



FERNANDO CANOLA ALLIEGRO

**Análise histopatológica convencional *versus* cortes seriados em
esvaziamentos cervicais de pacientes com Carcinoma Espinocelular (CEC)
de cavidade oral e orofaringe cN0: mudança de *status* cervical e correlação
com sobrevida**

*Increasing neck staging with step-serial sectioning of neck dissection specimens for oral and
oropharyngeal SCC patients*

Campinas, 2015



Universidade Estadual de Campinas

Faculdade de Ciências Médicas

Fernando Canola Alliegro

Análise histopatológica convencional *versus* cortes seriados em esvaziamentos cervicais de pacientes com Carcinoma Espinocelular (CEC) de cavidade oral e orofaringe cN0: mudança de *status* cervical e correlação com sobrevida

Increasing neck staging with step-serial sectioning of neck dissection specimens for oral and oropharyngeal SCC patients

Tese de Mestrado apresentada a Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção de título de Mestre em Ciências Médicas, Área de Concentração Otorrinolaringologia.

Master's Thesis presented to the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas as part of the requisites required to obtain the title of Master of Medical Sciences, Concentration Area Otolaryngology

ORIENTADOR: Prof Dr Carlos Takahiro Chone

CO-ORIENTADOR: Prof Dr Agrício Nubiato Crespo

Esse exemplar corresponde a versão final da Tese defendida pelo aluno Fernando Canola Alliegro, e orientado pelo Prof Dr Carlos Takahiro Chone

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Fernando Canola Alliegro".

Campinas, 2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Ana Paula de Moraes e Oliveira - CRB 8/8985

AI55a Alliegro, Fernando Canola, 1981-
Análise histopatológica convencional *versus* cortes seriados em esvaziamentos cervicais de pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) de cavidade oral e orofaringe cN0 : mudança de *status* cervical e correlação com sobrevida / Fernando Canola Alliegro. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Carlos Takahiro Chone.
Coorientador: Agricio Nubiato Crespo.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Neoplasias bucais. 3. Neoplasias orofaríngeas. 4. Neoplasias primárias desconhecidas. 5. Neoplasias de cabeça e pescoço. 6. Boca. I. Chone, Carlos Takahiro, 1968-. II. Crespo, Agricio Nubiato, 1958-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Increasing neck staging with step-serial sectioning of neck dissection specimens for oral end oropharyngeal SCC patients

Palavras-chave em inglês:

Carcinoma, Squamous cell

Mouth neoplasms

Oropharyngeal neoplasms

Neoplasms, Unknown primary

Head and neck neoplasms

Mouth

Área de concentração: Otorrinolaringologia

Titulação: Mestre em Ciências Médicas

Banca examinadora:

Carlos Takahiro Chone [Orientador]

Jorge Rizzato Pachal

João Armando Padovani Junior

Data de defesa: 21-01-2015

Programa de Pós-Graduação: Ciências Médicas

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

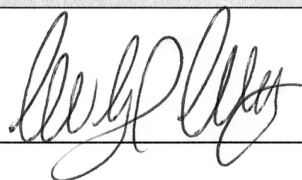
FERNANDO CANOLA ALLIEGRO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). CARLOS TAKAHIRO CHONE

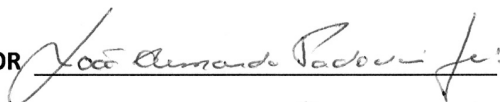
Coorientador (a) PROF(A). DR(A). AGRICIO NUBIATO CRESPO

MEMBROS:

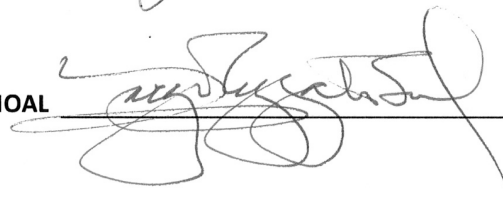
1. PROF(A). DR(A). CARLOS TAKAHIRO CHONE



2. PROF(A). DR(A). JOÃO ARMANDO PADOVANI JUNIOR



3. PROF(A). DR(A). JORGE RIZZATO PASCHOAL



Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 21 de janeiro de 2015.

1. Resumo

Objetivo. Avaliar a mudança no estadiamento cervical de pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) de cavidade oral e orofaringe, após alteração na padronização da análise anátomo-patológica dos linfonodos de espécimes cirúrgicos de esvaziamentos cervicais, clinicamente livres de metástases (cN0), com cortes seriados de todos os linfonodos.

Materiais e Métodos. Estudo retrospectivo com 21 pacientes previamente classificados como cN0 submetidos a cirurgia para exérese do tumor primário e esvaziamento cervical eletivo. Realizou-se inicialmente a revisão das laminais originais e, posteriormente, cortes seriados com 5 µm de espessura e nova análise das lâminas. Para avaliar o impacto da mudança na sobrevida foi realizada análise de Kaplan-Meier (IC 95%). *Resultados.* Após a avaliação convencional, 14 pacientes foram classificados como pN0, isto é, patologicamente livres de metástases cervicais, e sete (33%) como pN+, ou seja, patologicamente acometidos. A análise com cortes seriados detectou outros três pacientes com acometimento linfonodal, previamente classificados como pN0 e 1 previamente estadiado como N1 mudou para N2b com 10 pacientes pN+ (48%). Houve aumento de 43% (3/7) no número de pacientes com acometimento linfonodal e 19% de aumento no estadiamento linfonodal após a nova padronização anátomo-patológica, porém sem impacto na sobrevida ($p=0,554$). *Conclusão.* Análise com cortes seriados de linfonodos de esvaziamento cervicais permitiu um aumento de 14% no número de pescoços com metástases ocultas e de 19% no estadiamento cervical inicial frente à técnica convencional.

Palavras Chave: Carcinoma de células escamosas, neoplasias bucais, neoplasias orofaríngeas, neoplasias primárias desconhecidas, neoplasias de cabeça e pescoço, boca.

2. Abstract

Objective. Asses the change in neck staging in patients with squamous cell carcinoma (SCC) of oral cavity and oropharynx after new methodology for histopathological analysis of lymph nodes of surgical specimens from neck dissections, with step serial sections of all harvested lymph nodes, in clinically neck negative patients (cN0). It was also studied the impact of this changes on survival. *Materials and methods.* Retrospective study with 21 patients previously classified as cN0 undergoing surgery for excision of the primary tumor and elective neck dissection. Initially was held to revise the original pathology slides and, subsequently, step-serial sectioning with 5 µm thick and re-examination of the slides. In order to assess the impact of change in disease-free survival was held Kaplan-Meier analysis (IC 95%). *Results.* After conventional evaluation, 14 patients were found to be without lymphatic metastases (pN0) and seven (33%) were affected (pN+). The analysis with step serial section has detected three other patients with lymphatic metastases, previously classified as pN0, and one patient previously as N1 increased to N2b with 10 pN(+) cases (48%). There was an increase of 43% in patients with lymph node metastases and 19% of increase in neck staging after the new histopathological standardization, but without impact on survival ($p = 0.554$). *Conclusion.* Analysis of lymph nodes in surgical specimens of neck dissections with step-serial sectioning allowed an increase of 43% of necks with occult metastases and increase of neck staging in 19% when compared to conventional technique.

Keywords: Carcinoma, Squamous cell, mouth neoplasms, oropharyngeal neoplasms, neoplasms, unknown primary, head and neck neoplasms, mouth.

3. Sumário

1. Resumo	vii
2. Abstract	ix
3. Sumário	xi
4. Introdução Geral	01
5. Objetivos	06
6. Materiais e Métodos	07
7. Capítulo	09
8. Aspectos Éticos	26
9. Discussão Geral	27
10. Conclusão Geral	31
11. Referências Bibliográficas	32
12. Anexo 1	36
13. Anexo 2	39
14. Apêndices	41

Dedicatória

Dedico essa tese a

Sr Pedro Augusto e Sra Rosa Carolina, meus pais, pelos anos de paciência e incentivo a minha busca por conhecimento, por fornecerem as bases morais e acadêmicas que permitiram que me tornasse a pessoa e o médico que sou hoje, e por sempre me darem estímulos a seguir adiante, por mais árdua que seja a travessia.

Luciana, companheira fiel, presente e, acima de tudo, amiga. Que a vida nos reserve anos de convivência e felicidade.

Prof. Dr. Carlos T. Chone, docente, orientador e colega, por quem nutro profundos respeito e admiração.

Dr. Leandro Freitas, personagem fundamental na elaboração desse trabalho, com quem aprofundei significativamente meus conhecimentos em fisiopatologia tumoral e anatomia patológica

Agradecimentos

Ao Departamento de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Unicamp, nas figuras da Profa. Dra Albina Altemani, profissional dedicada e sempre presente, que participou assiduamente de minha formação em oncologia de Cabeça e Pescoço, e do Dr. Leandro Freitas, sem o qual esse trabalho não seria possível.

Aos Profs. Drs. Carlos T. Chone e Agricio N. Crespo, principais incentivadores de minha formação otorrinolaringológica inicialmente, e oncológica posteriormente, professores presentes, didáticos e, acima de tudo, preocupados com a formação acadêmica de seus alunos.

A todos os profissionais da Comissão de Pós Graduação, em especial a Sra Marcia, pela atenção, paciência e prestatividade.

Aos residentes da Disciplina de Otorrinolaringologia, Cabeça e Pescoço, em especial Dr. Guilherme V. Coelho, que me auxiliou na elaboração desse trabalho quando ainda se encontrava na graduação em Medicina.

Aos colegas Drs. Pablo S. Pereira e Eder B. Muranaka, exemplos de disciplina e ética no trabalho e que participaram ativamente da busca pelos dados desse trabalho.

Finalmente, aos pacientes da Disciplina de Otorrinolaringologia, Cabeça e Pescoço, personagens principais e objetivo desse estudo. Que o sofrimento que acompanha sua doença sirva de motivador para que outros pesquisadores continuem a buscar incessantemente alternativas e soluções terapêuticas.

*“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe.
A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”*

Hipócrates

Lista de Tabelas e Figuras

Tabela 1 – Localização dos sítios primários	27
Tabela 2 – Estadiamento locoregional após revisão e avaliação com cortes seriados	28
Figura 1 – Curva de sobrevida <i>versus</i> com mudança no estadiamento cervical	30
Figura 1.1 – Curva de sobrevida <i>versus</i> presença de infiltração perineural	47
Figura 1.2 – Curva de sobrevida <i>versus</i> presença de êmbolos vasculares	47
Figura 1.3 – Curva de sobrevida <i>versus</i> presença de êmbolos linfáticos	48
Figura 1.4 – Curva de sobrevida <i>versus</i> estadiamento tumoral “T”	48
Figura 1.5 – Curva de sobrevida <i>versus</i> localização do tumor primário	49

Lista de Abreviações

EUA – Estados Unidos da América

cN0 – Clinicamente livre de metástases cervicais

cN+ – Clinicamente acometido por metástases cervicais

ECR – Esvaziamento Cervical Radical

HE – Hematoxilina e eosina

ITC – células tumorais isoladas (na sigla em inglês – isolated tumor cells)

pN0 – patologicamente livre de metástases cervicais

AJCC – American Joint Committee on Cancer

pN1 – Patologicamente acometido por uma metástase, ipsilateral ao tumor, com não mais de três centímetros no maior diâmetro

CEC – Carcinoma espino celular

FCM – Faculdade de Ciências Médicas

4. Introdução Geral

As neoplasias malignas de Cabeça e Pescoço atualmente são consideradas uma das mais prevalentes em todo o mundo, com 42000 novos indivíduos todos os anos nos EUA e resultando em 6000 a 7000 mortes anuais ¹.

No Brasil, ocupam posição de destaque dentre as neoplasias mais comuns, especialmente as neoplasias de cavidade oral e orofaringe, responsáveis por mais de 15000 novos casos por ano ², situando-se dentre as mais comuns risco.

A exérese cirúrgica da lesão com margem de segurança ainda é, para a grande maioria dos tumores malignos da cabeça e pescoço, o tratamento de escolha, e a abordagem cervical para remoção dos possíveis linfonodos acometidos por metástases é mandatória, naqueles com alto risco. Essa abordagem reduz a recorrência locorregional e aumenta a sobrevida global e livre de doença ³⁻⁵.

O esvaziamento cervical utilizado no tratamento do paciente com câncer de cabeça e pescoço dependerá do local do tumor primário e da classificação (*status*) cervical inicial: se clinicamente negativos (cN0) ou clinicamente comprometidos por metástase (cN+) ⁶.

Assim, os espécimes cirúrgicos resultantes destes esvaziamentos cervicais contém desde grupos linfonodais selecionados com maior risco de acometimento metastático (esvaziamento cervical seletivo) até produto de ressecção dos níveis cervicais (I a V) conjuntamente com as estruturas adjacentes, como músculo esternocleidomastóideo, veia jugular e nervo acessório - esvaziamento cervical radical (ECR) ⁶⁻⁹.

Não restam dúvidas de que essa abordagem terapêutica que, apesar de necessária ^{3,4,10,11}, é agressiva por natureza, traz consigo uma gama variável de sequelas e complicações, como por exemplo fistulas pós operatórias e injúrias a estruturas vasculares e nervosas adjacentes ^{12,13}.

Há dúvidas se os esvaziamentos cervicais eletivos aumentam a sobrevida do paciente livre de doença, apesar de obrigatório quando o risco de metástases linfáticas ocultas é alto; além disso, como exposto acima, aumentam também o risco de sequelas pós operatórias. Esforços para reduzir tais efeitos adversos e estratificar melhor o risco-benefício do esvaziamento cervical levaram ao desenvolvimento da técnica de pesquisa do linfonodo sentinela, já bem estabelecida em outros tipos de câncer, como mama e melanoma ^{14,15}, na qual apenas esses linfonodos são ressecados e analisados histologicamente com cortes seriados que podem variar de 4µm a 6µm ¹⁶

Essa técnica, que consiste em identificar um ou alguns linfonodos através do uso de marcadores injetados na periferia do tumor (azul de toluidina ou radiofármacos) e excisá-los, com diminuição do porte cirúrgico e, conseqüentemente, as sequelas e comorbidades associadas a um procedimento cirúrgico mais extenso ¹⁷, provou ainda ser um método eficaz na detecção de metástases ocultas ¹⁸.

A presença de metastases linfáticas ao diagnóstico é o fator isolado que mais diminui a sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço ^{19,20}. Ademais, características anátomo-patológicas encontradas na análise dessas metástases, como por exemplo presença de êmbolos tumorais nos capilares linfáticos ²¹, extravasamento extra capsular linfonodal ²² ou mesmo o número de linfonodos acometidos ²³, ajudam a definir a necessidade ou não de tratamentos adjuvantes, como radioterapia exclusiva ou quimiorradioterapia ²⁴⁻²⁷.

Assim uma avaliação precisa destes linfonodos do espécime cirúrgico resultante do esvaziamento cervical é de fundamental importância para estabelecimento do prognóstico e do tratamento adjuvante mais adequado para o paciente.

O exame anatomopatológico destes espécimes cirúrgicos é habitualmente feito em material previamente fixado em formalina e orientado a partir de demarcações prévias feitas pelo cirurgião, ou, se possível, a partir de estruturas anatômicas que sirvam como ponto de referência ao patologista, como o próprio músculo esternocleidomastóideo ou mesmo a glândula submandibular²⁸.

Os linfonodos são, então, dissecados da gordura envolvente, de forma manual e artesanal, e medidos pelo patologista. Produtos de ECR podem resultar em até cerca de 50 linfonodos por espécime cirúrgico^{9,28}, o que torna o trabalho do patologista laborioso e com altos custos para o laboratório de anatomia patológica. Não existe uma padronização mundial de corte dos linfonodos para obtenção de lâminas daqueles maiores que 0,4 cm e macroscopicamente livres de acometimento. Recomenda-se nos linfonodos menores que 0,4 cm que estes sejam totalmente incluídos e que, dos linfonodos macroscopicamente comprometidos, apenas uma secção seja amostrada. Já para os demais, as orientações variam de “amostragem tecidual” à inclusão na sua totalidade²⁸.

Habitualmente, de cada bloco de parafina é retirado um corte histológico com 5µm de espessura, o qual é corado com hematoxilina-eosina (HE), coloração de rotina em anatomia patológica.

A análise microscópica destes linfonodos cervicais traz importantes fatores prognósticos, além da caracterização da metástase linfonodal, do número de linfonodos acometidos e de sua localização. São também considerados fatores prognósticos: tamanho da metástase, presença ou não de extensão neoplásica além dos limites da cápsula do linfonodo (extensão extracapsular) e presença de implantes neoplásicos na gordura cervical sem que se caracterize aquele nódulo como tecido linfonodal^{28,29}.

À semelhança de outros tumores e sítios anatómicos, as metástases podem ser classificadas de acordo com o seu tamanho: metástase (focos neoplásicos com mais de 2 mm), micrometástase (focos neoplásicos medindo entre 0,2 mm e 2 mm) e células tumorais isoladas (ITC – para implantes de células tumorais menores que 0,2 mm)³⁰.

Estima-se que até 10% dos pacientes sem metástases linfáticas ao exame anátomo-patológico (pN0) possam apresentar recorrência regional, cuja explicação poderia ser, por exemplo, pela presença de micrometástases não detectadas ao exame convencional do espécime cirúrgico⁹.

Ferris et al (2005) aumentaram em 15% a detecção de micrometástases a partir da realização de cortes seriados e estudo imunoistoquímico³¹, porém esse índice pode chegar a níveis tão elevados quanto 30%³².

Se por um lado a relevância prognóstica da presença de micrometástases nos diversos sítios tumorais ainda é tema de discussão entre os especialistas, por outro, sua detecção em tumores da região da Cabeça e Pescoço tem demonstrado tal relevância, notoriamente nas neoplasias de esôfago, cavidade oral e orofaringe.

Snow et al documentou o aumento na detecção de micrometástases em neoplasias de cabeça e pescoço, com uso de reação por cadeia polimerase como marcador celular em CEC de cabeça e pescoço, quando comparado à técnica histopatológica convencional de espécimes cirúrgicos de esvaziamentos cervicais. Correlacionou sua presença a uma piora na sobrevida livre de doença³³.

Koenig et al (2009), em estudo com 73 pacientes com neoplasia esofágica ressecável, detectou imunohistoquimicamente a presença de micrometástase em 25 (34,2%) dos pacientes previamente classificados como pN0, correlacionando-se com pior sobrevida em

cinco anos ($p=0,021$) para o tipo histológico adenocarcinoma; observou ainda, tendência semelhante para carcinoma espino celular ³⁴.

Em estudo recentemente conduzido por Broglie et al (2010), na técnica de biópsia de linfonodo sentinela, confirmou a alta incidência de ITC e micrometástases em pacientes com neoplasias iniciais de cavidade oral e orofaringe, e pela primeira vez detectou menor sobrevida global e livre de doença nos pacientes com micrometástases, porém sem significância nos pacientes com ITC ³⁵.

Uma análise histológica mais eficaz dos produtos de esvaziamento cervical pode contribuir para o correto estadiamento e estratificação de risco nos pacientes acometidos por neoplasias malignas de Cabeça e Pescoço e selecionar melhor os pacientes para tratamento adjuvante. A utilização de radioquimioterapia adjuvante na presença de extensão extracapsular ou radioterapia quando múltiplas metástases são detectadas, melhoram a sobrevida do paciente ^{25-27,29}.

