

Características clínicas dos linfonodos estão relacionadas com a invasão do carcinoma em pele de camundongos

Clinical characteristics of lymph nodes are associated to carcinoma invasiveness in mice skin

Mara Luana Batista Severo¹, Elaine Dias do Carmo², Luiz Eduardo Blumer Rosa³, Marco Antonio Dias da Silva⁴, Andresa Costa Pereira^{4*}

¹Mestrando. Programa de Pós Graduação em Patologia Oral. UFRN; ²Professor Doutor. FMU; ³Professor Doutor. UNESP; ⁴Professor. Doutor. UFCCG

Resumo

Introdução: Na carcinogênese em pele de camundongos *hairless*, as lesões neoplásicas produzidas são semelhantes às da pele humana, permitindo analisar de forma mais padronizada e criteriosa as características clinicopatológicas da lesão. **Objetivo:** Avaliar a relação entre a presença clínica de linfonodos infartados e as características histopatológicas de diferenciação celular, padrão e estágio de invasão de lesões de carcinoma espinocelular quimicamente induzido na pele de camundongos *hairless*. **Metodologia:** Quarenta camundongos *hairless* foram submetidos à carcinogênese química (DMBA 0,5%) induzida em pele, durante 16 semanas. Na 17ª semana, os animais foram fotografados (para posterior avaliação clínica quanto à presença de linfonodos infartados) e as lesões foram biopsiadas para avaliação histopatológica quanto à diferenciação celular, o padrão e o estágio de invasão, seguida, da tabulação dos dados e análise estatística. **Resultados:** Observou-se que a invasão mais profunda da lesão (em hipoderme e camada muscular) foi observada apenas nos animais com linfonodos infartados e que todos os animais com linfonodos normais, apresentaram invasão apenas da derme ($p = 0,005$). Ademais, quando os linfonodos apresentaram volume normal, não existiu uma associação com lesões em pele bem diferenciadas. Esses dados mostram a tendência ao bom prognóstico de casos sem comprometimento linfonodal de carcinomas em pele de camundongos, estando de acordo com estudos em humanos. **Conclusão:** Há uma relação da presença clínica de linfonodos infartados com a invasão profunda de lesões de carcinoma espinocelular quimicamente induzido na pele de camundongos *hairless*.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas. 9,10-dimetil-1,2-benzantraceno. Diferenciação celular. Invasividade neoplásica. Linfonodos.

Abstract

Introduction: In chemically carcinogenesis in *hairless* mice skin, neoplastic lesions produced are similar to human, allowing us to analyze in a more standardized and rigorous clinic pathological characteristics of the lesion. **Objective:** To evaluate the relationship between the clinical presence of lymph node infarction and histopathological features (cell differentiation, pattern and invasion stage) in chemically induced squamous cell carcinoma in *hairless* mice skin. **Methodology:** Forty *hairless* mice were submitted to chemically induced skin carcinogenesis (DMBA 0.5 %) during 16 weeks. At 17th week, the animal were photographed (for further clinical evaluation for the presence of lymph node infarction) and the skin lesions were biopsied and histologically evaluated regarding cell differentiation, pattern, and invasion stage, added to data tabulation and statistical analysis. **Results:** It was observed that a deeper invasion (in the hypodermis and muscle layer) was observed only in the animals with infarcted lymph nodes and that all animals with normal lymph nodes showed only dermal invasion ($p = 0.005$). In addition, there was no association between normal lymph nodes and well differentiated skin lesion. These data show the tendency to good prognosis of cases with no lymph node involvement in carcinoma of the skin of mice, which is consistent with human studies. **Conclusion:** There is a relationship between the clinical presence of lymph node infarction and lesions with deep invasion, in chemically induced squamous cell carcinoma in *hairless* mice skin.

Keywords: Squamous cell carcinoma. 9,10-dimethyl-1,2-benzanthracene. Cell differentiation. Neoplasm invasiveness. Lymph nodes.

INTRODUÇÃO

Na atualidade, um dos maiores problemas de saúde pública é o câncer, sendo que o número de casos dessa patologia por ano é alarmante. No Brasil, segundo a última estimativa do Instituto Nacional de Câncer (INCA), seriam mais de 550.000 novos casos de câncer em 2014¹.

