohs micrographic surgery.** *Mayo Clin Proc* 1988, **63**:175-183.
20. Rowe DE, Carrol RJ, Day CL Jr: **Prognostic factors for local recurrence, metastasis, and survival rates in squamous cell**

carcinoma of the skin, ear and lip: implications for treatment modality selection. *J Am Acad Dermatol* 1992, **26**:976-990.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp