

CAPÍTULO III

MATERIAL E MÉTODOS

1 - Caracterização da amostra

No Instituto Português de Oncologia do Porto foram admitidos 108 doentes com neoplasias malignas do lábio, no período compreendido entre Janeiro de 2003 e Abril de 2006. Destes, foram incluídos no estudo 108 casos tratados consecutivamente com intenção curativa. O estudo foi retrospectivo com recurso ao processo clínico. A classificação histológica utilizada foi a proposta pela Organização Mundial de Saúde (25). A classificação por estádios utilizada foi a publicada pela AJCC em 2002 (26).

Definiu-se Sobrevivência global o período compreendido entre a data do 1º tratamento e a morte ou a última consulta de seguimento. Recidiva foi definida como o reaparecimento da doença após tratamento com intenção curativa (R0).

2 - Estudo imunohistoquímico com os anticorpos CD34 e D2-40

Fragmentos do carcinoma do lábio de 8 casos foram fixados em formaldeído a 10% durante 24 horas e posteriormente incluídos em parafina. Obtiveram-se cortes com a espessura de 4 a 6 micras os quais foram montados em lâminas revestidas previamente com 0,1% de poli-L-lisina. Após coloração com hematoxilina e eosina os cortes foram observados e classificados por um patologista de acordo com os critérios da classificação histológica atrás referida. Após desparafinação foi realizada recuperação antigénica com ácido cítrico e micro-ondas nos casos estudados com o anticorpo CD34 e banho-maria nos casos estudados com o anticorpo D2-40. Para a detecção dos vasos foram utilizados anti-corpos monoclonais respectivamente o anti-corpo anti-CD34 produzido pela Novocrastra (NCL-L-END) na diluição de 1/25 e o anti-corpo D2-40 produzido pela Dako (M3619) na diluição de 1/200. A incubação das lâminas com o anticorpo primário foi realizada em câmara húmida à temperatura ambiente *over-night*. Procedeu-se à ligação com um anti-corpo secundário biotilado e do complexo estreptavidina-peroxidase seguido da reacção da peroxidase com

diaminobensidina. Posteriormente as lâminas foram coradas com hematoxilina de Mayer.

3 - Quantificação da imunoreactividade

A densidade de vasos marcados com CD34 e D2-40 foi avaliada, por dois observadores, em regiões com elevada concentração de vasos localizadas na área peri-tumoral e intra-tumoral. Para tal foi utilizado o método de Chalkley modificado com recurso a câmara clara (Figura 3.1) projectou-se o corte histológico sobre uma grelha de Chalkley (27) (Figura 3.2), assinalando a intersecção dos vasos com os pontos desta grelha, utilizando-se uma ampliação de 100X. O número de vasos assinalados, em cada caso, por cada observador foi comparado. Comparou-se, em cada caso, o nº de vasos marcados com CD34 e D2-40 obtido na área peri-tumoral e intra-tumoral. Estabeleceu-se a taxa de angiogénese (MVD – CD34) como alta quando a média de vasos foi \geq que 6 e a taxa de linfangiogénese (LVD – D2-40) como alta quando a média de vasos foi \geq que 2,5.



Figura 3.1 – Microscópio de câmara clara

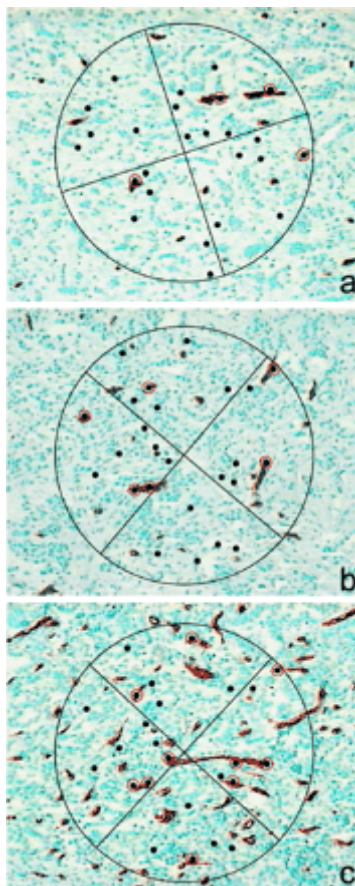


Figura 3.2 - Grelha de Chalkley, *a* - Vasos linfáticos na mucosa normal, *b* - Vasos linfáticos peri-tumorais, *c* - Vasos linfáticos intra-tumorais (27).

4 - Análise estatística

Os dados foram apresentados em tabelas de frequência, para a comparação de variáveis categóricas foi utilizado o teste de Qui-quadrado e sempre que necessário o teste de Fisher.

No estudo clínico (108 casos) a sobrevivência foi estudada de acordo com o modelo de Kaplan-Meier. A comparação das curvas de sobrevivência foi realizada recorrendo ao teste de Log-Rank. A análise multivariada foi realizada de acordo com o modelo de regressão de Cox.

No estudo imunohistoquímico foi utilizado o teste de t de student, o teste de U Mann-Whitney e Kruskal-Wallis para avaliar a associação entre as variáveis numéricas e categóricas.

As comparações foram consideradas significativas quando o valor de $p < 0,05$. Foi utilizado no estudo estatístico, o programa específico SPSS® versão 13 para Windows.