Entre os cânceres mais comuns está o câncer de pele não melanoma, que nos últimos anos, teve a incidência de casos aumentada consideravelmente ^{2,3}. O subtipo mais frequente é o carcinoma espinocelular (CEC), caracterizado por uma proliferação atípica de células da camada espinhosa epitelial, com caráter invasor e potencial de produzir metástases^{4,5}.

A mortalidade do CEC cutâneo é devida geralmente a progressão e recidiva local e/ou associada à metástase

Correspondência/ Correspondence: *Andresa Costa Pereira. Avenida Universitária S/N – Bairro Santa Cecília – Cx Postal 61. Patos/PB CEP: 58708-110. E-mail: andresa@cstr.ufcg.edu.br.

regional linfonodal⁶. Assim, é importante que haja uma melhor definição de fatores clínicos e histopatológicos dos casos de alto risco, tendo a possibilidade de um encaminhamento diferenciado para cada tipo de paciente. 2. Nesse sentido, há a necessidade inicialmente de estudos que visem o entendimento do processo de carcinogênese e sequencialmente estudos que possibilitem realizar medidas preventivas e tratamentos mais efetivos e direcionados para cada caso.

O modelo de carcinogênese em pele de camundongos já é consolidado na literatura e amplamente indicado para o estudo sequencial da evolução do processo do câncer, sendo considerado um sistema ideal para avaliação quantitativa e qualitativa das alterações teciduais que ocorrem^{7,8,9,10}.

A grande vantagem dessa metodologia, comparada aos estudos em humanos, é que nesse modelo muitas variáveis são controladas, principalmente devido à utilização do mesmo carcinógeno, tempo e tipo de exposição, além da facilidade de manipulação, de aplicação do carcinógeno e de avaliação dos resultados⁸. Sendo possível, desta forma, verificar alterações teciduais precoces, marcadores diagnósticos e potencial de reversibilidade das lesões, progressão e metástases, proporcionando não apenas o estudo da biologia neoplásica, como também o desenvolvimento e a avaliação de estratégias de prevenção do câncer^{10,11,12}. Tendo em vista a escassez de pesquisas nesse modelo, que relacionem as características clínicas com as características histopatológicas da invasão, o objetivo do presente estudo foi avaliar uma possível relação entre a presença de linfonodos infartados e as características de diferenciação celular, padrão e estágio de invasão de lesões de carcinoma espinocelular quimicamente induzido na pele de camundongos *hairless*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Carcinogênese Experimental

Para a indução da carcinogênese química, quarenta camundongos *hairless* (HRS/J – Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) foram submetidos ao processo de carcinogênese química induzida pelo tratamento tópico com a solução de DMBA (Sigma Chemical, St. Louis, MI, USA), a 0,5% diluído em acetona, previamente preparada em capela e estocada a 4°C.

A aplicação da solução de DMBA foi realizada semanalmente na região dorsal dos animais até a 16ª semana, sendo que na 17ª semana, todos os animais foram fotografados e as lesões selecionadas biopsiadas, sendo posteriormente realizada a eutanásia.

Procedimentos Clínicos

Os animais foram anestesiados, via intramuscular, com uma solução de cloridrato de 2-(2,6-xilidino)-5,6-dihidro-4H-1,3-tiazina (Rompun®) e ketamina (Dopalen®), na proporção de 1:0,5, na dose de 0,1ml/100g de peso, seguidos da identificação e fotografia de cada animal. Para padronização das imagens, os animais foram

posicionados em decúbito ventral sobre uma bancada fixa, distante 30cm da máquina fotográfica digital 5.1 (DSC-W5, Cyber Shot, Sony Corp, Japão).

Posteriormente, foi realizada a biópsia excisional da lesão selecionada, sendo o material submerso em solução de formaldeído tamponado a 10% e encaminhado para processamento histológico.

