



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
CURSO DE MESTRADO**

**REAÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS EM CARCINOMAS DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR: ESTUDO CLÍNICO-
PATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO**

HELLEN BANDEIRA DE PONTES SANTOS

CAMPINA GRANDE/ PB

2016

HELLEN BANDEIRA DE PONTES SANTOS

**REAÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS EM CARCINOMAS DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR: ESTUDO CLÍNICO-
PATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

ORIENTADOR: PROF. DR. CASSIANO FRANCISCO WEEGE NONAKA

CAMPINA GRANDE/ PB

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

S237r Santos, Hellen Bandeira de Pontes.
Reação de células gigantes multinucleadas em carcinomas de células escamosas de lábio inferior [manuscrito] : estudo clínico-patológico e imunoistoquímico / Hellen Bandeira de Pontes Santos. - 2016.
108 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2016.
"Orientação: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa".

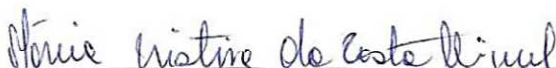
1. Carcinoma de células escamosas. 2. Neoplasias labiais. 3. Células gigantes. 4. Estadiamento de neoplasias. 5. Gradação de tumores. I. Título. 21. ed. CDD 616.994 31

HELLEN BANDEIRA DE PONTES SANTOS


REAÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS EM CARCINOMAS
DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR: ESTUDO CLÍNICO-
PATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO

DATA DA DEFESA: 14/07/2016

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel/ UFRN
Membro titular (1ª Examinadora)



Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves/ UEPB
Membro titular (2ª Examinadora)



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka/ UEPB
Membro titular (Orientador)

***“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor,
a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”***

Albert Einstein

Dedicatória

A **Deus**, pelo amor pleno, proteção e por ser o meu maior guia nos caminhos desta vida!

Aos donos do meu mais puro e profundo amor:

Giselda Claudino de Pontes e Henrique José Bandeira Santos.

Quando Deus precisou de amor, coragem e retidão na Terra, Ele criou vocês. **Mainha e Painho**, quão privilegiada sou por ter o amor, a bondade, o exemplo, o apoio incondicional, o incentivo, o cuidado e a doação de vocês todas as horas da minha existência.

Vocês são a minha maior fonte de inspiração e meus maiores exemplos de honestidade, garra, determinação e integridade.

Conseguimos realizar mais um sonho e, sempre unidos, iremos além, pois vocês plantaram em mim de forma sólida um desejo constante de lutar pelos meus objetivos e ideais. A vocês, dedico esta conquista e a minha trajetória de vida!

À minha amada irmã **Hallyne Bandeira de Pontes Santos**, companheira fiel desde os primeiros passos da minha vida. Agradeço-te pelo amor, torcida e apoio irrestritos, e por me mostrar, junto aos nossos pais, que a família é a base de tudo.

*“Ainda que eu falasse as línguas dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine. E ainda que tivesse o dom da profecia e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse **amor**, nada seria.”*

(1 Coríntios 13:1-2)

Agradecimento especial

À minha grande referência no universo acadêmico, meu eterno orientador **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**. Se palavras pudessem traduzir o tamanho dos meus sentimentos, certamente, o texto de imensurável gratidão, admiração e carinho escrito para o senhor iria para o *Guinness Book*. Sou profundamente grata por ter me oferecido durante estes quatro anos oportunidades únicas, investindo plenamente na minha formação e sempre me orientando a escolher os melhores caminhos. Agradeço a sua amizade, seu exemplo diário, bondade, confiança, compreensão, atenção e excepcional qualidade de orientação. Serei eternamente grata por toda a sua dedicação, seu tempo, preocupação com o meu aprendizado e, principalmente, por me mostrar em cada detalhe que o conhecimento é infinito. Com muito zelo, carregarei tudo o que aprendi com o senhor, tanto os conhecimentos científicos, como o lindo exemplo de bondade, retidão e amor em tudo que faz. Seus ensinamentos me servirão de base por toda a minha vida e, seguindo o seu exemplo, sempre buscarei ajudar outras pessoas a vislumbrar a capacidade modificadora que o conhecimento oferece. Espero retribuir ao longo da vida, pelo menos uma parcela, tudo que recebi. Com muito orgulho, sempre serei a “discípula do Professor Cassiano”.

Agradecimientos

À **Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves**, pela enorme e efetiva contribuição na minha formação ao longo destes anos. Agradeço imensamente as inúmeras oportunidades de aprendizado que a senhora me proporcionou, a amizade, o carinho, a confiança, a solicitude e o belo exemplo de ser humano, professora, pesquisadora e patologista oral. Seu amor a tudo que realiza é inspirador! Meus sinceros e mais profundos agradecimentos!

Ao **Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy**, dono de todo o meu carinho e afeto. Com o senhor, tive o primeiro contato com a Patologia Oral e, por meio da sua maravilhosa didática, inteligência e carisma, logo me apaixonei. Sou encantada pelo seu amor à vida acadêmica, bem como pelo lindo ser humano que és. Eternamente grata pelo apoio, carinho e incentivo que o senhor sempre dispensou a mim.

À **Profa. Dra. Ana Flávia Granville-Garcia**, minha Professora Anjinha, pelo grande exemplo de pesquisadora, professora e ser humano que representa para mim. Posso afirmar que aprendi com a senhora importantes fundamentos de epidemiologia, pesquisa científica e bioestatística que me ajudarão durante toda a minha vida. Agradeço também o seu amor maternal, seus conselhos e carinho direcionados a mim. Aonde quer que eu vá, levarei a senhora no meu coração.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB**, pela sólida formação que recebi no Curso de Mestrado. Além de trabalhar efetivamente na linha de pesquisa a qual estava inserida (Estudo das Alterações do Sistema Estomatognático), pude ter um interessante intercâmbio de conhecimento com Epidemiologia e Promoção de Saúde em Odontologia e Estudo das Terapias Complementares em Odontologia. Tal processo foi extremamente enriquecedor. Agradeço à Coordenadora **Profa. Dra. Patrícia Meira Bento** e aos demais Professores Permanentes e Colaboradores: **Prof. Dr. Alessandro Leite Cavalcanti**, **Profa. Dra. Ana Cláudia Dantas de Medeiros**, **Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes**, **Profa. Dra. Daniela Pita de Melo**, **Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa**, **Prof. Dr. José Renato Cavalcanti de Queiroz**, **Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira**, **Prof. Dr. Kenio Costa de Lima**, **Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez**, **Profa. Dra. Maria Helena Chaves de Vasconcelos Catão**, **Profa. Dra. Renata Rocha**, **Profa. Dra. Rilva Suely de Castro Cardoso Lucas**, **Prof. Dr. Sérgio d'Ávila Lins Bezerra Cavalcanti** e **Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti**, por todos os ensinamentos e inestimável contribuição no meu processo de formação.

Aos Professores titulares e suplentes da banca de defesa desta dissertação **Profa. Dra. Márcia Cristina da Costa Miguel, Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves, Profa. Dra. Éricka Janine Dantas da Silveira e Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy**, pela atenção e disponibilidade em compartilhar seus grandiosos conhecimentos científicos em prol do aprimoramento deste trabalho.

Àqueles que possuem a missão de inspirar e ajudar no processo de formação de tantas outras pessoas, **todos os meus queridos Professores**, minha eterna gratidão pelos ensinamentos e incansável apoio. Desde os meus três anos de idade, com as minhas “tias” em Guarabira, tento absorver e captar para a minha vida, aquilo que há de mais bonito nesse processo: a generosidade e a inquietude de querer aprender sempre mais.

À toda a minha família, pela atuação incisiva nos mais importantes momentos da minha vida, em especial **vovó Penha, vovô Alfredo e vovó Maria do Carmo**, por representarem a mais bela forma de amor ao próximo. Agradeço todo o cuidado, carinho e inúmeros momentos de alegria que sempre me proporcionaram.

À minha tia **Helisânia Bandeira**, pelo seu exemplo de garra, fé e coragem. Além do amor e incentivo surreais que recebo desde os meus primeiros dias de vida.

De forma muito especial, agradeço ao meu noivo, **Nicássio Menezes**, por todo o amor que nos une, apoio incondicional, cuidado e por abraçar todos os meus sonhos, tomando-os para si. Sua benevolência, paciência, responsabilidade e calma me fazem seguir a vida mais segura e tranquila. Essas lindas qualidades me inspiram todos os dias. Amo muito você!

Às minhas amigas de infância: **Amanda Paulino, Monike Matias e Adna Carolina**, pelo amor que nos envolve. Somos a prova viva de amizade verdadeira. Amo vocês! *“A amizade é uma predisposição recíproca que torna seres igualmente ciosos da felicidade um do outro.”*
Platão

Ao meu grande amigo e dono das sete esferas do dragão, **Matheus Perazzo**, por sete anos de amizade, companheirismo, risadas e cantorias mesmo nos momentos mais árduos. Sua inteligência e competência são diretamente proporcionais à bondade que há dentro de ti. Sou sua fã, Zusquinho! Seguiremos juntos, independentemente de qualquer distância!

À minha querida turma do mestrado: **Matheus Perazzo, Fernanda, Lívia, José Matheus, Carolina, Hianne, Jamesson, Naiana, Katharyna, Jéssica e Monalyza**, pelo companheirismo e comunhão de tantos momentos de felicidade e superação. Aprendi muito com cada um de vocês ao longo deste período e estarei sempre na torcida pelo sucesso de todos!

A todos aqueles que fazem parte do laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB. Este ambiente tornou-se a minha “segunda” casa nesses anos de Iniciação Científica e Mestrado e, certamente, este agradecimento é um dos mais difíceis de escrever, pois não é fácil nos distanciarmos da família que o nosso coração escolhe. Gratidão eterna ao **Professor Cassiano, Professora Pollianna e Professor Gustavo**, pelo carinho, cuidado e afeto sinceros dispensados a mim, levarei vocês comigo aonde quer que eu vá! Aos alunos de Iniciação Científica: **Diego, Vinicius, Deyse e Marina**, pela oportunidade de pesquisarmos e aprendermos juntos, além da amizade que nos envolve. Aos amigos queridos **Lívia, Matheus, Marayza, Geysa, Luana, Babi, Yuri, Fabianna, Jamesson, Luan, Rodolfo, Hitallo, Paulyanna, Jéssica, Rafaella e Janaína**, pelos sorrisos sinceros, pelas comemorações conjuntas das pequenas e grandes vitórias e pelos inúmeros cafés sempre acompanhados de muita alegria e gostosuras. À **Denize Núbia**, minha grande companheira e amiga, sou sua torcedora fiel e admiro bastante a sua bondade e pureza e à **Ana Luzia**, dona de uma fé irrefutável e uma competência extrema, sua luz me deixa mais feliz. Sou grata a Deus por ter todos vocês na minha vida!

Aos funcionários e técnicos do Departamento de Odontologia e do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB, especialmente **Dione, Pâmela, Alexandre, Angeluci, Christopher, Dalvalyne, Seu Toinho, Jocelma, Clécia, Rejane, Seu João e Thiago**, por toda a disponibilidade e carinho.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelos auxílios financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho.

“Fundamental é mesmo o amor, é impossível ser feliz sozinho.”

Tom Jobim

“O que você faz com o amor e cuidado tem uma chance de fazer diferença tanto para você, como para a vida das outras pessoas.

Tudo o que se faz sem amor e sem convicção é fadado ao fracasso e à perda de tempo para você e para os outros.”

Wim Wenders

Resumo

RESUMO

A reação de células gigantes multinucleadas (CGM) tem sido relatada em diversas neoplasias malignas epiteliais. Todavia, a natureza e a potencial implicação prognóstica dessa reação nessas neoplasias permanecem assunto de discussão. No carcinoma de células escamosas (CCE) intraoral, estudos têm sugerido que as CGM podem representar uma reação do tipo corpo estranho à ceratina produzida pelas células tumorais e que, possivelmente, essas células são formadas a partir da fusão de macrófagos M2. No contexto dos CCE de lábio inferior, até o presente momento, não há estudos sobre uma possível relação das reações de CGM com a progressão tumoral (*Pubmed Database, Scopus, Web of Science, LILACS, SIGLE* – acesso em 08/07/2016). Dessa forma, este estudo objetivou avaliar a frequência, a distribuição e o perfil de polarização (M1 – HLA-DR⁺/ M2 – CD163⁺) da reação de CGM em 91 casos de CCE de lábio inferior e verificar a associação desse achado microscópico com parâmetros clínico-patológicos (tamanho do tumor primário, metástase linfonodal regional, metástase à distância, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade). Sob microscopia de luz, cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina foram avaliados quanto à presença e à distribuição da reação de CGM em campos de grande aumento (*high power fields* - HPF). Para avaliar o grau histopatológico de malignidade, foram utilizados os sistemas propostos por Bryne *et al.* (1992) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (CARDESA *et al.*, 2005). No estudo imunoistoquímico, foram incluídos apenas os casos contendo reação de CGM. O anticorpo anti-CD68 foi utilizado a fim de confirmar a natureza monocítica/ macrofágica da reação de CGM. Para identificar o perfil de polarização dessas células, foi estabelecido o percentual de positividade das CGM aos anticorpos anti-HLA-DR e anti-CD163 para cada caso. Trinta e seis (39,6%) casos exibiram reação de CGM. Associações significativas entre a presença da reação de CGM e os parâmetros clínicos não foram observadas ($p > 0,05$). A ocorrência da reação de CGM em casos bem e moderadamente diferenciados (CARDESA *et al.*, 2005) foi 3,3 vezes maior que naqueles casos pobremente diferenciados ($p = 0,006$; RP: 3,30; 95% IC: 1,12-9,68). No *front* de invasão (BRYNE *et al.*, 1992), não foram observadas associações entre a presença da reação de CGM e o grau histopatológico de malignidade ($p = 0,674$), o pleomorfismo nuclear ($p = 0,359$), o padrão de invasão ($p = 0,277$) e o infiltrado inflamatório ($p = 0,653$). Por sua vez, a ocorrência dessas células em casos com alto e moderado grau de ceratinização no *front* de invasão tumoral, foi 2,03 vezes maior que naqueles com mínima ou sem ceratinização ($p = 0,012$; RP: 2,03; 95% IC: 1,11-3,71). Na análise da distribuição, dezoito (50%) casos exibiram reação de CGM em até 3 HPF. Associações significativas entre a distribuição da reação de CGM e os parâmetros clínico-patológicos não foram observadas ($p > 0,05$). A análise imunoistoquímica revelou que as CGM eram CD68⁺ em todos os casos. Além disso, foi observado um predomínio de células que expressavam HLA-DR em relação a CD163 ($p = 0,031$). Os achados do presente estudo sugerem que a reação de CGM não está envolvida com a progressão tumoral em CCE de lábio inferior. Nessas neoplasias, as CGM tendem a apresentar um fenótipo predominantemente M1 e podem representar uma resposta do tipo corpo estranho à ceratina produzida pelas células tumorais.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas; Neoplasias labiais; Células gigantes; Estadiamento de neoplasias; Gradação de tumores; Imuno-histoquímica.