5. Objetivos

Objetivo geral: reavaliação histopatológica com cortes seriados de todos os linfonodos dissecados dos espécimes cirúrgicos de esvaziamentos cervicais de pacientes com câncer de cabeça e pescoço cN0 e reestadiar os mesmos pacientes do ponto de vista do “N” da classificação TNM de 2010 da AJCC.

Objetivo específico: correlacionar a alteração de estadiamento decorrente de nova análise histopatológica com a sobrevida do paciente.

6. Materiais e Métodos

Esta pesquisa analisou os dados de todos pacientes referenciados à Disciplina de Otorrinolaringologia, Cabeça e Pescoço da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas no período de 1995 a 2013, que foram submetidos a esvaziamento cervical, com pescoço classificado clinicamente como negativo (cN0).

Critérios de inclusão: todo paciente cN0 submetido a esvaziamento cervical, com estadiamento histopatológico pN0 ou pN1 à análise histopatológica convencional, sem tratamento cirúrgico prévio no pescoço antes do esvaziamento cervical.

Critérios de exclusão: tratamento cirúrgico prévio no pescoço ou não realização de tratamento adjuvante quando indicado.

Após a seleção dos pacientes, foram incluídos no estudo 21 pacientes com carcinoma espinocelular de cavidade oral e orofaringe clinicamente N0. Foi então realizada revisão dos blocos de parafina dos pacientes, armazenados no Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas com posterior realização de cortes de seriados de todos os blocos identificados para cada esvaziamento cervical realizado e nova análise. A análise anátomo-patológica foi realizada pelos mesmos patologistas Dr. Leandro Lopes Freitas e Prof(a) Dr(a). Albina M. Altemani de toda a peça cirúrgica. Os blocos foram cortados em espessuras de 5 µm e corados com hematoxilina e eosina para análise à microscopia óptica pelos patologistas do estudo, com intervalos de 150 µm entre os cortes, até que se identificasse acometimento linfonodal ou até o terceiro nível de desbaste.

A variáveis independentes deste estudo foram:

1. estágio histopatológico do pescoço com análise convencional dos linfonodos dos espécimes cirúrgicos de esvaziamentos cervicais, dividido em quatro categorias: pN0, pN1 e pN2a, extensão extra-capsular;
2. estágio histopatológico do pescoço com análise com cortes seriados dos linfonodos dos espécimes cirúrgicos de esvaziamentos cervicais dividido em cinco categorias: pN0, pN1 e pN2a, pN2b, extensão extra-capsular;

As variáveis dependentes foram

1. Sobrevida livre de doença
2. Sobrevida global.
3. Recidiva regional com duas categorias: positivo e negativo

Foi realizada análise univariada, com teste de Fisher ou Qui-quadrado e multivariada com teste t de student ou regressão logística e análise de sobrevida com Kaplan Meier com software SPSS para Windows XP e análise descritiva relativa à mudança de estadiamento histopatológico com a nova metodologia de estudo de peças de esvaziamento cervical.

7. Capítulo

Increasing neck staging with step-serial sectioning of neck dissection specimens for oral and oropharyngeal SCC patients

Authors: Fernando C. Alliegro¹, MD; Carlos T. Chone¹, MD; Agricio N. Crespo¹, MD; Pablo S. G. Pereira¹, MD; Eder B. Muranaka¹, MD; Guilherme Vianna Coelho¹, MD; Albina Altemani², MD; Leandro Luiz Freitas², MD

1. Department of Otolaryngology, Head and Neck, University of Campinas, Brazil
2. Department of Surgical Pathology, University of Campinas, Brazil

Corresponding Author: Fernando C. Alliegro, MD

Adress for correspondence:

Departamento de Oftalmo e Otorrinolaringologia

Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP

PO Box - 6111 - Campinas, SP, Brasil

ZIP 13083-970

e-mail: fealliegro@yahoo.com.br

Abstract

Objective. Restage patients with squamous cell carcinoma (SCC) of oral cavity and oropharynx after new methodology for histopathological analysis of lymph nodes of surgical specimens of neck dissections with step serial sections of all harvested lymph nodes in clinically negative necks (cN0). It was also studied the impact on disease-free survival of patient after restaging. Materials and methods. Retrospective study with 21 patients previously classified as cN0 undergoing surgery for excision of the primary tumor and elective neck dissection. Initially was held to revise the original slides and, subsequently, cuts with 5 μ m thick serials and re-examination of the slides. To assess the impact of change in disease-free survival was held Kaplan-Meier analysis (IC 95%) Results. After conventional evaluation, 14 patients were without lymphatic metastases (pN0) and seven (33%) were pN+. The analysis with step serial section has detected more three patients with lymphatic metastases, previously classified as pN0, now with 10 patients (48%). Additionally one patient previously staged as pN1 increased to pN2b. There was an increase of 43% of patients with lymph node metastases after the new histopathological standardization and an increase of neck staging of 19% but without impact on disease-free survival ($p = 0.554$). Conclusion. Analysis of lymph nodes in surgical specimens of neck dissections with step serials section allowed an increase of 19% in neck staging and occult metastases outside the conventional technique.

Keywords: Squamous cell carcinoma, head and neck cancer, oral and oropharyngeal cancer, step-serial sectioning, occult metastases.

Introduction

Head and neck cancers are one of the most common cancers worldwide and affect a large number of patients in the US every year. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma accounts for 2.5% of all diagnosed malignant neoplasms, corresponding to over 42000 new cases per year, and almost 8400 deaths were estimated to have occurred in 2014 ¹.

In Brazil, 15000 cases of head and neck cancer are believed to occur every year ² and are known to be correlated with a major decrease in life expectancy and quality of life in affected patients. Severe functional and aesthetic sequelae result occurred due to delayed diagnosis, with most diagnoses occurring at advanced stages.

Surgical excision of the primary tumor remains the first option for treatment of the majority of cases. The neck approach for the removal of possible occult metastatic lymph nodes (LN) is mandatory, especially in patients with an increased risk of metastasis, as it significantly reduces survival rates³⁻⁷. It is the only prognostic factor that is highly correlated with poor outcomes ⁸. Other features are also considered to worsen patient outcome, such as the size of the metastases, the presence of an extracapsular extension. Tumor thickness of more than 2 mm, is also correlated with the presence of occult metastases even in T1 lesions ^{5,9-11}, ^{8,12}.

The extent of neck dissections vary according to the location of the primary tumor, tumor size, pattern of lymphatic drainage and the clinical *status* of the neck, i.e., clinically negative (cN0) or positive(cN+). Thus, surgical specimens obtained from these dissections range from a few dissected neck levels (selective neck dissection) to a complete resection

specimen of neck levels I to V with or without the adjacent structures, such as the sternocleidomastoid muscle, jugular vein and accessory nerve (radical neck dissection)^{13,14}.

Performance of neck dissection is the most reliable staging method for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) and correlates with better disease control and survival rates^{4,15}; however, it is also correlated with postoperative sequelae¹⁶. The most common complications of the neck approach are neural disabilities and fistulae^{16,17}.

Efforts have been made to decrease these sequelae and better predict occult lymphatic metastases in HNSCC patients. As a result, new techniques, such as the sentinel lymph node biopsy (SLNB), which is based on the principle that metastatic tissue is first harbored by one LN and then disseminates to others, have been developed and used. This procedure often uses step-serial sectioning (SSS) of the LN (4 μm – 6 μm) and has shown that metastases are left behind in some cases after conventional histopathological analysis^{18–20}.

The routine histopathological evaluation of neck specimens is usually done with palpation of the surgical specimen by the pathologist and guided by anatomic landmarks (i.e., the sternocleidomastoid muscle or submandibular gland) provided by the surgeon and fixed in formalin. Lymph nodes are dissected from the surrounding tissue and then included, a process that can be done for the entire LN or just parts of it, depending on its size²¹. Then, microscopic analysis with hematoxylin and eosin (HE) is performed, and the presence of lymphatic metastases is established.

Currently, there is no standard method for this analysis. If the LN is smaller than 0.4 cm, it has been recommended to include it in its entirety, and if it is larger than 0.4 cm with no macroscopic involvement, it has been recommended to include only parts of it ²¹.

Microscopic analysis of neck lymph nodes provides data regarding important prognostic factors. Besides the characterization of LN metastases, number of metastatic LN and their locations, other prognostic factors include: the sizes of the metastases, presence or absence of neoplastic extensions beyond the lymph node capsule (extracapsular extension) and presence of neoplastic cervical implants in the surrounding fat tissue of neck.

A well-performed neck dissection results in as many as 50 LN ²² in the surgical specimen, which generates a high demand for the surgical pathology department.

As in other anatomic sites and tumor locations in the human body, metastases in HNSCC are classified according to their size: metastasis (neoplastic tissue larger than 2 mm), microscopic metastasis (0.2 mm to 2 mm) and isolated tumor cells (ITC – implants smaller than 0.2 mm) ⁸. Routine histopathological evaluations often miss tumors of the latter two classifications because of the great number of LN being analyzed and the manual feature inherent to this process.

It is estimated that up to 10% of patients previously classified as pN0 may develop neck recurrence that may be due to occult metastases not seen during routine analysis ²³.

Compared to routine HE analysis, step-serial sectioning has a higher rate of detection of occult metastases ^{20,24}. Although the numbers of patients whose occult metastases were

identified by routine HE analysis varies in the literature, up to 30% of patients have been misdiagnosed using this method. Data shows that a large number of patients have been understaged by routine analysis.

The impact on survival of microscopic metastases in elective neck dissection is a controversial theme that leads to inflated discussions among experts. Although most studies have failed to establish a relationship between these findings, three studies were able to show a decrease in survival rates associated with the presence of microscopic metastases^{25,26,27}.

Another author to report the high prevalence of occult metastases was Snow et al. His study also indicates a correlation between this occult metastases and worsening prognosis²⁷.