Análise Clínica

Os dados clínicos foram verificados pela análise das imagens fotográficas padronizadas obtidas no momento da biópsia. As imagens foram avaliadas por dois examinadores calibrados, que realizaram a graduação dos animais segundo a ausência ou presença de linfonodos infartados nas cadeias ganglionares de todo o animal. Na Figura 1, pode-se verificar o critério de classificação em grupo 1 (ausência de linfonodo infartado) e grupo 2 (presença de linfonodo infartado). Como critério, foram excluídos os casos em que houvesse divergência entre os observadores.



Figura 1 – Imagens clínicas dos animais com ausência (a) e presença (b) de linfonodos infartados

Análise Histopatológica

Após o processamento histológico, as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) e ácido periódico de Schiff (PAS), foram analisadas por meio da microscopia de luz, por três observadores devidamente calibrados, classificando as lesões segundo o estágio e o padrão de invasão que foi baseada no modelo proposto por Anneroth et al., (1987)¹³, sendo os critérios adaptados para a pele e subdivididos em dois graus.

O estágio de invasão superficial (grau 1) agrupou as caracterizadas pela invasão da derme, enquanto no grau 2, a invasão foi profunda, atingindo hipoderme e/ou camada muscular.

Na avaliação do padrão de invasão, foi considerado grau 1, quando a infiltração foi delimitada (com bordas bem definidas ou em cordão e/ou faixa) e o grau 2 caracterizou-se pela infiltração em grupos de células (com $n > 15$, $n < 15$ e/ou células isoladas).

Em relação ao grau de diferenciação celular, as lesões foram avaliadas em bem diferenciadas (grau 1), moderadamente diferenciadas (grau 2) e pouco diferenciadas (grau 3).

Análise Estatística

Inicialmente, os dados foram analisados de maneira descritiva e em seguida submetidos à análise estatística inferencial, sendo que para todos os testes estatísticos, o nível de significância adotado foi de 5%.

Para avaliar a associação das características clínicas (presença ou ausência de linfonodos infartados) com as histopatológicas (estágio de invasão, padrão de invasão e grau de diferenciação celular) das lesões neoplásicas, utilizou-se o teste do qui-quadrado, considerando a correção de Yates quando necessária, com o auxílio do módulo Non Parametric Statistics do programa computacional STATISTICA for Windows (STATSOFT, INC., Statistica for windows: Computer program manual. Tulsa, OK: Statsoft, Inc., 2300 East 14th Street, Tulsa. 1999).

RESULTADOS

Dos 40 animais avaliados, em 24 casos observou-se ausência de linfonodos infartados, e em 16 notou-se a presença dessa característica. Com relação ao estágio de invasão, a invasão mais profunda (em hipoderme e

camada muscular – grau 2) só foi observada nos animais com linfonodos infartados e todos os animais com linfonodos normais (100%), apresentaram tumores invadindo superficialmente a camada dérmica ($p = 0,005$).

As características clínicas dos linfonodos e histopatológicas de padrão de invasão demonstram que tanto casos de grau 1 (com padrão delimitado) quanto grau 2 (grupos de células e/ou células isoladas) foram observados em animais com linfonodos infartados e não infartados, não havendo diferença estatística significativa ($p = 0,830$) entre as invasões mais delimitadas ou com grupos de células e células isoladas em relação ao volume linfonodal.

Em relação ao grau de diferenciação celular, houve predomínio de casos grau 2 (moderadamente diferenciado) relacionados à presença de linfonodos infartados, a associação entre estas características não foi significativa ($p = 0,063$), apesar de 91% dos animais com linfonodos normais apresentarem lesões bem diferenciadas. Ademais, não foi observada nenhuma lesão pouco diferenciada (grau 3).

Na Tabela 1 pode-se observar a distribuição dos animais de acordo com as características clínicas dos linfonodos e histopatológicas de estágio, padrão de invasão e diferenciação celular, onde foi aplicado o teste do qui-quadrado corrigido, objetivando avaliar a associação entre estas características.