Abstract

ABSTRACT

The multinucleated giant cells (MGCs) reaction has been reported in several epithelial malignancies. However, the nature and potential prognostic implication of this reaction in these neoplasms remain under discussion. In intra-oral squamous cell carcinoma (SCC), studies have suggested that MGCs may represent a foreign body reaction to the keratin produced by tumor cells and that, possibly, these cells are formed from the fusion of M2 macrophages. In the context of lower lip SCCs, there are no studies about a probable relationship between MGC reactions and the tumor progression (Pubmed Database, Scopus, Web of Science, LILACS, SIGLE – access on July 8, 2016). Thus, this study aimed to evaluate the frequency, distribution, and polarization profile (M1 - HLA-DR⁺/ M2 - CD163⁺) of MGC reaction in 91 cases of lower lip SCC and to verify the association of this microscopic finding with clinicopathological parameters (tumor size, node metastasis, distant metastasis, clinical stage, and histopathological grade of malignancy). Under light microscopy, hematoxylin–eosin-stained histological sections were evaluated for the presence and distribution of MGCs reaction in high-power fields (HPFs). To evaluate the histopathological grade of malignancy, the systems proposed by Bryne et al. (1992) and the World Health Organization (WHO) (CARDESA et al., 2005) were used. Only cases containing MGCs reaction were included in the immunohistochemical study. The anti-CD68 antibody was used to confirm the monocytic/ macrophagic nature of the MGCs reaction. To identify the polarization profile of these cells, the percentage of HLA-DR⁺ and CD163⁺ MGCs was established for each case. Thirty-six (39.6%) cases contained MGCs reaction. Significant associations between the presence of MGCs reaction and clinical parameters were not observed ($p > 0.05$). The occurrence of MGCs reaction in well and moderately differentiated cases (CARDESA et al., 2005) was 3.3 higher than in poorly differentiated cases ($p = 0.006$; PR: 3.30; 95% CI: 1.12-9.68). At the tumor invasive front (BRYNE et al., 1992), no associations between the presence of MGCs reaction and the histopathological grade of malignancy ($p = 0.674$), the nuclear pleomorphism ($p = 0.359$), the pattern of invasion ($p = 0.277$), and the inflammatory infiltrate ($p = 0.653$) were seen. Nonetheless, the occurrence of these cells in highly and moderately keratinized tumors at the invasive front was 2.03 higher than in lesions with minimal or no keratinization ($p = 0.012$; PR: 2.03; 95% CI: 1.11-3.71). Regarding the distribution analysis, eighteen (50%) cases had MGCs in up to 3 HPFs. Significant associations between the distribution of MGC reaction and the clinicopathological parameters were not observed ($p > 0.05$). Immunohistochemical analysis revealed that MGCs were CD68⁺ in all cases. Furthermore, it was observed a predominance of HLA-DR⁺ over CD163⁺ cells ($p = 0.031$). The findings of the current study suggest that MGCs reaction is not involved with tumor progression in lower lip SCCs. In these malignancies, MGCs tend to exhibit predominantly an M1 phenotype and may represent a foreign body reaction to the keratin produced by tumor cells.

Keywords: Squamous cell carcinoma; Lip neoplasms; Giant cells; Neoplasm staging; Neoplasm grading; Immunohistochemistry.

Lista de abreviaturas e siglas

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **CA** Califórnia (Estado norte-americano)
- **CAPES** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- **CCE** Carcinoma de células escamosas
- **CCL2** Refere-se à quimiocina CCL2
- **CGM** Célula gigante multinucleada
- **CD9** Do inglês *cluster of differentiation 9*, traduzido como grupamento de diferenciação 9
- **CD10** Do inglês *cluster of differentiation 10*, traduzido como grupamento de diferenciação 10
- **CD11c** Do inglês *cluster of differentiation 11c*, traduzido como grupamento de diferenciação 11c
- **CD13** Do inglês *cluster of differentiation 13*, traduzido como grupamento de diferenciação 13
- **CD14** Do inglês *cluster of differentiation 14*, traduzido como grupamento de diferenciação 14
- **CD16** Do inglês *cluster of differentiation 16*, traduzido como grupamento de diferenciação 16
- **CD18** Do inglês *cluster of differentiation 18*, traduzido como grupamento de diferenciação 18
- **CD68** Do inglês *cluster of differentiation 68*, traduzido como grupamento de diferenciação 68
- **CD163** Do inglês *cluster of differentiation 163*, traduzido como grupamento de diferenciação 163
- **CD204** Do inglês *cluster of differentiation 204*, traduzido como grupamento de diferenciação 204
- **CD206** Do inglês *cluster of differentiation 206*, traduzido como grupamento de diferenciação 206
- **DAP-12** Do inglês *DNAX Activating Protein of 12KDa*, traduzido como proteína de ativação DNAX de 12KDa
- **DC-STAMP** Do inglês *dendritic-cell specific transmembrane protein*, traduzido como proteína transmembrana específica das células dendríticas

- **DNA** Do inglês *deoxyribonucleic acid*, traduzido como ácido desoxirribonucleico
- **DNMT-3** Do inglês *DNA methyltransferase-3*, traduzido como metiltransferase de DNA-3
- **DE** Do alemão *Deutschland*, traduzido como Alemanha
- **EBM/11** Refere-se ao clone do anticorpo anti-CD68
- **HLA-DR** Do inglês *human leukocyte antigen-DR*, traduzido como antígeno leucocitário humano-DR
- **HPF** Do inglês *high power field*, traduzido como campo de grande aumento
- **ICAM-1** Do inglês *intercellular adhesion molecule 1*, traduzido como molécula de adesão intercelular-1
- **IFN- γ** Do inglês *interferon gamma*, traduzido como interferon gama
- **IL-4** Do inglês *interleukyne-4*, traduzido como interleucina-4
- **IL-10** Do inglês *interleukyne-10*, traduzido como interleucina-10
- **IL-12** Do inglês *interleukyne-12*, traduzido como interleucina-12
- **IL-13** Do inglês *interleukyne-13*, traduzido como interleucina-13
- **IL-23** Do inglês *interleukyne-23*, traduzido como interleucina-23
- **M1** Refere-se a macrófagos classicamente ativados
- **M2** Refere-se a macrófagos ativados de forma alternativa
- **M-CSF** Do inglês *macrophage colony-stimulating factor*, traduzido como fator estimulador de colônia de macrófagos
- **MMP** Do inglês *matrix metalloproteinase*, traduzido como metaloproteinase de matriz
- **NJ** Do Inglês *New Jersey*, traduzido como Nova Jersey
- **NK** Do inglês *natural killer*, refere-se à célula assassina natural
- **PG-M1** Refere-se ao clone do anticorpo anti-CD68
- **pH** Potencial hidrogeniônico
- **RAC1** Do inglês *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1*, traduzido como substrato de toxina botulínica relacionada a Ras 1
- **RANK** Do inglês *receptor activator of nuclear factor kappa-B*, traduzido como receptor ativador do fator nuclear kappa-B
- **SGHM** Sistema de gradação histopatológica de malignidade

- **SPSS** Do inglês *Statistical Package for the Social Sciences*, traduzido como Pacote de Serviço Estatístico para as Ciências Sociais
- **STAT6** Do inglês *signal transducer and activator of transcription 6*, traduzido como transdutor de sinal e ativador de transcrição 6
- **TAL.1B5** Refere-se ao clone do anticorpo anti-HLA-DR
- **Th1** Do inglês *T helper 1*, traduzido como T auxiliar 1
- **Th2** Do inglês *T helper 2*, traduzido como T auxiliar 2
- **TNF- α** Do inglês *tumor necrosis factor alpha*, traduzido como fator de necrose tumoral alfa
- **TNM** Tumor-Nodo-Metástase
- **TRAP** Do inglês *tartrate-resistant acid phosphatase*, traduzido como fosfatase ácida resistente ao tartarato
- **TREM-2** Do inglês *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*, traduzido como receptor de disparo expresso nas células mieloides 2
- **TRIS** Tris-hidroximetil-aminometano
- **UEPB** Universidade Estadual da Paraíba
- **USA** Do inglês *United States of America*, traduzido como Estados Unidos da América
- **UV** Ultravioleta
- **UVB** Ultravioleta B
- **VEGF** Do inglês *vascular endothelial growth factor*, traduzido como fator de crescimento endotelial vascular
- **VEGF-C** Do inglês *vascular endothelial growth factor C*, traduzido como fator de crescimento endotelial vascular-C
- **Y-1/82a** Refere-se ao clone do anticorpo anti-CD68
- **10D6** Refere-se ao clone do anticorpo anti-CD68

Lista de ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. Principais componentes do microambiente tumoral do CCE oral.	31
Figura 2. Programação de macrófagos para um estado apto à fusão. Adaptação de Helming e Gordon (2009).	33
Figura 3. Etapas essenciais envolvidas na fusão de macrófagos. 1) Macrófago apto à fusão. 2) Contato entre macrófagos mediado principalmente pela quimiocina CCL2. 3) Adesão intercelular mediada pela E-caderina. 4) Adesão ao substrato através das subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$ das integrinas. 5) Rearranjos no citoesqueleto mediadas por Rac1 e polimerização da actina. 6) Exposição de fosfatidilserina e o reconhecimento de lipídios. 7) Fusão entre as membranas citoplasmáticas e formação de CGM, envolvendo novamente rearranjos do citoesqueleto. Adaptação de Helming e Gordon (2009).	34
Quadro 1. Elenco de variáveis dependentes analisadas no estudo.	44
Quadro 2. Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.	44
Quadro 3. Sistema de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).	45
Quadro 4. Categorias de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).	46
Quadro 5. Sistema de gradação histopatológica de malignidade no <i>front</i> de invasão, proposto por Bryne <i>et al.</i> (1992).	48
Quadro 6. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.	51
Figure 1. Morphological and immunohistochemical features of MGCs in lower lip SCCs. Multiple MGCs in a highly keratinized lower lip SCC (Hematoxylin and eosin stain, 200 \times) (A). Keratin pearl being engulfed by MGCs (Hematoxylin and eosin stain, 400 \times) (B). MGCs reaction showing a strong cytoplasmic positivity for CD68 in different stages of keratins pearls degradation (200 \times) (C and D). Cytoplasmic immunopositivity for HLA-DR (400 \times) (E) and CD163 (400 \times) (F) in MGCs intimately associated with neoplastic cells.	70

Lista de tabelas

LISTA DE TABELAS

	Página
Table 1. Distribution of cases of lower lip SCC according to clinicopathological parameters.	72
Table 2. Distribution of cases of lower lip SCC according to presence/distribution of MGCs reaction and clinicopathological parameters.	73
Table 3. Distribution of cases of lower lip SCC according to presence/distribution of MGCs reaction and single parameters of the histopathological system proposed by Bryne et al. (22).	74

Sumário

SUMÁRIO

	Página
1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS..... 28
2	OBJETIVOS..... 40
2.1	OBJETIVO GERAL..... 40
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 40
3	METODOLOGIA..... 42
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS..... 42
3.2	TIPO DE ESTUDO..... 42
3.3	POPULAÇÃO..... 42
3.4	AMOSTRA..... 43
3.4.1	Critérios de inclusão..... 43
3.4.2	Critérios de exclusão..... 43
3.5	VARIÁVEIS..... 43
3.6	ESTUDO CLÍNICO..... 45
3.7	ESTUDO MORFOLÓGICO..... 47
3.8	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO..... 49
3.8.1	Método imunoistoquímico..... 49
3.8.2	Análise imunoistoquímica..... 51
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 51
4	ARTIGO..... 54
4.1	APRESENTAÇÃO..... 54
4.2	ARTIGO A SER SUBMETIDO..... 55
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS..... 76
	REFERÊNCIAS..... 78
	ANEXOS..... 88
	APÊNDICES..... 103

Considerações iniciais

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O carcinoma de células escamosas (CCE) de lábio é uma neoplasia maligna comum no complexo oral, representando aproximadamente 23,6% a 30% de todos os CCE orais (HASSON, 2008; MARUCCIA *et al.*, 2012; RENA *et al.*, 2014; WEATHERSPON *et al.*, 2015; DOMÍNGUEZ-GORDILLO *et al.*, 2016). A etiopatogenia dessa neoplasia maligna envolve uma série de fatores. O principal fator de risco é a exposição à radiação ultravioleta (UV), principalmente à radiação UVB (SCULLY; BAGAN, 2009; RIO *et al.*, 2013; VANDERLEI *et al.*, 2013). A carcinogenicidade desse tipo de radiação é atribuída à formação de dímeros de pirimidina no ácido desoxirribonucleico (DNA) (CARINCI *et al.*, 2005; BRASILEIRO FILHO, 2011). Em geral, esse tipo de lesão é corrigido pela via de excisão de nucleotídeos, mas com a exposição solar excessiva, a capacidade dessa via de reparo é sobrepujada e, assim, parte da lesão no DNA não é corrigida (KUMAR *et al.*, 2010).