A more efficient histopathological analysis of neck dissection specimens may lead to more accurate staging, better risk stratification in patients affected by head and neck malignancies and better selection for adjuvant treatment.

Objectives

The objective of this study was to determine if step-serial sectioning modifies neck *status* when compared to routine evaluation, and if this modification has an impact on survival rate.

Subjects and Methods

This study was approved by the local institutional review board under protocol number 526/2010. Authors have nothing to disclose.

We performed a retrospective study of 21 patients with oral and oropharyngeal SCC, previously classified as cN0 by conventional histopathological evaluation. No participants had undergone previous treatment for their malignancies.

All patients were referred to surgery for a primary tumor and elective neck dissection followed by adjuvant therapy with radiation therapy or chemoradiation if indicated. All dissection samples were analyzed using the routine HE technique first. After determining whether each patient was pN0 or pN1, the corresponding paraffin blocks were reviewed by the Surgical Pathology Department using the original pathology slides, and then the paraffin blocks were submitted to step-serial sectioning of 5 μ m thickness and 150 μ m trim intervals. Three levels were made, as mentioned. The pathology slides resulting from this process were submitted to a second HE analysis by the same pathologist that reviewed the original slides. This is the standardized protocol for sentinel node biopsy for patients with head and neck cancers at our institution and is based on the protocol proposed by most authors^{21,28}.

Statistical analysis was performed with Fisher exact test, Chi square, t-student with logistic regression model and Kaplan Meier for survival analysis. All evaluation was done with SPSS 2010 software for Windows. The level of significance adopted was 0,05.

Results

We analyzed 21 patients with oral and oropharyngeal SCC previously classified as cN0. Seven (33.3%) patients were upstaged to pN1 after routine histopathological analysis and 14 were considered pN0 (Table 1).

Eighteen patients (85.7%) were male and three (14.3%) were female. The participants ranged from 40 to 87 years of age, with mean and median ages of 53.7 years and 51 years, respectively.

The primary location of the tumor was the oral cavity for 15 patients (71.4%) and the oropharynx for six patients (28.6%). The tumor subsites are shown in Table 1 below.

Table 1. Sites of primary tumors according to number of patients and rates

Primary Site	n	%
Tonsils	5	23,8%
Body of Tongue	5	23,8%
Floor of Mouth	5	23,8%
Retromolar	3	14,3%
Soft Palate	1	4,75%
Buccal Mucosa	1	4,75%
Lower alveolar ridge	1	4,75%

Legends: n, number of patients

The TNM classification after routine analysis and revision is shown in Table 2 below.

Table 2. Locoregional staging after routine HE analysis and after SSS

T stage	n	%	HE	Revision	SSS
T1	4	19,05	4 N0	4N0	4 N0
T2	8	38,1	4 N0 4 N1	1N1m / 1N1 / 2N0 4N1	1N1m / 1N1 / 2 N0 4N1
T3	4	19,05	3 N0 1 N1	3 N0 1 N1	1 N1m / 2 N0 1 N2b
T4a	5	23,8	3 N0 1 N1	3 N0 1 N1	3 N0 1 N1

Legends: HE, hematoxilin and eosin; SSS, step serial section

Table 2 shows that two patients were upstaged after reviewing the original pathology slides a second time, even before performance of SSS analysis.

All patients received surgery for a primary tumor and elective neck dissection, and 18 of them (86%) had an indication for adjuvant treatment. Three patients (14%) underwent surgery exclusively.

The surgical margins were negative in 12 patients (57%), positive in six (28%) and narrow in two (10%). One patient (5%) had a surgical margin focally compromised by *in situ* carcinoma.

Vascular emboli was found in seven patients (33%) and lymphatic emboli in eight patients (38%). Perineural infiltration was present in nine of 21 patients (43%).

During the 80 month follow-up period, we observed locoregional recurrence in six patients (29%), and at the end of this period, nine had died (43%) and 12 out of 21 were still alive (57%).

When performing the step-serial sectioning, we identified four patients with other lymphatic metastases that were missed by routine pathological analysis, and three of them were among the 14 patients previously classified as pN0 and one as pN1 becoming pN2b. Two patients had macroscopic metastases and two had micrometastases. Now the total number of patients pN(+) necks were 10(48%). An increase in 19% of patients in neck staging was observed although without statistically significant difference ($p=0,2$). Two patients previously staged as stage II were upstaged to stage III, one remained as stage III and other were upstaged from stage III to IVa with an upstage of 14% of patients. An increase of 43% of positive necks was observed after restaging all necks.

One of the patients had three macroscopic metastases measuring 0.4 cm, 0.5 cm and 0.6 cm, and the other was measuring 0.3 cm. The micrometastases found measured 0.32 mm and 0.1 cm.

The total number of pathology slides processed by step-serial sectioning was 729, with a mean and median per patient of 34.3 and 33, respectively (range 3 – 108), from 490 lymph nodes analyzed.

This analysis changed neck staging in four of 21 patients (19%), and in 17 (81%) there was no change.

Of the four patients for whom neck status was changed after SSS analysis, we observed one (25%) death during the follow-up period. Among the patients for whom neck status was not changed after SSS analysis, eight (47.%) survived and nine (53%) died during follow-up.

The observed modification in neck status after SSS analysis did not significantly impact survival ($p=0.554$). The Kaplan-Meier curve is shown below (Figure 1).

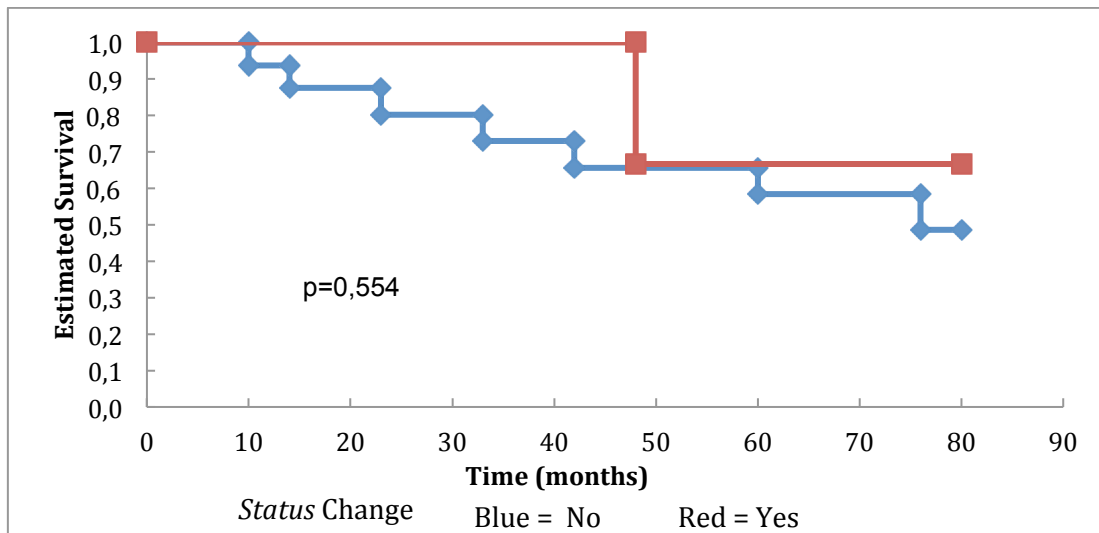


Figure 1: Survival curve for lymph node *status* change

Discussion

Although all patients were classified clinically and radiologically as cN0, seven of 21 (33%) had lymphatic metastases after routine histopathological analysis, which reinforces the previously well-established belief that clinical and radiological assessments are not sufficient for the accurate staging of the neck in oral and oropharyngeal SCC patients^{6,15,29,30}.

In our study, we used the same protocol established for step-serial sectioning that is used for sentinel node biopsy, excepting the immunohistochemistry process. The thickness of the pathology slides processed by SSS analysis was 5 μm , with 150 μm trim intervals^{18,19,26,31}. We found that 19% of patients had a different neck *status* diagnosis after performing step-serial sectioning, which is in agreement with the literature. It is important to discuss the role of routine HE analysis in the determination of neck *status*. As shown above, two patients with neck involvement, one of them with three macroscopic metastases, were not diagnosed by HE analysis. There is a false negative rate inherent to that method that both surgeons and pathologists often underestimate. However, increasing the number of slices in paraffin blocks and the number of pathology slides processed will allow a more accurate assessment of lymph node involvement and will greatly lower the false negative rate inherent to the current routine histopathological analysis used. Also, using semi-automated software could overwhelm the bias of the misrecognition of metastases, which is possible even for experienced pathologists.

In 2005, Ferris et al²⁰ increased the detection of occult metastases in 15% of head and neck cancer patients using step-serial sectioning and immunohistochemistry (IHC), but these results vary in the literature, and can be as high as 30%, as was shown by Bucley and colleagues, or even higher. Yoshida et al²⁴, studied 24 patients with T2N0 tongue cancer

and found by step serial sectioning and immunohistochemistry that 58% of patients had occult metastases.

The role of these occult micrometastases in head and neck cancer is still unclear. Although most studies have failed to show an impact of the presence of occult micrometastases on survival, some authors did show such a correlation. In 2009, Koenig et al studied 73 patients with early esophageal cancer and found a high prevalence of occult micrometastases (34.2% of patients) that was correlated with a decrease in the five-year survival rate for adenocarcinoma patients ($p=0.021$); they also found similar trends for such features of SCC ($p=0.081$)²⁵.

We did not observe an impact on survival of using step serial sectioning of LNs for diagnosis, probably due to the small number of patients. With a greater number of patients, we likely would have observed an impact on survival, as neck status correlates with survival in patients with HNSCC.

Snow and cols, using real-time quantitative RT-PCR with E48 (Ly-6D) transcripts as a squamous cell-specific molecular marker, also found a high prevalence of micrometastases in head and neck cancer patients and correlate its presence with impact on survival, but suggested a larger trial to confirm these findings²⁷.