Tabela 1 – Distribuição dos aspectos clínicos e histopatológicos das lesões (Resultado do teste qui-quadrado corrigido (p valor))

		Linfonodos infartados		p
		Ausência	Presença	
		n (%)	n (%)	
Estágio de invasão	Invasão superficial	24 (100%)	10 (62,5%)	0,005*
	Invasão profunda	0 (0)	6 (37,5%)	
	Infiltração delimitada	8 (33,33%)	5 (31,25%)	0,830
Padrão de invasão	Infiltração em grupos de células	16 (66,67%)	11 (68,75%)	
	Alta	22 (91%)	10 (62,5%)	
Diferenciação celular	Moderada	2 (9%)	6 (37,5)	
	Baixa	0 (0)	0 (0)	

Na Figura 2 observa-se a fotomicrografia da lesão de um animal que clinicamente apresentou linfonodos infartados. Histopatologicamente a lesão foi classificada como grau 2 em todas as características avaliadas: mode-

radamente diferenciada, com invasão em pequenos grupos de células neoplásicas e células isoladas envolvendo camada muscular.

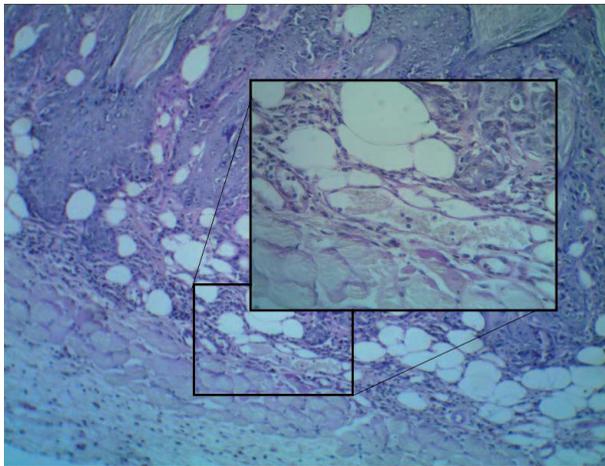


Figura 2 – Fotomicrografia de carcinoma espinocelular da pele de um animal com linfonodos infartados, apresentando invasão profunda.

OBS: no destaque células moderadamente diferenciadas, invadem a hipoderme, com grupos de células próximos a camada muscular.

DISCUSSÃO

Ao se estudar a gradação histológica do CEC, obteve-se uma importante ferramenta para avaliar o comportamento biológico dessa neoplasia em modelos experimentais de carcinogênese química em pele de camundongos. Quando associada a uma criteriosa avaliação clínica, pode-se sugerir a resposta do hospedeiro frente à manifestação linfonodal, possibilitando assim um provável prognóstico através da relação entre os dados clínicos e histopatológicos.

O CEC em pele apresenta caráter invasivo e potencial metastático⁴, caracterizando-se pela invasão local e subsequente potencial de disseminação linfática, para que em seguida gere metástases a distância¹⁴. No presente estudo observou-se que 100% das lesões mais invasivas (em hipoderme e camada muscular-grau 2) apresentaram comprometimento linfonodal, sugerindo a possibilidade de uma posterior evolução para tumores metastáticos, corroborando com o estudo de Vazquez et al. (2008)⁶, que demonstraram que mais de 38% dos pacientes acometidos por CEC em pele com lesões invasivas apresentam metástase ganglionar, sugerindo a elevada incidência de metástases locais como sinalizador de aumento de risco para uma posterior disseminação linfática.

As observações realizadas no presente estudo também podem ser relacionadas com as de Schumltz et al. (2013)¹⁵, Braat et al. (2013)¹⁶, Zhou et al. (2013)¹⁷, Wermker et al. (2015)¹⁸, que consideram a presença clínica de linfonodos aumentados como fator importante na determinação de prognóstico em carcinomas de pele, gástrico, cólon e de lábio, podendo sugerir uma possível disseminação tumoral.