Em virtude da exposição solar crônica ser o principal fator de risco para o CCE de lábio inferior, aumentos significativos na incidência dessa neoplasia maligna têm sido identificados em países tropicais, como o Brasil. Esse aumento tem sido associado principalmente à exposição direta dos indivíduos à luz solar sem adequada proteção (SOUZA *et al.*, 2011). Todavia, a radiação UVB não é o único fator de risco para o desenvolvimento do CCE de lábio inferior. Fatores socioeconômicos e relacionados ao estilo de vida, como uso de fumo e álcool, falhas na vigilância imune e susceptibilidade genética podem contribuir para a carcinogênese labial (MORSELLI *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2011). Além disso, alterações epigenéticas, incluindo a metilação de genes supressores tumorais, especialmente metiltransferases de DNA-3 (DNMT-3), podem desempenhar um importante papel nas fases iniciais da carcinogênese labial fotoinduzida (DANIEL *et al.*, 2016).

O CCE de lábio é usualmente diagnosticado em homens (6:1) de pele clara, entre a quarta e a sexta décadas de vida, expostos à luz solar por longos períodos de tempo (SOUZA *et al.*, 2011; OLIVEIRA ALVES *et al.*, 2014; OZTURK *et al.*, 2014; BIASOLI *et al.*, 2016). Aproximadamente 90 a 95% dos casos estão localizados no lábio inferior, já que a sua posição anatômica possibilita exposição intensa ao sol em comparação ao lábio superior (SARGERAN *et al.*, 2009; SCHUSSEL; PINTO JÚNIOR; MARTINS, 2011; OLIVEIRA ALVES *et al.*, 2014). Clinicamente, essa neoplasia pode exibir várias formas de apresentação, podendo ser uma lesão exofítica, endofítica, úlcero-infiltrativa ou verrucosa (KADEMANI, 2007; ROSEBUSH *et al.*, 2011). O exame físico geralmente revela uma ulceração indolor, crostosa e

com bordas endurecidas, que comumente apresenta menos de 1 cm de diâmetro no momento do diagnóstico (MORSELLI *et al.*, 2007; ROSEBUSH *et al.*, 2011).

A visibilidade de alterações no lábio inferior possibilita o diagnóstico precoce do CCE nessa localização (SALGARELLI *et al.*, 2009), culminando em taxas de sobrevida em 5 anos de 69,6% a 90% (SARGERAN *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ-PASCUAL *et al.*, 2012; OZTURK *et al.*, 2014). Mesmo assim, 6,6% a 26,5% dos casos já apresentam metástases em linfonodos cervicais ao diagnóstico (VUKADINOVIC *et al.*, 2007; SALGARELLI *et al.*, 2009; SARGERAN *et al.*, 2009), determinando, nesses casos, uma diminuição na sobrevida dos pacientes em 5 anos para apenas 25% a 50% (BILKAY *et al.*, 2003; KORNEVS *et al.*, 2005; VUKADINOVIC *et al.*, 2007; SALGARELLI *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ-PASCUAL *et al.*, 2012). Segundo Souza *et al.* (2011), o tamanho do tumor, a metástase em linfonodos regionais, a recorrência da doença e o grau histopatológico de malignidade são os principais fatores relacionados à sobrevida dos pacientes com CCE de lábio inferior.

Há anos, o sistema de estadiamento clínico TNM tem sido o padrão de classificação adotado para caracterizar os tumores, propor a terapia mais adequada e, assim, estimar tanto a resposta clínica quanto a sobrevida dos pacientes (SOBIN; WITTEKIND, 2002; SAWAIR *et al.*, 2003; LOURENÇO *et al.*, 2007; LINDENBLATT *et al.*, 2012). Esse sistema baseia-se na avaliação de três componentes da neoplasia: T – tamanho/ extensão do tumor primário; N – metástase em linfonodos regionais; M – metástases à distância. A adição de números a esses três componentes indica a extensão da doença e a lesão pode ser classificada em T0, T1, T2, T3, T4 | N0, N1, N2, N3 | M0, M1. Após definir as categorias T, N e M, elas podem ser agrupadas em estádios (SOBIN; WITTEKIND, 2002; WITTEKIND *et al.*, 2002).

Contudo, a existência de casos diagnosticados em estádios iniciais, tratados da forma preconizada e que, contudo, evoluem rapidamente ao óbito, não condizendo com a indicação clínica do TNM, tem suscitado a busca por outros fatores prognósticos capazes de complementar esse sistema (COSTA; ARAÚJO JÚNIOR; RAMOS, 2005; LOURENÇO *et al.*, 2007). Assim, os sistemas de gradação histopatológica de malignidade (SGHM) para os CCE orais surgiram com o intuito de fornecer conhecimentos adicionais que pudessem explicar o comportamento biológico discrepante de tumores com características clínicas semelhantes. Esse conjunto de informações contribuiria para uma melhor determinação do prognóstico e sobrevida dos pacientes, por meio do delineamento do tratamento adequado para cada caso (ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA, 1987; LOURENÇO *et al.*, 2007).

Em 1989, Bryne *et al.* sugeriram a realização da gradação histopatológica apenas na área mais invasiva dos CCE orais, processo cujo valor prognóstico foi confirmado

posteriormente em estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisadores (BRYNE *et al.*, 1992). Para Bryne *et al.* (1992), as características morfológicas na interface tumor-hospedeiro, denominada *front* de invasão, podem refletir melhor o prognóstico desses tumores, já que vários eventos moleculares importantes ocorrem nessa região, como perdas e ganhos de moléculas de adesão, secreção de enzimas proteolíticas e angiogênese. Nesse SGHM, são atribuídos escores de 1 a 4 aos seguintes parâmetros histopatológicos: grau de ceratinização, padrão de invasão, pleomorfismo nuclear e infiltrado inflamatório (BRYNE *et al.*, 1992).

O SGHM da Organização Mundial da Saúde (OMS), que tem como base o sistema proposto por Broders (1920), leva em consideração o grau de diferenciação celular em toda a extensão tumoral (CARDESA *et al.*, 2005). De acordo com esse sistema, os CCE orais são classificados em: bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pobremente diferenciados. Lesões bem diferenciadas se assemelham ao epitélio escamoso normal, exibindo maior ceratinização, ao passo que lesões moderadamente diferenciadas exibem pleomorfismo nuclear distinto e atividade mitótica, bem como menor ceratinização. Por sua vez, nos carcinomas pobremente diferenciados, células imaturas predominam, com numerosas mitoses típicas e atípicas, além de mínima ceratinização (CARDESA *et al.*, 2005).

Estudos a respeito do potencial prognóstico dos SGHM propostos por Bryne *et al.* (1992) e pela OMS (CARDESA *et al.*, 2005) em CCE orais são numerosos e têm apresentado resultados conflitantes (KUROKAWA *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2007; BATISTA *et al.*, 2010; CAMISASCA *et al.*, 2011; LINDENBLATT *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2014; SAWAZAKI-CALONE *et al.*, 2015). Em um estudo com 59 casos de CCE de lábio inferior, Santos *et al.* (2014) encontraram associação estatisticamente significativa entre o baixo grau de malignidade dos tumores (BRYNE *et al.*, 1992) e a ausência de metástase em linfonodos regionais ($p = 0,030$) e o estágio clínico inicial ($p = 0,043$), bem como entre o alto grau de malignidade (BRYNE *et al.*, 1992) e o maior tamanho das lesões ($p = 0,040$). Todavia, os autores não observaram associações entre o grau da lesão, analisado pelo sistema proposto pela OMS, e os parâmetros clínicos avaliados ($p > 0,05$).

Recentemente, Sawazaki-Calone *et al.* (2015) avaliaram 113 casos de CCE oral e identificaram associação estatisticamente significativa entre as lesões pobremente diferenciadas, classificadas de acordo com o SGHM proposto pela OMS, e lesões de maior tamanho/ extensão (T3/ T4) ($p = 0,02$). Na análise univariada, a sobrevida relacionada à doença foi significativamente influenciada pelo grau histopatológico de malignidade da lesão ($p = 0,01$). Todavia, o modelo de regressão demonstrou que essa associação era influenciada por outras variáveis, como idade e *status* do linfonodo regional. Assim, a utilização desses SGHM

como indicadores de comportamento biológico em CCE intraorais e de lábio ainda é controverso, o que leva à busca de outros marcadores biológicos que possam auxiliar na identificação de pacientes de alto risco e auxiliar na escolha da melhor modalidade terapêutica. Diversos estudos têm demonstrado a influência das células do microambiente tumoral no crescimento e disseminação do CCE oral (ALBINI; SPORN, 2007; THODE *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2013; FELLER; ALTINI; LEMMER; 2013; FRANÇA *et al.*, 2013; KOONTONGKAEW, 2013). Esse complexo microambiente é composto por diversos tipos celulares, incluindo fibroblastos, miofibroblastos, células endoteliais, pericitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastócitos, linfócitos T e B, células *natural killer* (NK), células gigantes multinucleadas (CGM) e células apresentadoras de antígenos, como as células dendríticas e os macrófagos. Além desses, há os componentes não celulares, incluindo a matriz extracelular, fatores de crescimento, proteases e suas inibidoras, e outras moléculas de sinalização (FIGURA 1) (ALBINI; SPORN, 2007; KOONTONGKAEW, 2013).

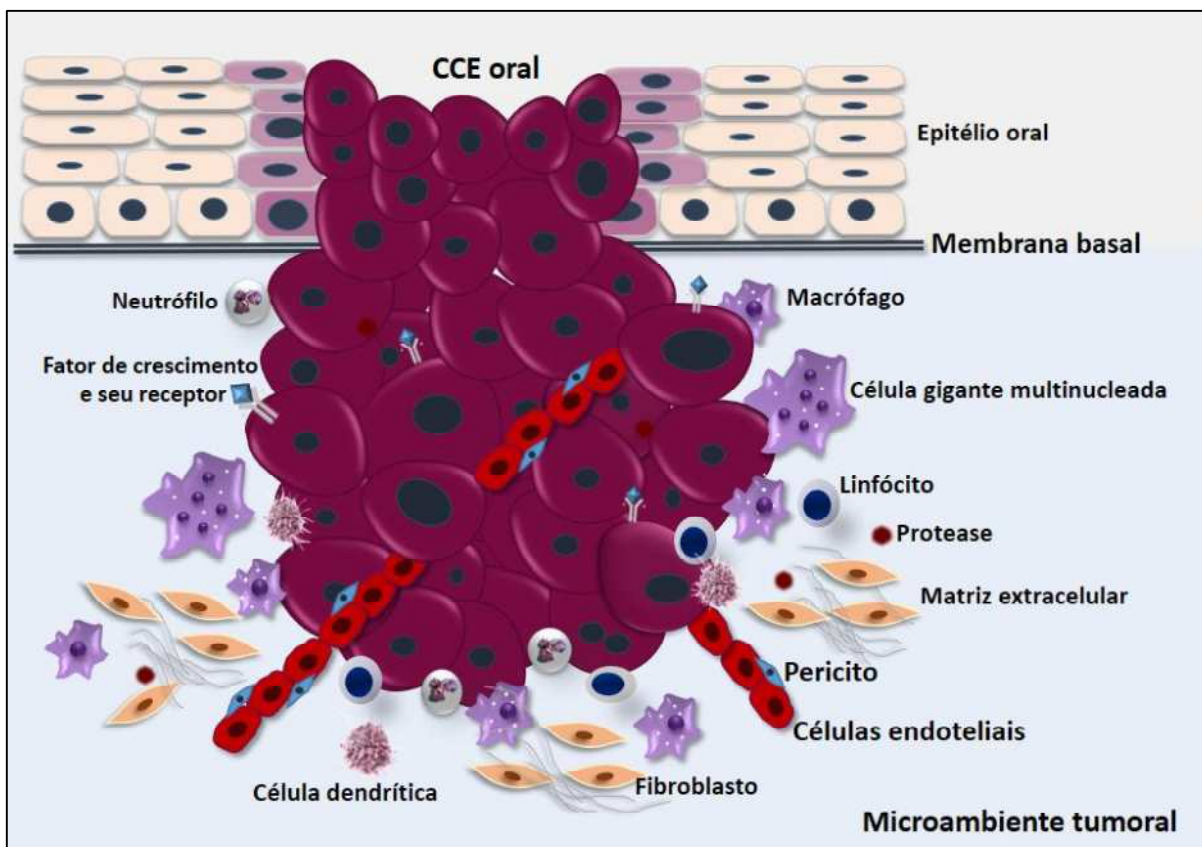


FIGURA 1: Principais componentes do microambiente tumoral do CCE oral.