In 2010, Broglie and cols used the sentinel node technique (HE step-serial sectioning plus IHC) in a study of 111 patients with T1/2 cN0 oropharyngeal SCC; they found that 45% of patients had micrometastases, 31% had macrometastases and 19% had ITC. Also, for the first time, they showed an impact of micrometastases on overall survival rates ($p=0.003$)²⁶. Using step-serial sectioning improves occult metastasis detection, but it can be a laborious, time-consuming and expensive process, if applied to all lymph nodes of a neck dissection. Alternative detection methods include sentinel node biopsy³² and inclusion of entire

cervical levels, as proposed by Jose et al³³. Certainly alternative techniques for improvement of pathological staging of neck is warranted even if there are increasing in costs because in 14% of all patients of this study, there was an upstaging of patients from stage II to III in two and from stage III to IVa in one. The other remained as stage III as classified previously stage III because was T3N0 of oral cavity and after step serial section of neck dissection specimen changed to T3N1. Those upstaged patients required further adjuvant treatment not performed at the current history of their lifetime, as both patients with SCC of oral cavity staged as T2N0 were only followed without further treatment with chemoradiation after surgery, as upstaged as T2N1 (stage III oral cavity) also the other patient staged as T3N1 of oropharynx upstaged to T3N2b. This patient received adjuvant radiation therapy, but would deserve chemoradiation according to EORTC 22931 trial³⁴. Particularly in this patient, a regional recurrence was observed during the follow up and maybe if step serial section methodology was applied chemoradiation was performed otherwise only radiation therapy with possibly avoidance of regional recurrence.

Conclusions

Routine HE analysis is not enough for correctly evaluating neck lymphatic metastases in patients with oral and oropharynx cancer, as it misses lymphatic metastases and understages the patient in 19% of patients. We were not able to correlate the presence of occult metastases or the change in LN status after SSS with an impact on survival.

Bibliography

1. Cancer of the Oral Cavity and Pharynx - SEER Stat Fact Sheets.
2. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2014.
3. Layland MK, Sessions DG, Lenox J. The influence of lymph node metastasis in the treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity, oropharynx, larynx, and hypopharynx: N0 versus N+. *Laryngoscope* 2005;115(4):629-39.
4. Duvvuri U, Simental Jr. a a, D'Angelo G, et al. Elective neck dissection and survival in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Laryngoscope* 2004;114(12):2228-2234.
5. Pimenta Amaral TM, Da Silva Freire AR, Carvalho AL, Pinto CAL, Kowalski LP. Predictive factors of occult metastasis and prognosis of clinical stages I and II squamous cell carcinoma of the tongue and floor of the mouth. *Oral Oncol.* 2004;40(8):780-6.
6. Givi B, Linkov G, Ganly I, et al. Selective neck dissection in node-positive squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol. Head. Neck Surg.* 2012;147(4):707-15.
7. Pugazhendi SK, Thambiah L, Venkatasetty A, Thangaswamy V. Elective neck dissection versus "wait and watch" policy in tongue carcinoma. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2012;4(Suppl 2):S226-9.
8. Jones HB, Sykes A, Bayman N, et al. The impact of lymphovascular invasion on survival in oral carcinoma. *Oral Oncol.* 2009;45(1):10-5.
9. Ganly I, Goldstein D, Carlson DL, et al. Long-term regional control and survival in patients with "low-risk," early stage oral tongue cancer managed by partial glossectomy and neck dissection without postoperative radiation: the importance of tumor thickness. *Cancer* 2013;119(6):1168-76.
10. Asakage T, Yokose T, Mukai K, et al. Tumor thickness predicts cervical metastasis in patients with stage I/II carcinoma of the tongue. *Cancer* 1998;82(8):1443-8.
11. O-charoenrat P, Pillai G, Patel S, et al. Tumour thickness predicts cervical nodal metastases and survival in early oral tongue cancer. *Oral Oncol.* 2003;39(4):386-90.
12. Coatesworth AP, MacLennan K. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: the prevalence of microscopic extracapsular spread and soft tissue deposits in the clinically N0 neck. *Head Neck* 2002;24(3):258-61.

13. Mira E, Benazzo M, Rossi V, Zanoletti E. Efficacy of selective lymph node dissection in clinically negative neck. *Otolaryngol. - Head Neck Surg.* 2002;127(4):279-283. doi:10.1067/mhn.2002.128601.
14. Spiro RH, Strong EW, Shah JP. Classification of neck dissection: variations on a new theme. *Am. J. Surg.* 1994;168(5):415-8.
15. Capote A, Escorial V, Muñoz-Guerra MF, Rodríguez-Campo FJ, Gamallo C, Naval L. Elective neck dissection in early-stage oral squamous cell carcinoma-- does it influence recurrence and survival? *Head Neck* 2007;29(1):3-11.
16. Dedivitis RA, Guimarães AV, Pfuetszenreiter Jr EG, Castro MAF de. [Neck dissection complications]. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 77(1):65-9.
17. Campisi CC, Boccardo F, Piazza C, Campisi C. Evolution of chylous fistula management after neck dissection. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2013;21(2):150-6.
18. Cserni G. Complete sectioning of axillary sentinel nodes in patients with breast cancer. Analysis of two different step sectioning and immunohistochemistry protocols in 246 patients. *J. Clin. Pathol.* 2002;55(12):926-31.
19. Cserni G. A model for determining the optimum histology of sentinel lymph nodes in breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 2004;57(5):467-71.
20. Ferris RL, Xi L, Raja S, et al. Molecular Staging of Cervical Lymph Nodes in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. 2005;(6):2147-2156.
21. Zarbo RJ, Barnes L, Crissman JD, Gnepp DR, Mills SE. Recommendations for the reporting of specimens containing oral cavity and oropharynx neoplasms. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. *Hum. Pathol.* 2000;31(10):1191-3.
22. Amar A, Chedid HM, Rapoport A, et al. Prognostic significance of the number of lymph nodes in elective neck dissection for tongue and mouth floor cancers. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 2012;78(2):22-6.
23. Ikram M, Jafferbhoy SF, Onali MAS. Neck recurrence in early carcinoma tongue. *J. Pak. Med. Assoc.* 2006;56(10):448-51.
24. Yoshida K, Kashima K, Suenaga S, Nomi N, Shuto J, Suzuki M. Immunohistochemical detection of cervical lymph node micrometastases from T2N0 tongue cancer. *Acta Otolaryngol.* 2005;125(6):654-8.
25. Koenig AM, Prenzel KL, Bogoevski D, et al. Strong impact of micrometastatic tumor cell load in patients with esophageal carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 2009;16(2):454-62.

26. Broglie M a, Haerle SK, Huber GF, Haile SR, Stoeckli SJ. Occult metastases detected by sentinel node biopsy in patients with early oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: impact on survival. *Head Neck* 2013;35(5):660-6.
27. Nieuwenhuis EJC, Leemans CR, Kummer JA, et al. Assessment and clinical significance of micrometastases in lymph nodes of head and neck cancer patients detected by E48 (Ly-6D) quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. *Lab. Invest.* 2003;83(8):1233-40.
28. Bilde A, von Buchwald C, Therkildsen MH, et al. Need for intensive histopathologic analysis to determine lymph node metastases when using sentinel node biopsy in oral cancer. *Laryngoscope* 2008;118(3):408-414.
29. Yuen AP, Wei WI, Wong YM, Tang KC. Elective neck dissection versus observation in the treatment of early oral tongue carcinoma. *Head Neck* 1997;19(7):583-8.
30. Spiro RH, Morgan GJ, Strong EW, Shah JP. Supraomohyoid neck dissection. *Am. J. Surg.* 1996;172(6):650-3.
31. Christensen A, Bilde A, Therkildsen MH, et al. The prevalence of occult metastases in nonsentinel lymph nodes after step-serial sectioning and immunohistochemistry in cN0 oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2011;121(2):294-298.
32. Bree R de, Takes RP, Castelijns JA, et al. Advances in diagnostic modalities to detect occult lymph node metastases in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2014..
33. Jose J, Coatesworth AP, MacLennan K. Cervical metastases in upper aerodigestive tract squamous cell carcinoma: histopathologic analysis and reporting. *Head Neck* 2003;25(3):194-7.
34. Winkvist E, Oliver T, Gilbert R, Cancer N. Postoperative chemoradiotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck : a systematic review with meta-analysis. *Head and Nec*, 2007; January: 38-46.

8. Aspectos Éticos

Este trabalho foi desenvolvido a partir da observação de dados obtidos em prontuários médicos armazenados no serviço de arquivo médico (SAM) – HC Unicamp. Foi mantido completo sigilo sobre as informações levantadas e sobre identidade de pacientes.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da FCM – Unicamp sob o parecer número 526/2010 (ítem “Anexos 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa”).

9. Discussão Geral

Apesar de todos os pacientes terem sido classificados inicialmente como clínica e radiologicamente N0, sete de 21 (33%) apresentaram metástases cervicais já na análise histopatológica convencional (onde a maioria dos pacientes foi estadiado como T2 a T4). Isso reforça a necessidade de esvaziamento cervical eletivo, mesmo no pescoço clinicamente negativo, nos tumores acima de T2 e reitera que a avaliação clínica e radiológica são insuficientes para estadiar o pescoço desses pacientes³⁶. O esvaziamento cervical eletivo já demonstrou seu papel como método de estadiamento e, para alguns autores, tratamento^{4,10,19}.

Diversos autores já demonstraram que a incidência de metástases cervicais ocultas em pacientes com exame físico normal e exames de imagem sem sinais de metastatização pode variar consideravelmente, chegando taxas de até 30% nos exames anatomo-patológicos^{31,36-43}.