Destaca-se ainda que os pacientes com câncer gástrico e de cólon que apresentam linfonodos clinicamente normais possuem melhor prognóstico, não havendo a

necessidade de tratamento adjuvante^{16,17}. Por outro lado, em casos de câncer de mama não existe associação entre a presença de linfonodos axilares clinicamente positivos e o desenvolvimento de tumores metastáticos¹⁹. Já Krediet et al. (2015)²⁰, observaram que alguns pacientes com CEC em pele chegaram a desenvolver tumores metastáticos, apesar de apresentarem linfonodos negativos, sugerindo que nem sempre esse fator pode ser associado com um bom prognóstico em CEC cutâneo. Essa discussão é ampla, devido às características particulares do comportamento biológico de cada tipo de câncer e a metodologia empregada por cada autor.

O presente estudo, detalhando as características de invasão histopatológica em relação aos linfonodos em modelo de carcinogênese experimental é o primeiro da literatura. Observou-se que quando os linfonodos apresentavam-se normais, havia apenas invasão superficial (derme), entretanto, a característica clínica não teve relação com o padrão de invasão das células neoplásicas, uma vez que células isoladas ou grupos de células foram observados em animais com linfonodos infartados e não infartados. Diferentemente, Agar et al. (2015)²¹, concluíram que padrões de invasão que se caracterizam pela presença de pequenas ilhas de células neoplásicas (semelhante ao grau 2 de padrão de invasão do presente estudo) podem ser um fator determinante na relação com metástases linfonodais em pacientes com carcinoma espinocelular de pele.

Com relação à diferenciação celular, relatos não são unânimes na literatura. Alguns autores relacionam a maior tendência à metastização em carcinoma de pele com a existência de tumores menos diferenciados^{15,22,23}, outros apresentam resultados contrários^{24,25}. No presente estudo, a associação entre as características clínicas dos linfonodos e o grau de diferenciação celular de carcinomas de pele em camundongos não foi estatisticamente significativa.

CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia utilizada foi possível observar que há uma relação da presença clínica de linfonodos infartados com a invasão profunda de lesões de carcinoma espinocelular quimicamente induzido na pele de camundongos *hairless*. Dessa forma, o estudo de fatores clínicos e histológicos relacionados com a evolução do CEC em pele, gera informações importantes que permitem delinear um melhor método de estudo, a partir da utilização de grupos de alto risco para essa enfermidade. Assim, entende-se que este delineamento possa servir como ponto inicial para pesquisas mais profundas e detalhadas, que visem a determinação de outros fatores que possam auxiliar no planejamento, tratamento e prognóstico de cada paciente, contribuindo para a medicina do futuro: menos invasiva e mais preventiva.