A infiltração de células inflamatórias nos tumores pode exercer diferentes papéis, ora estimulando uma resposta antitumoral, ora promovendo a tumorigênese e suprimindo a resposta

imune contra o tumor (GRIVENNIKOV; KARIN, 2010; HU *et al.*, 2016). Dentre as diversas células inflamatórias desse microambiente, os macrófagos se destacam como o componente principal e mais abundante em várias neoplasias malignas, incluindo o CCE oral (FUJII *et al.*, 2012; COSTA *et al.*, 2013; FUJITA *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2014; ESSA *et al.*, 2016; HU *et al.*, 2016; WEBER *et al.*, 2016). Essas células pertencem ao sistema mononuclear fagocitário, apresentando imunorreatividade ao anticorpo anti-CD68. Apesar da sua importante plasticidade funcional, dois estados de polarização relativamente distintos têm sido reconhecidos para essas células: macrófagos classicamente ativados (M1) e ativados de forma alternativa (M2) (SICA *et al.*, 2008; LAOUI *et al.*, 2011; WEBER *et al.*, 2016).

Os macrófagos M1 se desenvolvem em resposta a citocinas Th1, como interferon- γ (IFN- γ) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α), e a produtos microbianos. Essas células são caracterizadas pela: produção de interleucina-12 (IL-12) e interleucina-23 (IL-23); produção de intermediários tóxicos, como o óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio e expressiva capacidade de apresentação de antígenos, sendo caracterizados pela alta expressão do antígeno leucocitário humano-DR (HLA-DR) (SICA *et al.*, 2008; LAOUI *et al.*, 2011; ZAKI *et al.*, 2011). Dessa forma, os macrófagos M1 são considerados potentes células efetoras, as quais eliminam micro-organismos e células tumorais e produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias (SICA *et al.*, 2008).

Por outro lado, os macrófagos M2 podem se desenvolver em resposta a diversos estímulos, com destaque para as citocinas Th2, como a interleucina-4 (IL-4) e a interleucina-13 (IL-13) (LAOUI *et al.*, 2011). Essas células apresentam grande capacidade de síntese de interleucina-10 (IL-10), fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), metaloproteinases de matriz (MMP) e moléculas de superfície, como CD204, CD206 e CD163. Além disso, os macrófagos M2, tipicamente, revelam baixa expressão de IL-12 e IL-23. Tais células desempenham funções imunorregulatórias, promovem o reparo e a remodelação tecidual e têm sido implicadas na progressão de diversos tumores (KOMOHARA *et al.*, 2008; SICA *et al.*, 2008; JENSEN *et al.*, 2009; MA *et al.*, 2010; BAAY *et al.*, 2011; HEUSINKVELD; VAN DER BURG, 2011; ESSA *et al.*, 2016).

Além dessa peculiar plasticidade funcional, os macrófagos se destacam pela capacidade de realizar fusão, sob determinadas condições, e formar CGM (MCNALLY; MACEWAN; ANDERSON, 2008; MEDZHITOV, 2008; TABAS, 2010; KAWAI; AKIRA, 2011; LUMENG; SALTIEL, 2011; SISSONS *et al.*, 2012). Ademais, citocinas envolvidas na ativação clássica e alternativa dos macrófagos (IFN- γ , IL-4 e IL-13) também têm sido implicadas na indução desse processo (MÖST; NEUMAYER; DIERICH, 1990; CHENSUE *et al.*, 1992; MCNALLY;

ANDERSON, 1995; DEFIFE *et al.*, 1997; HELMING; GORDON, 2007; HELMING; GORDON, 2009; MCNALLY; ANDERSON, 2011; BINDER *et al.*, 2013).

Inicialmente, para que ocorra a formação de CGM, os macrófagos precisam estar aptos a se fundir. Essa competência é adquirida através da ação de estímulos endógenos e exógenos (HELMING; GORDON, 2009) (FIGURA 2). Dentre os estímulos exógenos, merecem destaque as citocinas Th2 (IL-4 e IL-13) solúveis que agem sobre os macrófagos, levando ao aumento da transcrição de moléculas necessárias para o processo de fusão (HELMING; GORDON, 2009). Após ligarem-se ao receptor de uma cadeia comum, a IL-4 e a IL-13 podem ativar diferentes vias de sinalização, incluindo a ativação do gene transdutor de sinal e ativador de transcrição 6 (STAT6) (FIGURA 2) (MORENO *et al.*, 2007; HELMING; GORDON, 2009).

Por sua vez, esse estado de competência de fusão também é adquirido por meio do contato físico entre os macrófagos, que é potencialmente dependente de agentes quimiotáticos, por meio da secreção da quimiocina CCL2. Em seguida, o receptor de disparo expresso nas células mieloides 2 (TREM-2) reconhece o seu ligante, associa-se com a proteína de ativação DNAX de 12kDa (DAP-12) e leva à sinalização via Syk. Em conjunto, esses mecanismos levarão à transcrição dos genes que codificam DC-STAMP, E-caderina e MMP-9, o que caracteriza o perfil de um macrófago apto à fusão (FIGURA 2) (HELMING; GORDON, 2009).

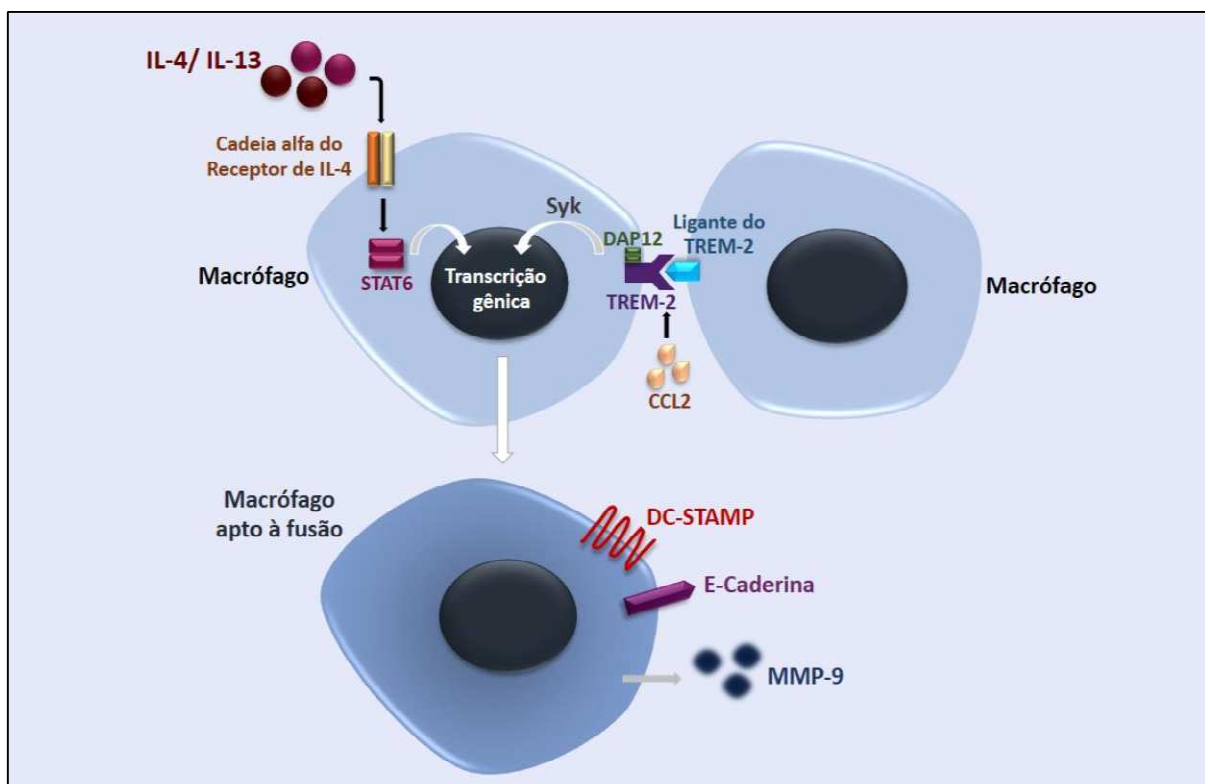


FIGURA 2: Programação de macrófagos para um estado apto à fusão. Adaptação de Helming e Gordon (2009).

A fusão dos macrófagos ocorre como resultado de uma sequência de eventos envolvendo o aumento da expressão de diversas moléculas de adesão (HELMING; GORDON, 2009). Nesse processo, também ocorrerá rearranjos no citoesqueleto mediados por Rac1 e polimerização da actina, além da exposição de fosfatidilserina e reconhecimento de lipídios mediados pelo CD36. Tais eventos promovem rearranjos celulares, fusão entre as membranas citoplasmáticas e consequente formação de CGM (FAIS *et al.*, 1994; KAZAZI *et al.*, 1994; OKADA, 2002; HELMING; GORDON, 2009) (FIGURA 3).

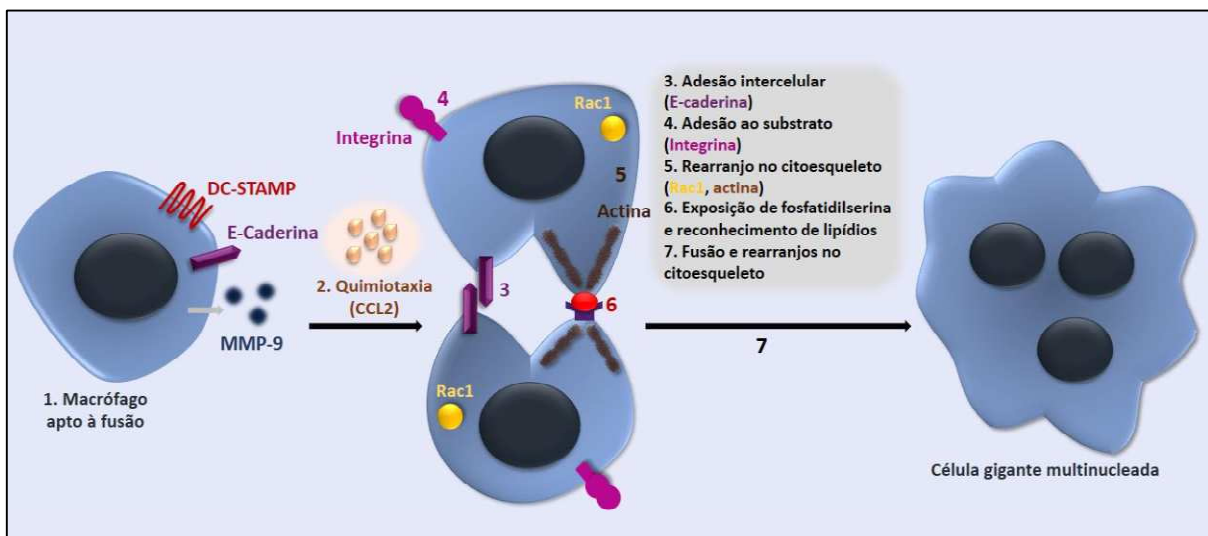


FIGURA 3: Etapas essenciais envolvidas na fusão de macrófagos. 1) Macrófago apto à fusão. 2) Contato entre macrófagos mediado principalmente pela quimiocina CCL2. 3) Adesão intercelular mediada pela E-caderina. 4) Adesão ao substrato através das subunidades $\beta 1$ e $\beta 2$ das integrinas. 5) Rearranjos no citoesqueleto mediadas por Rac1 e polimerização da actina. 6) Exposição de fosfatidilserina e o reconhecimento de lipídios. 7) Fusão entre as membranas citoplasmáticas e formação de CGM, envolvendo novos rearranjos do citoesqueleto. Adaptação de Helming e Gordon (2009).

As CGM foram inicialmente descritas por Langhans (1868), como um constituinte uniforme de lesões tuberculoides. Atualmente, sabe-se que essas células são parte integrante da resposta imune do hospedeiro contra doenças infecciosas crônicas, especialmente em inflamações granulomatosas. Ademais, além de serem comuns em doenças como artrite reumatoide e esquistossomose, há diversos relatos da ocorrência dessas células em neoplasias malignas (ADAMS, 1976; PAPADIMITRIOU; WALTERS, 1979; MCNALLY; MACEWAN; ANDERSON, 2008; SISSONS *et al.*, 2012; JANG *et al.*, 2015).