A presença de metástase linfática cervical em câncer de cabeça e pescoço é o fator isolado que mais interfere negativamente no prognóstico dos pacientes. Não apenas a presença da metástase, mas também o número de linfonodos acometidos²³, o nível cervical⁴⁴, o tamanho dos linfonodos e a presença de extravasamento extra capsular²² são fatores que influenciam o prognóstico. Assim, um paciente inicialmente classificado como cN0, que ao exame anátomo-patológico mostre-se pN1, terá um resultado oncológico mais reservado.

O presente estudo realizou uma revisão das laminas HE originais dos pacientes selecionados e, posteriormente, cortes seriados com espessura de 5µm e nova análise HE, pelos mesmos patologistas.

Após a realização da análise com cortes seriados, quatro pacientes mudaram de classificação, três deles de pN0 a pN1, e outro de pN1 a pN2b, o que nos leva a um índice de

19% de pacientes com mudança de estadiamento cervical. Houve aumento de 43% de pacientes com pescoços patologicamente comprometidos por doença metastática, inicialmente sete pacientes a após nova análise dez pacientes. O estadiamento cervical aumentou em 19% dos pacientes, três de pN0 para pN1 e outro de pN1 para pN2b. O estadiamento geral dos pacientes mudou para mais em 14% dos pacientes, dois passaram de estágio II para III e um de estágio III para IV. Estes dois pacientes previamente estadiados como estágio II não receberam tratamento adjuvante, quando com a nova análise deveriam receber radioquimioterapia pós operatória. O paciente estadiado como T3N1 recebeu radioterapia pós-operatória, mas após a nova análise deveria receber quimioterapia concomitante à radioterapia pelo estadio IVa. Este último paciente em particular evoluiu com recorrência regional, que talvez não houvesse, caso fosse submetido ao tratamento adjuvante concomitante, se houvesse sido realizado a metodologia de cortes seriados de todos linfonodos do espécime cirúrgico do seu esvaziamento cervical.

Pode-se argumentar que na literatura médica ainda não há consenso sobre o impacto prognóstico da presença de micrometastases cervicais, porém não restam dúvidas de que a presença de macrometastases ou um maior número de linfonodos acometidos (pN2b), diminuem consideravelmente a sobrevida global dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço ^{22,44-46}, além de obrigar o médico a considerar uma mudança no planejamento terapêutico, incluindo modalidades adjuvantes de tratamento, como radioterapia e quimioterapia ²⁴⁻²⁷. Esses, por sua vez, se por um lado aumentam a chance de cura e a sobrevida dos pacientes, por outro aumentam também as complicações e a morbidade do tratamento como um todo ⁴⁷.

Acredita-se que mais de 10% dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço apresentarão recidiva loco-regional, apesar de classificados como pN0 pelos métodos tradicionais, e isso provavelmente se deva à presença de acometimento cervical não detectado ⁴. Inúmeras

técnicas auxiliares têm surgido, na tentativa de melhorar a detecção de possíveis metástases cervicais e estadiamento dos pacientes, como marcadores moleculares, ensaios imunohistoquímicos, técnicas de imagem e o uso da pesquisa de linfonodo sentinela ³⁶.

Ross et al, em 2004, estudando 61 pacientes com câncer T1 e T2 de cavidade oral e orofaringe, clinicamente N0, encontrou 44% de acometimento cervical na análise H&E convencional sendo que cinco micrometástases somente foram detectadas após análise com cortes seriados ⁴¹.

Porém, esses números podem variar bastante na literatura, de acordo com o método empregado na análise, chegando a taxas de até 30%, como demonstrado por Coatesworth e cols ³².

Yoshida et al, em estudo com 24 pacientes com carcinoma de língua T2N0, encontrou 58% de metástases cervicais ocultas, além de 29% de progressão para o estadiamento pN2b ⁴⁸. Mais uma vez fica demonstrada a importância de uma análise profunda e criteriosa do envolvimento cervical nesses pacientes.

O impacto da presença de micrometástases cervicais nesses pacientes ainda é incerto, e a maioria dos estudos falhou em estabelecer relação com diminuição na sobrevida. Porém, mais recentemente esse panorama começou a dar sinais de uma possível mudança.

Um dos primeiros autores a estabelecer relação entre a presença de micrometástases e piora na sobrevida dos pacientes com CEC de cabeça e pescoço foi Izbicki, em 1997. Ao estudar 68 pacientes com neoplasia de esôfago, encontrou 17% de metástases cervicais ocultas ao exame anátomo-patológico convencional, relacionado tal achado a piora na sobrevida livre de doença ($p=0,008$) e sobrevida global ($p=0,03$) ⁴⁰.

Snow et al foi outro autor a documentar a alta incidência de metástases ocultas em neoplasias de cabeça e pescoço, sendo um dos primeiros a ressaltar o possível papel deletério das mesmas no prognóstico dos pacientes ³³.

Em 2009, Koenig et al, estudando 73 pacientes com carcinoma de esôfago, confirmou a alta prevalência de metástases ocultas e estabeleceu relação com impacto na sobrevida global ($p=0,03$) naqueles acometidos por adenocarcinoma. Nos pacientes diagnosticados com carcinoma espino celular, o autor ainda encontrou uma tendência semelhante, com $p=0,081$ ³⁴.

Mais recentemente, em 2010, com a técnica do linfonodo sentinela em pacientes com neoplasia de cavidade oral e orofaringe, Brogley et al encontrou 31% de macrometástases não diagnosticadas inicialmente, 45% de micrometástases e 24% de ITC, e pela primeira vez estabeleceu relação com impacto na sobrevida global e livre de doença para os primeiros, mas não para ITC³⁵. Esse estudo observou que pacientes acometidos por carcinoma espino celular de cavidade oral e orofaringe com disseminação cervical, ainda que microscópica, estão sujeitos a um pior resultado oncológico em relação aos verdadeiramente pN0. Concluíram, também, assim como o nosso estudo, que a análise convencional não é suficiente para estadiar corretamente o pescoço dos pacientes com CEC de cavidade oral e orofaringe.

O benefício de uma análise mais criteriosa está cada vez mais evidente.

Nosso estudo não estabeleceu correlação entre a mudança no estadiamento cervical pela presença de metástases ocultas e a sobrevida dos pacientes, devido ao número limitado de pacientes. Dentre aqueles nos quais houve alteração do estadiamento cervical, todos T2 ou T3, a taxa de mortalidade foi de 50% (4/8). Nenhuma das outras variáveis analisadas teve impacto na sobrevida, conforme demonstrado pelas curvas de sobrevida presentes no item “Anexo 1 – curvas de sobrevida para as demais variáveis analisadas”.

10. Conclusão Geral

Devido ao elevado índice de alteração no estadiamento inicial encontrado (19%), e o fato de um dos pacientes mudar de pT3N1 para pT3N2b, antes estadio clínico III e depois IVa, o que altera todo o planejamento terapêutico devido à necessidade de associar quimioterapia à radioterapia, além de piorar o prognóstico, consideramos o método de cortes seriados superior à análise anátomo-patológica convencional. Apesar de relativamente laborioso e dispendioso, acreditamos que deveria ser utilizado rotineiramente na avaliação linfonodal nos pacientes com carcinoma espino celular de cavidade oral e orofaringe.

11. Referências Bibliográficas

1. Cancer of the Oral Cavity and Pharynx - SEER Stat Fact Sheets.
2. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2014.
3. Pugazhendi SK, Thambiah L, Venkatesetty A, Thangaswamy V. Elective neck dissection versus “wait and watch” policy in tongue carcinoma. *J. Pharm. Bioallied Sci.* 2012; 4(Suppl 2):S226-9.
4. Duvvuri U, Simental Jr. a a, D’Angelo G, et al. Elective neck dissection and survival in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Laryngoscope*, 2004;114(12):2228-2234.
5. Ferlito A, Kowalski LP, Byers RM, et al. Is the standard radical neck dissection no longer standard? *Acta Otolaryngol.* 2002;122(7):792-5.
6. Pezzullo L, Chiofalo MG, Di Cecilia ML, Marone U. Neck dissection for Head and Neck cancers: state of the art and classification. *G. Chir.* 2011;32(3):164-9.
7. Spiro RH, Strong EW, Shah JP. Classification of neck dissection: variations on a new theme. *Am. J. Surg.* 1994;168(5):415-8.
8. Ferlito A, Robbins KT, Silver CE, Hasegawa Y, Rinaldo A. Classification of neck dissections: an evolving system. *Auris. Nasus. Larynx.* 2009;36(2):127-34.
9. Seethala RR. Current state of neck dissection in the United States. *Head Neck Pathol.* 2009;3(3):238-45. doi:10.1007/s12105-009-0129-y.
10. Capote A, Escorial V, Muñoz-Guerra MF, Rodríguez-Campo FJ, Gamallo C, Naval L. Elective neck dissection in early-stage oral squamous cell carcinoma-- does it influence recurrence and survival? *Head Neck* 2007;29(1):3-11.
11. Yuen AP, Wei WI, Wong YM, Tang KC. Elective neck dissection versus observation in the treatment of early oral tongue carcinoma. *Head Neck.* 1997;19(7):583-8.
12. Campisi CC, Boccardo F, Piazza C, Campisi C. Evolution of chylous fistula management after neck dissection. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2013;21(2):150-6.
13. Sheikh A, Shallwani H, Ghaffar S. Postoperative shoulder function after different types of neck dissection in head and neck cancer. *Ear. Nose. Throat J.* 93(4-5):E21-6.
14. Cserni G. A model for determining the optimum histology of sentinel lymph nodes in breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 2004;57(5):467-71.