REFERÊNCIAS

1. BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2014**: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2015. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em: 06 abr. 2015.
2. MARTORELL-CALATAYUD, A. et al. Cutaneous Squamous Cell Carcinoma: Defining the High-Risk Variant. **Actas Dermo-sifiliográficas**. Barcelona, v. 104, n.5, p. 367-379, 2013.
3. PERERA, E. et al. 2015. Incidence and prevalence of non-melanoma skin cancer in Australia: A systematic review. **Australas. j. dermatol.**, Sydney, 2015.
4. NGUYEN, T. H.; HO, D. Q. Nonmelanoma skin cancer. **Curr. treat. options oncol.**, New York, v. 3, n. 3, p.193-203, 2002.
5. PERRINAUD, A. Carcinomes épidermoïdes (ou spinocellulaires). **Lá Presse Medicale**. Paris, v. 37, n. 10, p.1485-1489, 2008.
6. VAZQUEZ, V. L. et al. Prognostic factors for lymph node metastasis from advanced squamous cell carcinoma of the skin of the trunk and extremities. **World j. surg. oncol.**, London, v. 6, n. 73, p. 1-6, 2008.
7. MASA, A. P. P. et al. Vascularização e grau de atipia epitelial em lesões pré-neoplásicas quimicamente induzidas. **Rev. pesqui. saúde.**, São Luís, v. 14, n. 1, p. 27-30, 2013.
8. PEREIRA, A. C. **Avaliação da associação entre a presença de polimorfismo do gene da metaloproteinase-9 e o desenvolvimento do carcinoma espinocelular quimicamente induzido pelo DMBA na pele de camundongos hairless**. 2007. 85f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual de São Paulo, São José dos Campos, 2007.
9. ZOUMPOURLIS, V. et al. Alterations in signal transduction pathways implicated in tumour progression during multistage mouse skin carcinogenesis. **Carcinogenesis**, New York, v. 24, p. 7, p. 1159-1165, 2003.
10. HUANG, P. Y.; BALMAIN, A. Modeling cutaneous squamous carcinoma development in the mouse. **Cold Spring Harb Perspect Med.**, Woodbury, v. 4, n.9, 2014.
11. DEVOR, D. E. et al. Pathology procedures in laboratory animal carcinogenesis studies. In: WAALKES, M. P.; WARD, J. M. **Carcinogenesis**, New York Press, 1994. cap.13, p. 429-466.
12. MACEJOVA, D.; BRTKO, J. Chemically induced carcinogenesis: a comparison of 1-methyl-1-nitrosourea, 7,12-dimethylbenzanthracene, diethylnitroso-amine and azoxymethan models (minireview). **Endocr. regul.**, Bratislava, v. 35, n. 1, p. 53-59, 2001.
13. ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand. j. dent. res.**, Copenhagen, v. 95, n. 3, p. 229-249, 1987.
14. SCANAVINI JÚNIOR, R. C. **Estudo dos fatores prognósticos do carcinoma espinocelular de pele de cabeça e pescoço**. 2005. 90f. Dissertação (Mestrado) -Faculdade de Ciências Médicas, Universidade de Campinas, Campinas, 2005.
15. SCHUMULTS, C. D. et al. Factors predictive of recurrence and death from cutaneous squamous cell carcinoma: a 10-year, single-institution cohort study. **JAMA dermatology**, Chicago, v. 149, n. 5, p.541-547, 2013.
16. BRAAT, A. E. et al. Excellent prognosis of node negative patients after sentinel node procedure in colon carcinoma: A 5-year follow-up study. **Eur. j. surg. oncol.**, London, v. 7983, n. 13, p.851-852, 2013.
17. ZHOU, Z. G. et al. An evidential reasoning based model for diagnosis of lymph node metastasis in gastric cancer. **BMC med. inform. decis. mak.**, London, v. 13, n. 1, p. 2-7, 2013.
18. WERMKER, K. et al. Prediction model for lymph node metastasis and recommendations for elective neck dissection in lip cancer. **J. Craniomaxillofac. Surg.**, Stuttgart, p. 1-8, 2015.
19. WYSOCKI, W. M. et al. Total number of lymph nodes and number of metastatic lymph nodes harvested during radical mastectomy did not influence early postoperative drainage volume. **Ginekol. pol.**, Warszawa, v. 84, n. 8, p. 696-699, 2013.
20. KREDIET, J. T. et al. Sentinel lymph node biopsy and risk factors for predicting metastasis in cutaneous squamous cell carcinoma. **Bri. j. dermatol.**, Oxford, v. 172, n. 4, p. 1029-1036, 2015.
21. AGAR, N.J. et al. Predicting lymph node metastases in cutaneous squamous cell carcinoma: use of a morphological scoring system. **N. Z Med. J.**, v.128, n.1411, p. 59-67, 2015.
22. CHERPELIS, B. S.; MARCUSEM, C.; LANG, P. G. Prognostic factors for metastasis in squamous cell carcinoma of the skin. **Dermatol. surg.**, New York, v. 28, n. 3, p. 268-273, 2002.
23. MULLEN, J. T. et al. Invasive squamous cell carcinoma of the skin: defining a high-risk group. **Ann. surg. oncol.**, New York, v. 13, n. 7 p. 902-909, 2006.
24. BRANTSCH, K. D. et al. Analysis of risk factors determining Prognostic of cutaneous squamous-cell carcinoma: a prospective study. **The lancet. oncol.**, London, v. 9, n. 8, p.713-720, 2008.
25. KRAUS, D. H.; CAREW, J. F.; HARRISON, L. B. Regional lymph node metastasis from cutaneous squamous cell carcinoma. **Arch. otolaryngol. head neck surg.**, v.124, n. 5, p. 582-587, 1998.

Submetido em: 03.12.2014

Aceito em: 06.04.2015