A reação de CGM tem sido identificada em neoplasias malignas de várias localizações

anatômicas extraósseas, como pele, ovário, próstata, estômago, mama, bexiga, glândulas salivares, pulmão, fígado, útero, rim, vesícula biliar e cavidade oral (ROSAI, 1968; AKATSU *et al.*, 2006; EMANUEL; SHIM; PHELPS, 2007; LAGWINSKI *et al.*, 2007; WOUFF *et al.*, 2009; MC CASH *et al.*, 2010; YOZU; GLENGARRY; AHMED, 2011; WADA *et al.*, 2011; HAYASHI *et al.*, 2013; PATIL; RAO; GANAVI, 2013; ALEMÁN-MEZA *et al.*, 2014; ESSA *et al.*, 2014; DIOSCORIDI; BISOGNI; FRESCHI, 2015; GAO *et al.*, 2015; JANG *et al.*, 2015). Excluindo os sincícios derivados da fusão de células neoplásicas (ROSAI, 1968), estudos têm descrito a presença de CGM em neoplasias malignas ora como uma reação com fenótipo osteoclástico (SHISHIDO-HARA *et al.*, 2010; DIOSCORIDI; BISOGNI; FRESCHI, 2015), ora como uma reação do tipo corpo estranho (BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2005; PATIL; RAO; GANAVI, 2013; ESSA *et al.*, 2014).

O início do debate sobre a reação de CGM em neoplasias malignas é atribuído a Rosai (1968). Os dois casos de carcinoma de pâncreas relatados por esse autor apresentavam CGM que se assemelhavam, morfológicamente, às células dos tumores de células gigantes do tecido ósseo (ROSAI, 1968). Após avaliação ultraestrutural, esse autor verificou que as CGM tinham origem nas células acinares pancreáticas. Outros autores discordam da origem neoplásica das reações de CGM associadas a tumores e sugerem que essas células podem ser oriundas da fusão de monócitos/ macrófagos existentes no microambiente tumoral (OROSZ *et al.*, 1996; SASAKI *et al.*, 1997; AKATSU *et al.*, 2006; PATIL; RAO; GANAVI, 2013; ESSA *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2015; ESSA *et al.*, 2016). Morfológicamente, as CGM apresentam núcleos, de número e forma variáveis, regularmente dispersos no citoplasma e esses não apresentam atipia nuclear (OROSZ, 1996; EMANUEL; SHIM; PHELPS, 2007; MC CASH *et al.*, 2010, SHISHIDO-HARA *et al.*, 2010; WADA *et al.*, 2011; PATIL; RAO; GANAVI, 2013; ESSA *et al.*, 2014).

A natureza das CGM em tumores extraorais tem sido amplamente investigada, principalmente por imunistoquímica. Estudos têm revelado que essas células apresentam origem mesenquimal e são derivadas de células da linhagem macrófágica, com imunorreatividade para o anticorpo anti-CD68 (ATHANOSOU *et al.*, 1989; SHISHIDO-HARA *et al.*, 2010; YANG *et al.*, 2013; COZZOLINO *et al.*, 2014; NIU *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2014; DIOSCORIDI, BISOGNI; FRESCHI, 2015). Athanosou *et al.* (1989) isolaram CGM de carcinoma de mama e avaliaram suas características imunistoquímicas e ultraestruturais, a fim de esclarecer a relação entre as CGM, osteoclastos, células tumorais e outras células do sistema fagocítico mononuclear. Além disso, esses autores investigaram se as CGM apresentavam comportamento similar aos osteoclastos *in vitro*. Após estudo imunistoquímico, foi verificado que as CGM apresentaram imunorreatividade a anticorpos comumente expressos por

osteoclastos (LCA, CD13, CD9 e glicoproteína IIIa) e marcadores macrofágicos (EBM/11 e Y-1/82a). Curiosamente, essas células foram positivas para proteínas que não são expressas pelos osteoclastos (HLA-DR, receptor Fc, CD14, CD16, CD18 e CD11c), sugerindo que as CGM apresentam divergências quanto ao seu imunofenótipo em relação aos osteoclastos. Além disso, sob microscopia eletrônica, observou-se que as CGM isoladas em cultura reabsorveram tecido ósseo.

Ainda nesse contexto, nos dois casos de carcinoma de mama reportados por Shishido-Hara *et al.* (2010), as CGM apresentaram imunorreatividade a marcadores específicos dos osteoclastos (MMP-9, fosfatase ácida resistente ao tartarato [TRAP] e Catepsina K), assim como ao CD68. Além disso, essas células não foram imunorreativas para o anticorpo anti-HLA-DR, sugerindo um baixo potencial de capacidade de apresentação antigênica. Para os autores, essas células representam uma diferenciação pró-tumoral dos macrófagos em resposta a um microambiente tumoral hipervascularizado, característico dos carcinomas de mama. De forma similar, Dioscoridi, Bisogni e Freschi (2015) demonstraram que as CGM em carcinoma hepatocelular apresentam imunorreatividade para marcadores macrofágicos (CD68 e CD10) e fenótipo osteoclástico (receptor ativador do fator nuclear kappa B [RANK]). Além disso, estudos têm sugerido que as CGM em carcinomas de pâncreas são similares às células gigantes benignas dos tumores ósseos e apresentam imunorreatividade para marcadores macrofágicos (CD68 e alfa 1-antiquimotripsina [alfa-1-ATC]) (DECKARD-JANATPOUR *et al.*, 1998; HUR *et al.*, 2011; NJOUMI *et al.*, 2014; GAO *et al.*, 2015), marcador leucocitário (CD45) (JO, 2014) e vimentina (HUR *et al.*, 2011).

Com o objetivo de compreender melhor o papel dessas células no microambiente tumoral, Hatano *et al.* (2014) produziram um modelo xenográfico *in vivo* de tumor formado por linhagens celulares de câncer cervical (HeLa), expressando fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF) (HeLa-M) e ligante do RANK (HeLa-R), contendo CGM. Os autores verificaram que tumores formados pela combinação dessas linhagens celulares e com CGM apresentaram maior tamanho, quando comparados àqueles formados pelas linhagens celulares HeLa, HeLa-M e HeLa-R, de forma isolada. Além disso, foi observada uma maior expressão de fator de crescimento vascular endotelial-C (VEGF-C), bem como maior linfangiogênese e infiltração de macrófagos naqueles tumores contendo CGM. Com base nos resultados desse estudo, os autores sugeriram que a permeabilidade vascular e a quimiotaxia de macrófagos podem ser possíveis mecanismos responsáveis pelo maior crescimento dos tumores, devido à expressão de VEGF-C pelas CGM.

Embora alguns estudos tenham demonstrado uma relação entre a presença de CGM e o

prognóstico em neoplasias malignas, a potencial implicação prognóstica dessa reação nessas lesões ainda permanece assunto de discussão (IMURA *et al.*, 2005; WOUFF *et al.*, 2009; YU *et al.*, 2014; DIOSCORIDI; BISOGNI; FRESCHI, 2015). Deckard-Janatpour *et al.* (1998), após estudo de sobrevida de dois pacientes, sugeriram que carcinomas de pâncreas desdiferenciados com reação de CGM podem apresentar um melhor prognóstico quando comparados aos tumores sem essa reação. Por sua vez, Yu *et al.* (2014) sugeriram que a presença de CGM em CCE de cérvix uterino pode ser um indicador de pior prognóstico, pois em três dos quatro casos existentes na literatura, os pacientes tiveram baixos índices de sobrevida após o estabelecimento da terapia (PANG, 1998; SINGH *et al.*, 2012; YU *et al.*, 2014). Adicionalmente, ao avaliar oito casos de carcinomas de mama com CGM, Jacquet *et al.* (2010) destacaram que casos com muitas células apresentam maiores tamanhos em comparação com aqueles contendo poucas.

Ao avaliarem 172 casos de carcinoma papilar de tireoide, Brooks *et al.* (2009) verificaram a presença de CGM em 100 (58,1%) casos. Foi observada uma relação estatisticamente significativa entre a maior quantidade de CGM (≥ 3 CGM) e extensão extratireoidiana ($p = 0,028$) e maior tamanho dos tumores ($p = 0,0025$). Além disso, casos com maior quantidade de CGM apresentaram maior multifocalidade e maiores taxas de recorrência. Naqueles casos com grandes quantidades dessas células, por imunoistoquímica, os autores verificaram que as CGM eram imunorreativas para CD68 e a grande maioria positiva para CD163 (44/45) e tiroglobulina (34/45), proteína expressa pelas células foliculares. Por sua vez, praticamente todas as CGM foram negativas para marcadores de células epiteliais (AE1/AE3) (44/45) e o fator de transcrição de tireoide 1 (TTF-1) (44/45). Baseado nesses resultados, foi sugerido que a grande quantidade de CGM nessa neoplasia maligna pode estar relacionada a um comportamento biológico mais agressivo. Ademais, os autores sugeriram que as CGM apresentam origem histiocítica/ macrofágica e atuam como coloidófagos.

Em CCE orais, a natureza da reação de CGM permanece pouco compreendida. Ao avaliar 292 casos de CCE intraorais, Brandwein Gensler *et al.* (2005) encontraram reação de CGM do tipo corpo estranho em 21% dos casos. Todavia, os autores não encontraram associações entre a presença desse achado microscópico e os parâmetros clínicos avaliados (recorrência local, metástase regional e sobrevida geral). Após análise imunoistoquímica em casos de CCE oral, Essa *et al.* (2014) evidenciaram que as CGM eram frequentes em estágios mais tardios da degradação das pérolas de ceratina e que essas células eram formadas a partir da fusão de macrófagos M2 (CD204⁺). Recentemente, foi demonstrado que a co-cultura direta de células ZK-1 (linhagens celulares oriundas de CCE de língua humano) e monócitos é capaz de induzir a formação de CGM (ESSA *et al.*, 2016). No contexto dos CCE de lábio inferior, que

possuem uma etiopatogenia e um comportamento biológico relativamente distintos em comparação aos CCE intraorais, até o presente momento, não há estudos sobre uma possível relação da presença das reações de CGM, ou do perfil de polarização desses tipos celulares, com o comportamento biológico dessa neoplasia maligna (*Pubmed Database, Scopus, Web of Science, LILACS, SIGLE* – acesso em 08/07/2016).

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo objetivou avaliar a frequência, a distribuição e o perfil de polarização (M1 – HLA-DR⁺/ M2 – CD163⁺) da reação de CGM, por imunohistoquímica, em casos de CCE de lábio inferior e verificar a associação desse achado microscópico com parâmetros clínico-patológicos (tamanho do tumor primário, metástase linfonodal regional, metástase à distância, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a presença da reação de CGM e quantificar os campos de grande aumento (HPF) (400×) contendo essas células em CCE de lábio inferior;
- Avaliar a associação entre a presença da reação de CGM em CCE de lábio inferior com parâmetros clínicos (tamanho do tumor primário, metástase linfonodal regional, metástase à distância e estágio clínico) e com o grau histopatológico de malignidade das lesões de acordo com os sistemas propostos pela OMS (CARDESA et al., 2005) e por Bryne *et al.* (1992);
- Analisar a associação entre a distribuição (focal/ difusa) da reação de CGM em CCE de lábio inferior e parâmetros clínicos (tamanho do tumor primário, metástase linfonodal regional, metástase à distância e estágio clínico) e com o grau histopatológico de malignidade das lesões de acordo com os sistemas propostos pela OMS (CARDESA et al., 2005) e por Bryne *et al.* (1992);
- Avaliar a imunorreatividade das reações de CGM ao anticorpo anti-CD68 em CCE de lábio inferior;
- Analisar e comparar os percentuais de imunorreatividade das CGM aos anticorpos anti-HLA-DR e anti-CD163 em CCE de lábio inferior.

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi cadastrado na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil), respeitando a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde e submetido à análise de seu conteúdo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Conforme parecer nº 24294813.9.0000.5187 (ANEXO A), seu protocolo foi aprovado.

3.2 TIPO DE ESTUDO

O estudo desenvolvido consistiu em uma pesquisa de caráter observacional, analítico, com corte transversal, caracterizado pela análise da frequência e das características imunoistoquímicas (CD68, CD163 e HLA-DR) da reação de CGM em casos de CCE de lábio inferior, estabelecendo-se relações com parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase em linfonodal regional, metástase à distância e estágio clínico) e grau histopatológico de malignidade dos tumores.

3.3 POPULAÇÃO

A população objeto do presente estudo foi constituída por todos os casos de CCE de lábio inferior, diagnosticados e arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB, no período de Janeiro de 2000 a Setembro de 2015.

3.4 AMOSTRA

A amostra do estudo foi do tipo não-probabilística, por conveniência, constituída por 91 casos de CCE de lábio inferior, todos emblocados em parafina, obtidos do serviço anteriormente citado.

3.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra, apenas os casos de CCE de lábio inferior tratados por excisão cirúrgica, os quais possibilitaram a avaliação do *front* de invasão tumoral. Adicionalmente, só foram incluídos no estudo, os casos cujos prontuários continham informações relativas à localização anatômica da lesão, ao tamanho do tumor, às metástases linfonodais regionais e à distância e ao estágio clínico.

3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da amostra, as lesões de pacientes submetidos previamente à radioterapia ou quimioterapia. Além disso, foram excluídos do estudo os casos com quantidades insuficientes de material biológico para realização dos estudos morfológicos e imunoistoquímicos.

3.5 VARIÁVEIS

As variáveis dependentes e independentes, analisadas no presente estudo, estão listadas no Quadros 1 e 2, respectivamente.