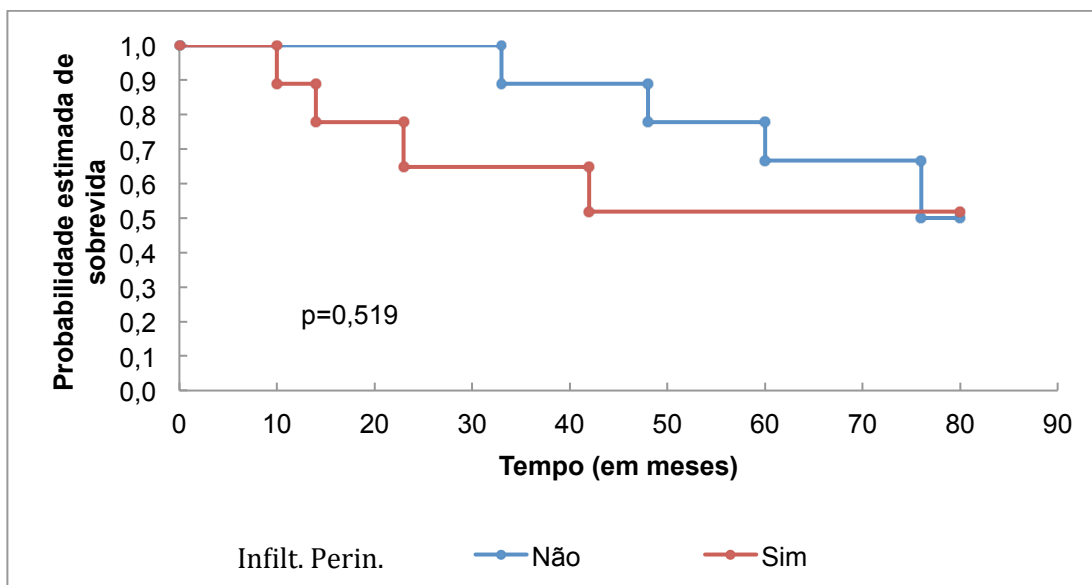
15. Valla M, Gjertrud Mjølnes P, Knopp S. Implementation of step sectioning in the examination of sentinel lymph nodes to improve the detection of micrometastases in breast cancer patients. *APMIS* 2012;120(7):521-8.
16. Cserni G. Complete sectioning of axillary sentinel nodes in patients with breast cancer. Analysis of two different step sectioning and immunohistochemistry protocols in 246 patients. *J. Clin. Pathol.* 2002;55(12):926-31.
17. Murer K, Huber GF, Haile SR, Stoeckli SJ. Comparison of morbidity between sentinel node biopsy and elective neck dissection for treatment of the n0 neck in patients with oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2011;33(9):1260-4.
18. Bilde A, von Buchwald C, Therkildsen MH, et al. Need for intensive histopathologic analysis to determine lymph node metastases when using sentinel node biopsy in oral cancer. *Laryngoscope* 2008;118(3):408-414.
19. Ganly I, Goldstein D, Carlson DL, et al. Long-term regional control and survival in patients with “low-risk,” early stage oral tongue cancer managed by partial glossectomy and neck dissection without postoperative radiation: the importance of tumor thickness. *Cancer* 2013;119(6):1168-76.
20. Mücke T, Mitchell DA, Wagenpfeil S, Ritschl LM, Wolff K-D, Kanatas A. Incidence and outcome for patients with occult lymph node involvement in T1 and T2 oral squamous cell carcinoma: a prospective study. *BMC Cancer* 2014;14:346.
21. Jones HB, Sykes A, Bayman N, et al. The impact of lymphovascular invasion on survival in oral carcinoma. *Oral Oncol.* 2009;45(1):10-5.
22. Snow GB, Annyas AA, van Slooten EA, Bartelink H, Hart AA. Prognostic factors of neck node metastasis. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 1982;7(3):185-92.
23. Amar A, Chedid HM, Rapoport A, et al. Prognostic significance of the number of lymph nodes in elective neck dissection for tongue and mouth floor cancers. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* 2012;78(2):22-6.
24. Campbell BH, Saxman SB, Kish JA, et al. *New England Journal.* 2004:1937-1944.
25. Ao JOK, Avaf AMIRL, Eng MAST, Uang DEH, Enden ERICMG. Head and Neck. Adjuvant radiotherapy and survival for patients node-positive head and neck cancer: an analysis by primary site and nodal stage. 2008;71(2):362-370.
26. Winkvist E, Oliver T, Gilbert R, Cancer N. Postoperative chemoradiotherapy for advanced squamous cell carcinoma of the head and neck : a systematic review with meta-analysis. *Head and Neck*, 2007; January: 38-46.
27. Maingon P, Rolland F, Bolla M, et al. Postoperative Irradiation with or without Concomitant Chemotherapy for Locally Advanced Head and Neck Cancer. 2004:1945-52.

28. Zarbo RJ, Barnes L, Crissman JD, Gnepp DR, Mills SE. Recommendations for the reporting of specimens containing oral cavity and oropharynx neoplasms. Association of Directors of Anatomic and Surgical Pathology. Hum. Pathol. 2000;31(10):1191-3.
29. Bernier J, Cooper JS, Pajak TF, et al. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). Head Neck. 2005;27(10):843-50.
30. Hermanek P, Hutter R V, Sobin LH, Wittekind C. International Union Against Cancer. Classification of isolated tumor cells and micrometastasis. Cancer. 1999;86(12):2668-73.
31. Ferris RL, Xi L, Raja S, et al. Molecular Staging of Cervical Lymph Nodes in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. 2005;(6):2147-2156.
32. Coatesworth AP, MacLennan K. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: the prevalence of microscopic extracapsular spread and soft tissue deposits in the clinically N0 neck. Head Neck. 2002;24(3):258-61.
33. Nieuwenhuis EJC, Leemans CR, Kummer JA, Denkers, Fedor, Snow, GB, Brakenhoff, RH, Kummer, A. Assessment and clinical significance of micrometastases in lymph nodes of head and neck cancer patients detected by E48 (Ly-6D) quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction. Lab. Invest. 2003;83(8):1233-40.
34. Koenig AM, Prenzel KL, Bogoevski D, et al. Strong impact of micrometastatic tumor cell load in patients with esophageal carcinoma. Ann. Surg. Oncol. 2009;16(2):454-62.
35. Broglie M a, Haerle SK, Huber GF, Haile SR, Stoeckli SJ. Occult metastases detected by sentinel node biopsy in patients with early oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: impact on survival. Head Neck. 2013;35(5):660-666.
36. Bree R de, Takes RP, Castelijns JA, et al. Advances in diagnostic modalities to detect occult lymph node metastases in head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck 2014.
37. Elsheikh MN, Rinaldo a, Hamakawa H, et al. Importance of molecular analysis in detecting cervical lymph node metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. Head Neck. 2006;28(9):842-849.
38. Christensen A, Bilde A, Therkildsen MH, et al. The prevalence of occult metastases in nonsentinel lymph nodes after step-serial sectioning and immunohistochemistry in cN0 oral squamous cell carcinoma. Laryngoscope. 2011;121(2):294-298.

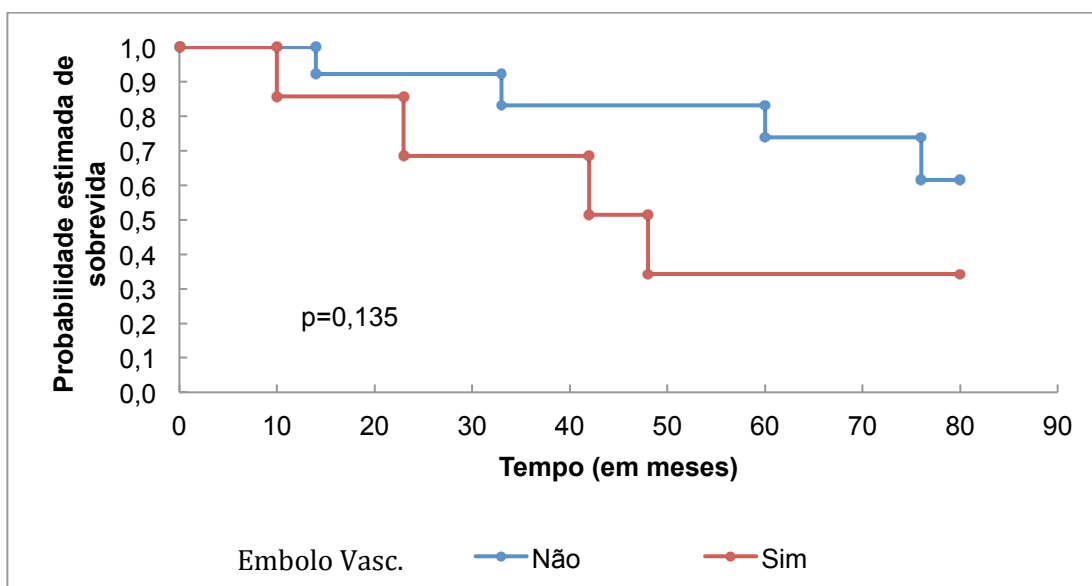
39. Ho CM, Lam KH, Wei WI, Lau SK, Lam LK. Occult lymph node metastasis in small oral tongue cancers. *Head Neck*. 14(5):359-63.
40. Izbicki JR, Hosch SB, Pichlmeier U, et al. Prognostic value of immunohistochemically identifiable tumor cells in lymph nodes of patients with completely resected esophageal cancer. *N. Engl. J. Med.* 1997;337(17):1188-94.
41. Ross GL, Soutar DS, MacDonald DG, Shoaib T, Camilleri IG, Robertson AG. Improved staging of cervical metastases in clinically node-negative patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 2004;11(2):213-8.
42. Stoeckli SJ, Pfaltz M, Steinert H, Schmid S. Histopathological features of occult metastasis detected by sentinel lymph node biopsy in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2002;112(1):111-5.
43. Van den Brekel MW, van der Waal I, Meijer CJ, Freeman JL, Castelijns JA, Snow GB. The incidence of micrometastases in neck dissection specimens obtained from elective neck dissections. *Laryngoscope*. 1996;106(8):987-91.
44. Jones AS, Roland NJ, Field JK, Phillips DE. The level of cervical lymph node metastases: their prognostic relevance and relationship with head and neck squamous carcinoma primary sites. *Clin. Otolaryngol. Allied Sci.* 1994;19(1):63-9.
45. Shah JP. Cervical lymph node metastases--diagnostic, therapeutic, and prognostic implications. *Oncology (Williston Park)*. 1990;4(10):61-9; discussion 72, 76.
46. Cunningham MJ, Johnson JT, Myers EN, Schramm VL, Thearle PB. Cervical lymph node metastasis after local excision of early squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Am. J. Surg.* 1986;152(4):361-6.
47. Schoenfeld GO, Amdur RJ, Morris CG, Li JG, Hinerman RW, Mendenhall WM. Patterns of failure and toxicity after intensity-modulated radiotherapy for head and neck cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2008;71(2):377-85.
48. Yoshida K, Kashima K, Suenaga S, Nomi N, Shuto J, Suzuki M. Immunohistochemical detection of cervical lymph node micrometastases from T2N0 tongue cancer. *Acta Otolaryngol.* 2005;125(6):654-8.