Quadro 1. Elenco de variáveis dependentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Frequência da reação de CGM	Presença ou ausência da reação de CGM	Presente Ausente
Distribuição da reação de CGM	Número de HPF (400×) contendo reação de CGM	Focal Difusa
Reação de CGM HLA-DR ⁺	Marcação citoplasmática e/ ou membranar para HLA-DR em CGM	Percentual de CGM HLA-DR ⁺
Reação de CGM CD163 ⁺	Marcação citoplasmática e/ ou membranar para CD163 em CGM	Percentual de CGM CD163 ⁺

Quadro 2. Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Sexo	Sexo do paciente	Feminino Masculino
Idade	Idade do paciente (em anos)	-
Tamanho do tumor	Tamanho/ extensão do tumor primário	T1 T2 T3 T4a ou T4b
Metástase linfonodal regional	Metástase em linfonodos regionais	N0 N1 N2 N3
Metástase à distância	Presença de metástase à distância	M0 M1
Estádio clínico	Classificação da lesão considerando o tamanho do tumor (T), a metástase regional (N) e a metástase à distância (M)	Estádio 0 Estádio I Estádio II Estádio III Estádio IVa, IVb ou IVc
Grau histopatológico de malignidade proposto pela OMS (CARDESA <i>et al.</i> ,	Classificação histopatológica do tumor considerando o grau de diferenciação celular	Bem diferenciado Moderadamente diferenciado Pobrememente diferenciado

2005)		
Grau histopatológico de malignidade proposto por Bryne <i>et al.</i> (1992)	Classificação histopatológica do tumor considerando o grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório, na área mais invasiva do tumor	Baixo grau de malignidade Alto grau de malignidade

3.6 ESTUDO CLÍNICO

Informações a respeito da localização da lesão, do tamanho do tumor, da presença de metástase em linfonodos regionais e à distância e ao estágio clínico foram coletadas nos prontuários médicos dos pacientes tratados no Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB. Os dados obtidos com esta avaliação foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE A). Para o estadiamento clínico, foram utilizados os parâmetros elencados na sexta edição da Classificação TNM dos Tumores Malignos (SOBIN; WITTEKIND, 2002) os quais são apresentados nos Quadros 3 e 4.

Quadro 3. Sistema de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).

TAMANHO/ EXTENSÃO DO TUMOR PRIMÁRIO (T)	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
T4a	Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, ou pele da face (queixo ou nariz)
T4b	Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigoides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna

ENVOLVIMENTO DE LINFONODO REGIONAL (N)	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão
N2	N2a – Metástase em um único linfonodo homolateral com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão N2b – Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão N2c – Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N3	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão
ENVOLVIMENTO POR METÁSTASES DISTANTES (M)	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Quadro 4. Categorias de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).

ESTÁDIO	CLASSIFICAÇÃO TNM
Estádio 0	Tis N0 M0
Estádio I	T1 N0 M0
Estádio II	T2 N0 M0
Estádio III	T1, T2 N1 M0 T3 N0, N1 M0
Estádio IVA	T1, T2, T3 N2 M0 T4a N0, N1, N2 M0
Estádio IVB	Qualquer T N3 M0 T4b Qualquer N M0
Estádio IVC	Qualquer T Qualquer N M1

3.7 ESTUDO MORFOLÓGICO

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 5µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), dois examinadores previamente treinados realizaram a análise da frequência e distribuição da reação de CGM. Adaptando a metodologia proposta por Brooks *et al.* (2009), alguns critérios histológicos que caracterizam a morfologia das CGM bem como sua associação com as células tumorais foram adotados: as CGM deveriam estar no interior ou adjacente às ilhas/ células neoplásicas. Além disso, essas células deveriam apresentar citoplasma densamente eosinofílico e ter, pelo menos, três núcleos regularmente dispersos no citoplasma.

Para análise da distribuição da reação de CGM, foi adaptada a metodologia utilizada no estudo de Brandwein-Gensler *et al.* (2005). Para isso, foram contabilizados os HPF (400×) em que as CGM estavam presentes. Baseado no valor da mediana da quantidade de HPF contendo CGM duas categorias relacionadas à distribuição foram estabelecidas: focal e difusa. Os dados obtidos com esta avaliação foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE B).

Para análise da gradação histopatológica no *front* de invasão tumoral, foi utilizado o sistema proposto por Bryne *et al.* (1992) (QUADRO 5). Os escores obtidos em cada um dos parâmetros foram somados, obtendo-se o escore final de malignidade do caso. As lesões com escore final menor ou igual a 8 foram classificadas como de baixo grau de malignidade. Por sua vez, os tumores com escore final igual ou superior a 9 foram classificados como de alto grau de malignidade (SILVEIRA *et al.*, 2007). Por fim, os resultados desta avaliação foram anotados em fichas adequadas (APÊNDICE C).

Quadro 5. Sistema de gradação histopatológica de malignidade no *front* de invasão, proposto por Bryne *et al.* (1992).

ASPECTOS MORFOLÓGICOS	ESCORE DE MALIGNIDADE			
	1	2	3	4
Grau de ceratinização	Alto (> 50% das células)	Moderado (20-50% das células)	Baixo (>5<20% das células)	Ausente (0-5% das células)
Pleomorfismo nuclear	Pouco (>75% de células maduras)	Moderado (50 a 75% de células maduras)	Intenso (>25< 50 % de células maduras)	Extremo (0 a 25% de células maduras)
Padrão de invasão	Bordas infiltrativas bem delimitadas	Cordões, bandas e/ ou trabéculas sólidas infiltrativas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (n>15)	Infiltração difusa e pronunciada, em pequenos grupos celulares e/ ou células individuais (n<15)
Infiltrado inflamatório	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

Com base no sistema proposto pela OMS (CARDESA *et al.*, 2005), toda a extensão do tumor foi avaliada e os casos foram classificados em: bem, moderadamente e pobremente diferenciados. De acordo com esse sistema, lesões bem diferenciadas se assemelham ao epitélio escamoso normal, ao passo que lesões moderadamente diferenciadas exibem pleomorfismo nuclear distinto e atividade mitótica, incluindo mitoses atípicas, além de menor ceratinização. Nos carcinomas pobremente diferenciados, células imaturas predominam, com numerosas mitoses típicas e atípicas, além de mínima ceratinização (CARDESA *et al.*, 2005). Os dados obtidos com esta avaliação foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE D).

Destaca-se que, para todos os achados morfológicos e sistemas de gradação histopatológica avaliados, a análise foi realizada sem que os examinadores tivessem conhecimento dos dados clínicos relacionados ao caso. Os casos discordantes foram resolvidos por consenso pelos examinadores.

3.8 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

3.8.1 Método imunoistoquímico

Para o estudo imunoistoquímico, foram incluídos apenas os casos contendo reação de CGM, previamente selecionados na análise morfológica. Dessa forma, a amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro devidamente preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropiltrióxido de silano, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*RevealTM*, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA), utilizando anticorpos monoclonais anti-CD68, anti-CD163 e anti-HLA-DR (QUADRO 6). Como controle positivo para os anticorpos anti-CD163, anti-CD68 e anti-HLA-DR, foram utilizados espécimes de granuloma periapical. O controle negativo consistiu na omissão do anticorpo primário no protocolo descrito abaixo:

⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (10 minutos cada);

⇒ Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:

- Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
- Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
- Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
- Álcool etílico 80°GL (5 minutos);

⇒ Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

⇒ Recuperação antigênica (QUADRO 6);

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

⇒ Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);

- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário (anti-CD68, anti-HLA-DR ou anti-CD163) em solução diluente (*Antibody diluent with background reducing components*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (60 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário conjugado com polímero de dextrano (*Complement*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens rápidas em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4;
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário polimerizado à peroxidase (*HRP conjugate*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+Substrate*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) à temperatura ambiente (7 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (5 minutos);
- ⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);
- ⇒ Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
 - Álcool etílico 80°GL (2 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (2 minutos);
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
 - Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- ⇒ Montagem em resina *PermOUNT*® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

Quadro 6. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
CD68	PG-M1	Dako	1:1500	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 30 min	60 minutos
CD163	10D6	Novocastra	1:150	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 30 min	60 minutos
HLA-DR	TAL. 1B5	Dako	1:800	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 30 min	60 minutos

3.8.2 Análise imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, dois examinadores previamente treinados avaliaram cada espécime à microscopia de luz (*Leica DM 500*, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), a fim de verificar a imunorreatividade das CGM aos anticorpos anti-CD68, anti-HLA-DR e anti-CD163 em toda a extensão tumoral. Inicialmente, foi verificada a imunorreatividade ao anticorpo anti-CD68, a fim de confirmar a natureza monocítica/ macrofágica das CGM.

Sob aumento de 400×, foi realizada a contagem de CGM positivas e negativas para os anticorpos anti-HLA-DR e anti-CD163 em todo o espécime, permitindo a realização do cálculo do percentual de imunorreatividade aos anticorpos para cada caso. Os dados obtidos com esta avaliação foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE E).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com as análises clínicas, morfológicas e imunoistoquímicas foram organizados em um banco de dados informatizado com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA), no qual

foram realizadas as análises estatísticas.

Inicialmente, foi realizada estatística descritiva para caracterização da amostra. Para a análise de possíveis associações entre a presença e a distribuição de CGM e os parâmetros clínico-patológicos (tamanho do tumor primário, envolvimento de linfonodos regionais, envolvimento por metástases distantes, estágio clínico e o grau histopatológico de malignidade dos tumores), foi utilizado o teste do Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, dependendo da distribuição dos casos nas tabelas de contingência.

Possíveis diferenças entre a imunexpressão de HLA-DR e CD163 nas reações de CGM foram avaliadas por meio do teste não paramétrico de Wilcoxon.

Para todos os testes, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4. ARTIGO

4.1 APRESENTAÇÃO

O projeto de pesquisa ora desenvolvido foi apresentado e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da execução desse projeto, um artigo será apresentado nesta dissertação: “*Multinucleated giant cells reaction in lower lip squamous cell carcinomas – a clinical, morphological and immunohistochemical study*”.

O referido artigo será submetido ao periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine* (ISSN: 1600-0714, Fator de impacto: 1.926, Qualis Odontologia A2), cujas normas para submissão de trabalhos se encontram no Anexo B.

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

Multinucleated giant cells reaction in lower lip squamous cell carcinomas – a clinical, morphological and immunohistochemical study

Running title: **Multinucleated giant cells in lower lip carcinoma**

Hellen Bandeira de Pontes Santos¹, Leão Pereira Pinto², Manuel Antonio Gordón-Núñez¹, Pollianna Muniz Alves¹, Cassiano Francisco Weege Nonaka¹

¹Postgraduate Program in Dentistry, State University of Paraíba, Campina Grande, PB, Brazil

²Postgraduate Program in Oral Pathology, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, RN, Brazil

Corresponding author

Cassiano Francisco Weege Nonaka, DDS, PhD

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia – Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Rua Baraúnas, 351 – Bairro Universitário – Campina Grande – PB – Brasil

CEP 58429-500 Phone/ Fax: +55 83 3315-3471

e-mail: cfwnonaka@gmail.com

Abstract

BACKGROUND: Multinucleated giant cells (MGCs) reaction has been identified in several malignancies, but its frequency and significance in lower lip squamous cell carcinomas (SCCs) are not established. This study evaluated the frequency and distribution of MGCs reaction and their association with clinicopathological parameters in 91 lower lip SCCs. The polarization profile of these cells (M1 or M2) was also assessed.

METHODS: The presence and distribution of MGCs reaction in high power fields (400×) were evaluated in hematoxylin–eosin–stained histological sections. Immunohistochemistry was used to confirm the histiocytic nature (CD68) and to verify the polarization profile (M1–HLA-DR⁺ or M2–CD163⁺) of these cells.

RESULTS: Thirty-six (39.6%) cases had MGCs reaction. The occurrence of MGCs reaction in well/moderately differentiated tumors was 3.30 higher than in poorly differentiated tumors (World Health Organization grading system) ($P=0.006$; PR: 3.30; 95% CI: 1.12-9.68). At the invasive front (invasive front grading system), its occurrence in highly/moderately keratinized tumors was 2.03 higher than in tumors with minimal/no keratinization ($P=0.012$; PR: 2.03; 95% CI: 1.11-3.71). No significant association was observed between the presence/distribution of MGCs and the clinical parameters (tumor size, node metastasis, distant metastasis, and clinical stage) ($P>0.05$). All MGCs were positive for CD68 and a predominance of HLA-DR⁺ over CD163⁺ MGCs was observed ($P=0.031$).

CONCLUSIONS: MGCs reaction may be not involved with the tumor progression in lower lip SCCs. In this microenvironment, MGCs reaction tend to exhibit a predominantly M1 phenotype and may represent a foreign body reaction to SCC keratin pearls.

Keywords: lip neoplasms; squamous cell carcinoma; giant cells; neoplasm staging; immunohistochemistry.

Introduction

Reciprocal interactions between tumor and inflammatory cells are capable of promoting tumor progression (1, 2). Among the various inflammatory cells in the tumor microenvironment, the macrophages are the most abundant component in many malignancies, including the oral squamous cell carcinoma (SCC) (3-5). Macrophages can be phenotypically polarized by the microenvironment to create specific M1 or M2 functional programs (1, 5-8).

M1 or classically activated macrophages are induced by Th1 cytokines, such as interferon-gamma (IFN- γ) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) (1, 6). These cells produce high levels of toxic intermediates (nitric oxide and reactive oxygen species), interleukin (IL)-12, IL-23, and human leukocyte antigen (HLA)-DR (1, 6, 7, 9). Thus, M1 macrophages are known to present antigens and to exert antitumoral activity (1, 6). On the other hand, M2 or alternatively activated macrophages can develop in response to Th2 cytokines, such as IL-4 and IL-13, and are associated with high production of IL-10, vascular endothelial growth factor (VEGF), matrix metalloproteinases (MMPs), and CD163 antigen, promoting tumor progression (1, 7, 9).

Th1 and Th2 cytokines can also induce macrophages fusion and their differentiation into multinucleated giant cells (MGCs) (10-12). The presence of MGCs reaction has been reported in various epithelial malignancies in different locations as breast, endometrium, thyroid, and oral cavity (13-18). Several studies have shown that MGCs belong to the monocytic/ histiocytic lineage and represent an element of the host response to the tumor cells (13-15, 17, 18). However, the potential prognostic implication of these cells in cancer is not well established (13).

In intra-oral SCCs, the nature and significance of MGCs reaction are poorly understood. The few studies suggest that they represent a foreign body reaction to the keratinized SCC cells (17, 18) and probably are formed from M2 macrophages (5, 18). In the context of lower lip

SCCs, which have a different pathogenesis and biological behavior when compared to intra-oral SCCs (2, 19), to our knowledge, there are no previous studies evaluating the presence of MCGs reaction and its relationship with tumor progression (Pubmed Database, Scopus, Web of Science, LILACS, SIGLE). Thus, this study evaluated the frequency and distribution of MCGs reaction and their relationship with clinical parameters (tumor size, node metastasis, distant metastasis, and clinical stage) and histopathological grade of malignancy (invasive front grading system and World Health Organization [WHO] grading system) in lower lip SCCs. The polarization profile of these cells (M1 or M2) was also analyzed by immunohistochemistry.

Material and methods

Specimens

Ninety-one cases of lower lip SCCs obtained from the archives of Napoleão Laureano Hospital, Paraíba, Brazil, were selected for this study. Only cases of lower lip SCCs derived from surgical resections, with paraffin blocks containing sufficient material for histopathological analysis, were included in the sample. The tumors of patients who had been submitted to radiotherapy, chemotherapy or any other treatment before surgery were not included. Cases, where data regarding patient gender/ age, tumor size/extent, presence of regional lymph node metastasis and distant metastasis, and clinical stage were incomplete, were also excluded. The parameters listed in the sixth edition of the TNM Classification of Malignant Tumors were used for clinical staging (20). This study was approved by the Institutional Ethics Committee on Research Involving Human Subjects (Protocol 24294813.9.0000.5187).

Morphological analysis

The selected sample fixed in 10% formalin and embedded in paraffin was cut into 5- μ m thick sections and stained with hematoxylin and eosin. Two previously trained examiners, who

were unaware of the clinical data of the cases, analyzed the presence or absence of MGCs reaction in the specimens under a light microscope (*Leica DM500*; Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany). Adapting the methodology proposed by Brooks et al. (2009), some histologic criteria were employed to consider a MGC: to be located within or adjacent to the neoplastic cells, to have glossy dense eosinophilic cytoplasm, and to have at least three regularly scattered nuclei. Quantitative analysis of the MGCs reaction was performed using an adaptation of the methodology proposed by Brandwein-Gensler et al. (16). For this, counting of high power fields (HPFs; 400×) containing MGCs reaction was done. Two categories regarding the distribution of MGCs were established based on the median of HPFs containing these cells: focal and diffuse.

Furthermore, the histopathological grade of malignancy of lower lip SCCs was evaluated using the WHO grading system (21) and the system proposed by Bryne et al. (22). For the system proposed by the WHO, the tumors were analyzed in their entire length and were classified as well-differentiated, moderately differentiated, or poorly differentiated. According to this system, well-differentiated tumors resemble normal squamous epithelium, whereas moderately differentiated tumors exhibit distinct nuclear pleomorphism and mitotic activity, including atypical mitoses, as well as reduced keratinization. In poorly differentiated carcinomas, immature cells predominate, accompanied by numerous typical and atypical mitoses and minimal keratinization.

For the system proposed by Bryne et al. (22), the histopathological grading of malignancy was performed at the invasive front of the tumor. This histopathological grading system attributes scores of 1–4 to the following parameters: degree of keratinization, nuclear pleomorphism, pattern of invasion, and inflammatory infiltrate. Next, the scores were summed to obtain a final score of malignancy for each case. In accordance with Silveira et al. (23), tumors with a final score ≤ 8 were classified as being a low grade of malignancy and those with

a final score ≥ 9 were classified as having a high grade. If the examiners disagreed on the analysis of MGCs reaction or the histopathological grade of malignancy, the slides were reexamined until consensus was reached.

Immunohistochemical analysis

Immunohistochemical stains were performed only on sections of lower lip SCCs with MGCs reaction. In order to confirm the histiocytic nature of these cells, immunohistochemical staining for CD68 (dilution 1:1500; clone PG-M1; Dako, Carpinteria, CA, USA) was performed. In addition, HLA-DR (dilution 1:800; clone TAL.1B5; Dako, Carpinteria, CA, USA) and CD163 (dilution 1:150; clone 10D6; Novocastra Laboratories, Newcastle Upon Tyne, UK) antibodies were used to elucidate the polarization profile (M1 or M2 phenotype, respectively) of MGCs reaction in each case.

For all antibodies, 3- μm thick sections were cut from paraffin-embedded tissue blocks, deparaffinized, and submitted to antigen retrieval with citrate buffer, pH 6.0, at 90°C in a steamer for 60 minutes. Then, the sections were immersed in 3% hydrogen peroxide to block endogenous peroxidase activity. After the incubation with the primary antibodies for 60 minutes, the tissue sections were washed with TRIS buffer and treated with a polymer-based complex (*RevealTM*, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA). Diaminobenzidine was used to visualize peroxidase activity (*Liquid DAB⁺ Substrate*, Dako, Carpinteria, CA, USA), resulting in a brown reaction product. Finally, the sections were counterstained with Mayer's hematoxylin, dehydrated, and coverslipped. Samples of periapical granulomas were used as positive controls for the anti-CD68, anti-HLA-DR, and anti-CD163 antibodies. The negative control consisted in the omission of the primary antibodies. MGCs displaying a brown cytoplasmic and/or membrane staining were considered as being positive, irrespective of the intensity of staining.

The tissue sections were examined in a blind fashion by two observers under a light microscope (*Leica DM500*; Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, Germany). The number of positive and negative MGCs was determined at 400× magnification, permitting the calculation of the percentage of HLA-DR⁺ and CD163⁺ MGCs.

Statistical analysis

The results were analyzed using the IBM SPSS Statistics (version 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Descriptive statistics was used for characterization of the sample. The Chi-square test or Fisher's exact test was used to determine possible associations between the presence/ distribution of MGCs reaction and clinicopathological parameters (tumor size/extent, regional lymph node metastasis, distant metastasis, clinical stage, and histopathological grade of malignancy), when applicable. The non-parametric Wilcoxon signed rank test was used to evaluate possible differences between HLA-DR and CD163 immunoexpressions. For all tests, a value of $P < 0.05$ was considered significant.

Results

Clinical and morphological data

Sixty-seven (73.6%) of the 91 cases of lower lip SCC studied were diagnosed in men and 24 (26.4%) in women, giving a male-to-female ratio of 2.79:1. Patient age ranged from 22 to 97 years, with a mean of 62.75 ± 18.35 years. The majority of cases were classified as T2 (57.1%) and N0 (57.1%). Distant metastasis was identified in only three cases (3.3%). Regarding clinical stage, stage II (35.2%) was the most frequent. Histopathological grade of malignancy proposed by the WHO classified 29 (31.8%) cases as well-differentiated, 41 (45.1%) as moderately differentiated, and 21 (23.1%) as poorly differentiated. Analysis at the invasive tumor front revealed 38 (41.8%) low-grade cases and 53 (58.2%) high-grade cases

(Table 1).

MGCs reaction was observed in 36 (39.6%) of the 91 cases of lower lip SCCs (Table 1). These cells tended to be associated with the SCC keratin pearls and some appeared to be engulfing them (Fig. 1A,B). In the cases with MGCs reaction, the amount of HPFs ranged from 1 to 15 (median: 3.5 HPFs). Cases with ≤ 3 HPFs containing MGCs reaction were classified as a focal distribution and those with ≥ 4 HPFs as a diffuse distribution (Table 1).

The Chi-square test showed no significant association between the presence of MGCs reaction and tumor size/ extent ($P = 0.958$), lymph node status ($P = 0.804$), and clinical stage ($P = 0.443$) (Table 2). Similarly, Fisher's exact test revealed no association between the presence of MGCs reaction and distant metastasis ($P = 0.656$) (Table 2).

Regarding the histopathological grade of malignancy proposed by the WHO, the Fisher's exact test showed a strong association between the absence of MGCs reaction and poorly differentiated tumors ($P = 0.006$). The occurrence of MGCs reaction in well/ moderately differentiated tumors was 3.30 higher than in poorly differentiated tumors (PR: 3.30; 95% CI: 1.12-9.68) (Table 2).

On the other hand, no association between the presence of MGCs reaction and the histopathological grade of malignancy at the invasive front was observed ($P = 0.674$) (Table 2). Association of the single parameters of the histopathological grade of malignancy at the invasive front revealed a significant association between the absence of MGCs reaction and cases with low/ absent keratinization ($P = 0.012$). The occurrence of this microscopic finding in highly/ moderately keratinized tumors at the invasive front tumor was 2.03 higher than in tumors with minimal/ no keratinization (PR: 2.03; 95% CI: 1.11-3.71) (Table 3). However, no association was observed with the other three parameters: pattern of invasion, nuclear pleomorphism, and inflammatory infiltrate ($P > 0.05$) (Table 3).

With respect to the distribution of MGCs reaction, the statistical analysis showed no

significant association between distribution of these cells and the clinicopathological parameters ($P > 0.05$) (Tables 2 and 3).

Immunohistochemical analysis

All cases containing MGCs reaction were submitted to immunohistochemistry. However, because of the small number of MGCs in some cases, these microscopic findings could be identified in only 23 of 36 cases treated with the anti-CD68, anti-HLA-DR, and anti-CD163 antibodies.

All MGCs were CD68⁺ (Fig. 1C,D). With respect to the polarization profile of MGCs reaction, the percentage of the HLA-DR⁺ cells ranged from 20% to 100% (median: 83.9%) (Fig. 1E) while the percentage of CD163⁺ cells ranged from 0% to 100% (median: 75.0%) (Fig. 1F). The non-parametric Wilcoxon signed rank test revealed a predominance of HLA-DR expression in 12 (52.2%) cases, a similar expression of HLA-DR and CD163 in 6 (26.1%) cases, and higher expression of CD163 in 5 (21.7%) cases. The predominant expression of HLA-DR over CD163 in MGCs was statistically significant ($P = 0.031$).

Discussion

Secretion of cytokines by the tumor microenvironment seems to influence the tumor progression, and may also determine the formation of MGCs (5, 15). These cells are an important component of our immune system and have also been identified in several epithelial malignancies (13-18). The current study showed for the first time the frequency, distribution, and immunohistochemical features of MGCs reaction in lower lip SCC tissues in order to provide a better understanding about its clinical significance and phenotype profile.

The clinical importance of MGCs reaction in cancer is not fully established. Its presence in the tumor microenvironment has been related to a better (24) or a worse prognosis (14, 25),

depending on the tumor type. In a study with 172 papillary thyroid carcinomas, Brooks et al. (14) found that tumors with many MGCs (≥ 3 cells) were more likely to have extrathyroidal extension ($P = 0.028$) and larger size ($P = 0.0025$) than cases with rare or none MGCs. Nevertheless, in the current study, both presence and distribution of MGCs reaction were not significantly associated with clinical parameters ($P > 0.05$). Regarding this matter, Brandwein-Gensler et al. (16) evaluated 292 oral SCCs cases and verified no association between MGCs (foreign body reaction) and local recurrence and overall survival. Taken together, it seems that the MGCs reaction in intra-oral and lip SCCs does not have a clinical significance. However, further studies with longer follow-up are necessary to elucidate the real prognostic influence of MGCs on the outcome of lip malignancies.

Investigations indicate that the keratin produced by SCC cells spilled into the stroma provokes a granulomatous inflammation, with the formation of MGCs (17, 26). The keratin is characterized by its resistance to enzymatic digestion and its relative insolubility (27). Thus, mononuclear macrophages could not be efficient in the entire clearance of this material in highly keratinized lesions, leading them to fuse together to form MGCs. We found that the occurrence of MGCs reaction was higher in well and moderately differentiated tumors ($P = 0.006$; PR: 3.30) and in highly/ moderately keratinized lesions at the tumor invasive front ($P = 0.012$; PR: 2.03). Thereby, we suggest that MGCs reaction in lower lip SCCs represents a foreign body reaction to the keratin. In line with our findings, Essa et al. (18) highlighted the infiltration of these cells in the late degradation stage of keratin pearls in well-differentiated oral SCCs.

In accordance with previous investigations (13-15, 17, 18), MGCs showed immunohistochemical evidence of histiocytic derivation (CD68⁺) in all cases. Regarding their polarization, we verified a predominant expression of HLA-DR over CD163 ($P = 0.031$), suggesting that they tend to exhibit a predominantly M1 phenotype. Classically activated or M1

macrophages are generally considered potent effector cells which destroy micro-organisms and tumor cells mostly through high production of toxic substances, phagocytosis, and by inducing T cell activation via antigen presentation (1, 6, 7, 9). Our results indicate that M1 macrophages fuse together to form MGCs with high ability to phagocyte keratin and present antigens, once most HLA-DR⁺ MGCs tended to be located in the vicinity of keratin pearls. These findings reinforce the view that MGCs in lip SCCs are foreign body giant cells.