12. Anexo 1 – Curvas de sobrevida para as demais variáveis analisadas

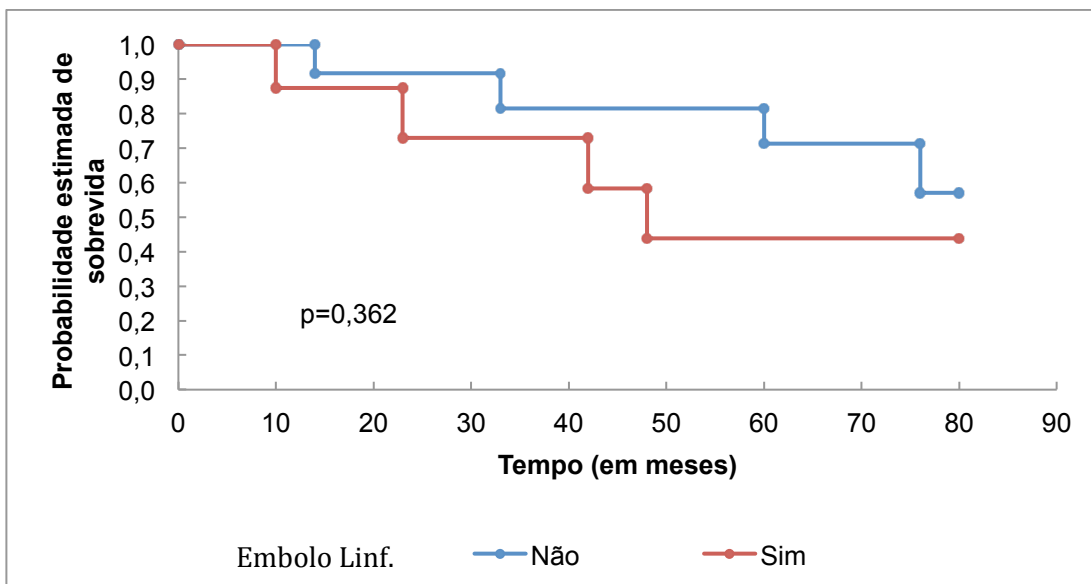
1.1 - Infiltração perineural vs sobrevida



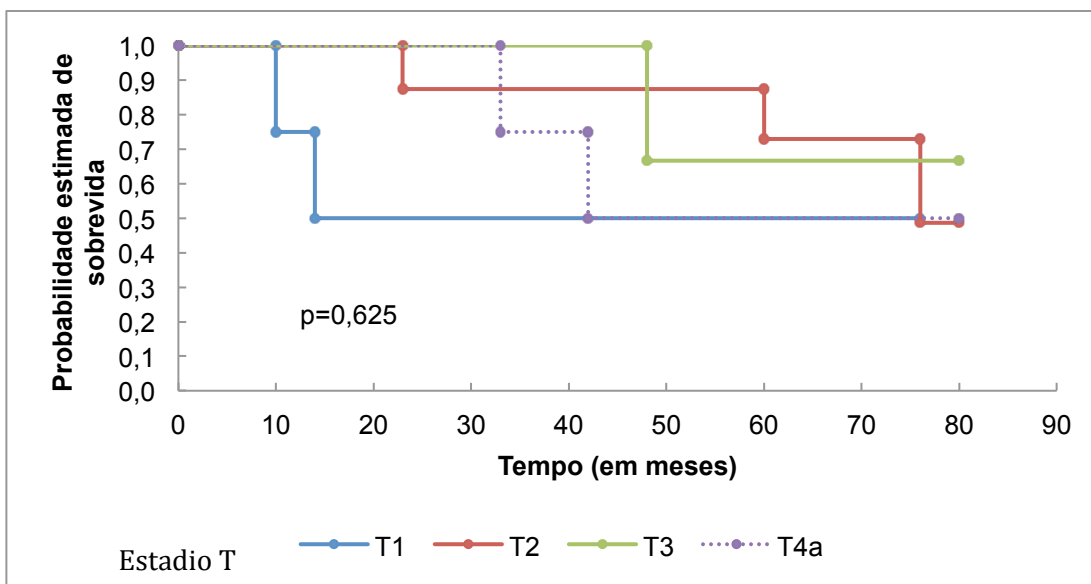
1.2 – Êmbolos vasculares vs sobrevida



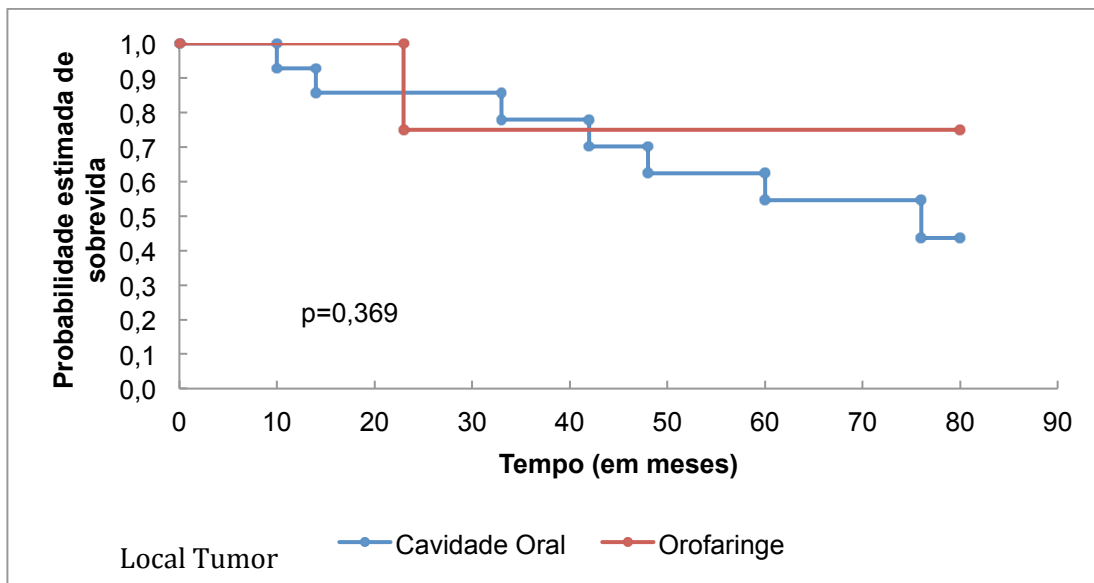
1.3 – Êmbolos linfáticos vs sobrevida



1.4 – Estadio “T” vs sobrevida



1.5 – Localização do tumor inicial vs sobrevida



13. Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 20/07/10
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 526/2010 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 0408.0.146.000-10

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA CONVENCIONAL VERSUS CORTES SERIADOS DE LINFONODOS EM ESPÉCIMES CIRÚRGICOS DE ESVAZIAMENTOS CERVICAIS SEM METÁSTASES LINFÁTICAS (PN0) OU COM APENAS UMA ÚNICA METÁSTASE LINFÁTICA (PN1): CORRELAÇÃO COM SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA NO PACIENTE COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carlos Takahiro Chone

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 10/06/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 20/07/11 (O formulário encontra-se no *site* acima).

II - OBJETIVOS

Avaliar se o estudo anatomopatológico de toda a peça cirúrgica pode aumentar o diagnóstico de metástase linfonodal em pacientes submetidos a esvaziamento cervical por câncer de cabeça e pescoço.

III - SUMÁRIO

Estudo retrospectivo onde será analisado o prontuário de pacientes operados entre 1995 a 2002 e o material armazenado em blocos de parafina será reestudado para se observar o estadiamento microscópico. Estes resultados serão comparados à sobrevida dos pacientes.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado a dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).


O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de junho de 2010.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

14. Apêndices

1. Comprovante de Apresentação em Congresso Científico



2. Comprovante de Submissão do Artigo a Revista Científica

11/24/2014

fealliegro - Yahoo Mail

3 de Nov

Auris Nasus Larynx

Para eu duensa39@yahoo.com.br

Dear Fernando,

We have received your article "Routine histopathological evaluation versus step-serial sectioning of neck dissection specimens from pN0 and pN1 oral and oropharyngeal SCC patients: modifications to neck status and correlation with survival" for consideration for publication in Auris Nasus Larynx.

Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.

To track the status of your paper, please do the following:

1. Go to this URL: <http://ees.elsevier.com/anl/>
2. Enter these login details:
Your username is: fealliegro@yahoo.com.br
If you need to retrieve password details, please go:
to http://ees.elsevier.com/ANL/automail_query.asp
3. Click [Author Login]
This takes you to the Author Main Menu.
4. Click [Submissions Being Processed]

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Auris Nasus Larynx

Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here:
http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923> Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.