In a research with 30 cases of well-differentiated oral SCCs, Essa et al. (18) observed that MGCs are CD68⁺/CD204⁺/CD163⁻. Recently, MGCs induced from monocytes in a direct co-culture with ZK-1 cells (derived from human tongue SCC) demonstrated this same immunoprofile (5). According to Essa et al. (5), the absence of CD163 expression in MGCs indicate that they are not fully but partially differentiated to M2 phenotype. In contrast to these findings, the current study revealed the presence of CD163⁺ MGCs in the microenvironment of lower lip SCCs. Moreover, a predominant expression of CD163 over HLA-DR in MGCs was observed in 5 (21.7%) cases of the present sample. Taken together, these findings highlight the possibility of a greater degree of differentiation of MGCs toward M2 phenotype in lower lip SCCs. On the other hand, these apparently contradictory results may reflect the dynamic phenomenon of MGCs polarization in the microenvironment of these tumors.

According to Essa et al. (5), MGCs may help oral SCC cells to grow by scavenging cellular debris and apoptotic cells, as well as degrading extracellular matrix molecules. However, the present results suggest a different scenario in the context of lower lip SCCs. The predominant expression of HLA-DR over CD163 indicate that MGCs reaction in these tumors tend to exhibit an M1 phenotype and, therefore, could exert predominant antitumor activities in the microenvironment of lower lip SCCs. Evaluation of this possible scenario in these tumors requires a comprehensive analysis of macrophage immunomarkers and secretion profile of chemical mediators.

In other malignancies, such as leiomyosarcoma (28) and breast carcinoma (15), MGCs have shown a phenotypic resemblance to osteoclasts in the bone. Gibbons et al. (28) revealed that MGCs in conventional leiomyosarcomas express an osteoclast-like phenotype, being positive for CD68, CD45, tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), and CD51 but not for HLA-DR, CD14, and smooth muscle markers. Osteoclasts are immunophenotypically distinguished from foreign body giant cells by the expression of TRAP and cathepsin K, and the absence of expression of HLA-DR and CD14 (15, 29). In the present study, most MGCs were HLA-DR⁺, suggesting that these cells in lower lip SCC microenvironment do not exhibit an antigenic phenotype of osteoclasts.

In conclusion, the current study showed for the first time that MGCs reaction may be not involved with the tumor progression in lower lip SCCs. In this microenvironment, MGCs reaction tend to exhibit a predominantly M1 phenotype and may represent a foreign body reaction to SCC keratin pearls.

References

1. Laoui D, Movahedi K, Van Overmeire E, et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. *Int J Dev Biol* 2011; **55**: 861-7.
2. França CM, Batista AC, Borra RC, et al. Macrophage migration inhibitory factor and oral cancer. *J Oral Pathol Med* 2013; **42**: 368-73.
3. Costa NL, Valadares MC, Souza PP, et al. Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2013; **49**: 216-23.
4. Fujita Y, Okamoto M, Goda, H et al. Prognostic significance of interleukin-8 and CD163-positive cell-infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma. *PLoS One* 2014; **9**: e110378.

5. Essa AA, Yamazaki M, Maruyama S, et al. Tumour-associated macrophages are recruited and differentiated in the neoplastic stroma of oral squamous cell carcinoma. *Pathology* 2016; **48**: 219-27.
6. Sica A, Larghi P, Mancino A, et al. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol* 2008; **18**: 349-55.
7. Heusinkveld M, Van Der Burg SH. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancers. *J Transl Med* 2011; **9**: 216.
8. Weber M, Iliopoulos C, Moebius P, et al. Prognostic significance of macrophage polarization in early stage oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2016; **52**: 75-84.
9. Ma J, Liu L, Che G, Yu N, Dai F, You Z. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer* 2010; **10**: 112.
10. Möst J, Spötl L, Mayr G, Gasser A, Sarti A, Dierich MP. Formation of multinucleated giant cells in vitro is dependent on the stage of monocyte to macrophage maturation. *Blood* 1997; **89**: 662-71.
11. Helming L, Gordon S. The molecular basis of macrophage fusion. *Immunobiology* 2007; **212**: 785-93.
12. Sissons JR, Peschon JJ, Schmitz F, Suen R, Gilchrist M, Aderem A. Cutting edge: microRNA regulation of macrophage fusion into multinucleated giant cells. *J Immunol* 2012; **189**: 23-7.
13. Imura J, Tomita S, Ono Y, et al. Endometrial adenosquamous carcinoma with osteoclast-like giant cells: immunohistochemistry and histogenesis. *APMIS* 2005; **113**: 140-4.
14. Brooks E, Simmons-Arnold L, Naud S, Evans MF, Elhosseiny A. Multinucleated giant cells' incidence, immune markers, and significance: a study of 172 cases of papillary thyroid carcinoma. *Head Neck Pathol* 2009; **3**: 95-9.

15. Shishido-Hara Y, Kurata A, Fujiwara M, Itoh H, Imoto S, Kamma H. Two cases of breast carcinoma with osteoclastic giant cells: are the osteoclastic giant cells pro-tumoural differentiation of macrophages? *Diagn Pathol* 2010; **5**: 55.
16. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease free and overall survival. *Am J Surg Pathol* 2005; **29**: 167-78.
17. Patil S, Rao RS, Ganavi BS. A foreigner in squamous cell carcinoma! *J Int Oral Health* 2013; **5**: 147-50.
18. Essa AA, Yamazaki M, Maruyama S, et al. Keratin pearl degradation in oral squamous cell carcinoma: reciprocal roles of neutrophils and macrophages. *J Oral Pathol Med* 2014; **43**: 778-84.
19. Ozturk K, Gode S, Erdogan U, Akyildiz S, Apaydin F. Squamous cell carcinoma of the lip: survival analysis with long-term follow-up. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2015; **272**: 3545-50.
20. Sobin LH, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. New Jersey: John Wiley & Sons, 2002: 264.
21. Cardesa A, Gale N, Nadal A, Zidar N. Squamous cell carcinoma. In: BARNES L, EVESON JW, REICHART P, SIDRANSKY D, eds. World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of head and neck tumors. Lyon: IARC Press, 2005; 118–21.
22. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992; **166**: 375-81.

23. Silveira EJ, Godoy GP, Lins RD, et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol* 2007; **15**: 376-83.
24. Deckard-Janatpour K, Kragel S, Teplitz RL, et al. Tumors of the pancreas with osteoclast-like and pleomorphic giant cells: an immunohistochemical and ploidy study. *Arch Pathol Lab Med* 1998; **122**: 266-72.
25. Yu G, Lin C, Wang W, Han Y, Qu G, Zhang T. Squamous cell carcinoma of the uterine cervix associated with osteoclast-like giant cells: A case report and review of the literature. *Oncol Lett* 2014; **8**: 1595-8.
26. Donath K, Laass M, Günzl HJ. The histopathology of different foreign-body reactions in oral soft tissue and bone tissue. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; **420**: 131-7.
27. Safall H, Azar HA. Keratin granulomas in irradiated squamous cell carcinoma of various sites. *Cancer Res* 1966; **26**: 500-8.
28. Gibbons CL, Sun SG, Vlychou M, et al. Osteoclast-like cells in soft tissue leiomyosarcomas. *Virchows Arch* 2010; **456**: 317-23.
29. Maggiani F, Forsyth R, Hogendoorn PC, Krenacs T, Athanasou NA. The immunophenotype of osteoclasts and macrophage polykaryons. *J Clin Pathol* 2011; **64**: 701-5.

Figure legends

Figure 1 Morphological and immunohistochemical features of MGCs in lower lip SCCs. Multiple MGCs in a highly keratinized lower lip SCC (Hematoxylin and eosin stain, 200×) (A). Keratin pearl being engulfed by MGCs (Hematoxylin and eosin stain, 400×) (B). MGCs reaction showing a strong cytoplasmic positivity for CD68 in different stages of keratins pearls degradation (200×) (C and D). Cytoplasmic immunopositivity for HLA-DR (400×) (E) and CD163 (400×) (F) in MGCs intimately associated with neoplastic cells.

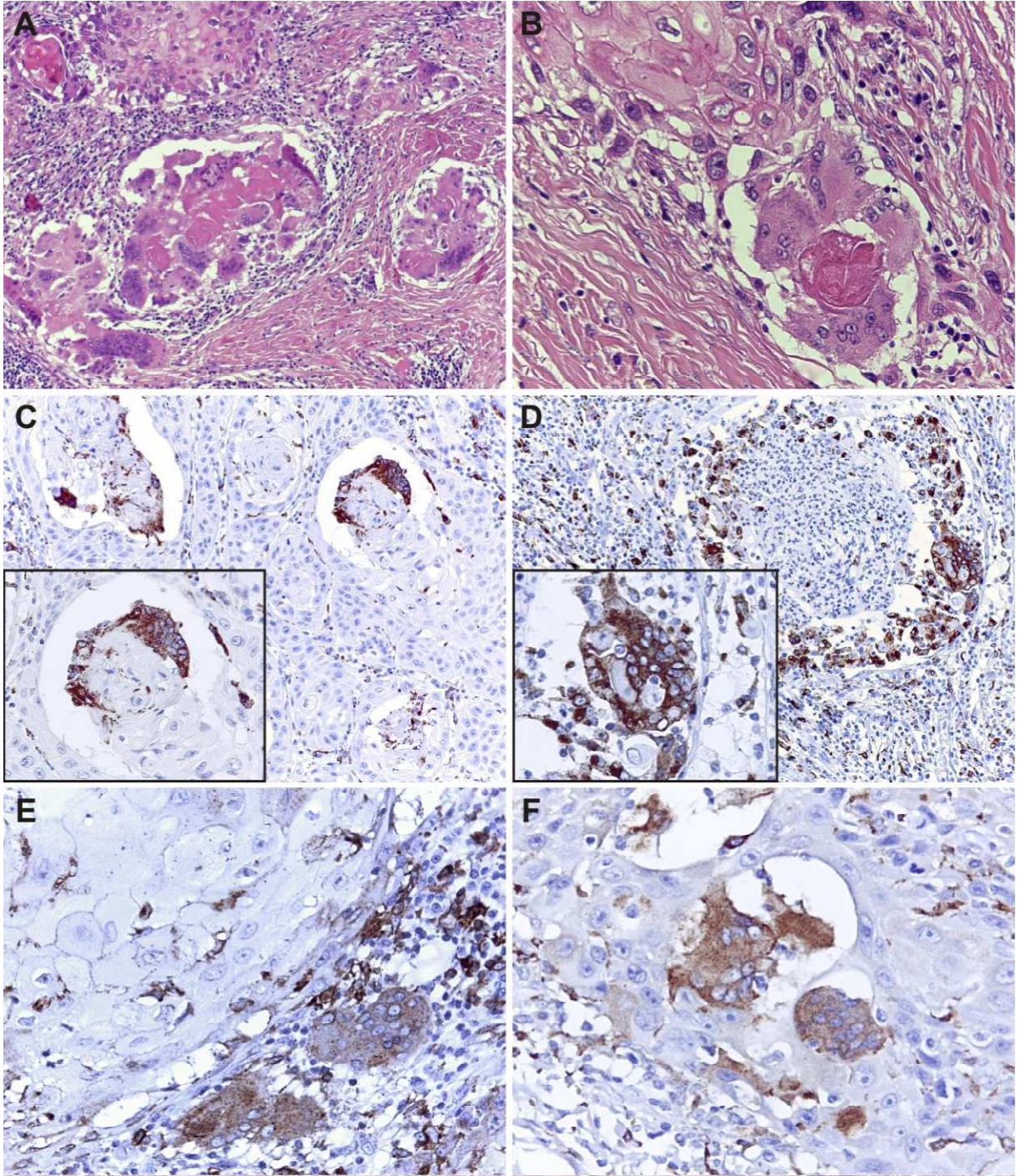


Table 1 Distribution of cases of lower lip SCC according to clinicopathological parameters.

Clinicopathological parameters	n (%)
Gender	
Male	67 (73.6)
Female	24 (26.4)
Tumor	
T1	25 (27.5)
T2	52 (57.1)
T3	9 (9.9)
T4	5 (5.5)
Node	
N0	52 (57.1)
N1	29 (31.9)
N2	8 (8.8)
N3	2 (2.2)
Metastasis	
M0	88 (96.7)
M1	3 (3.3)
Clinical stage	
Stage I	18 (19.8)
Stage II	32 (35.2)
Stage III	26 (28.5)
Stage IV	15 (16.5)
WHO grading system	
Well differentiated	29 (31.8)
Moderately differentiated	41 (45.1)
Poorly differentiated	21 (23.1)
Invasive front grading system	
Low-grade	38 (41.8)
High-grade	53 (58.2)
MGCs reaction	
Present	36 (39.6)
Absent	55 (60.4)
Distribution of MGCs reaction	
Focal (1-3 HPFs)	18 (50.0)
Diffuse (≥ 4 HPFs)	18 (50.0)

SCC, Squamous cell carcinoma; MGCs, Multinucleated giant cells; HPFs, High power fields.

Table 2 Distribution of cases of lower lip SCC according to presence/ distribution of MGCs reaction and clinicopathological parameters.

Clinicopathological parameters	MGCs reaction		P	95% CI	Distribution of MGCs		P	95% CI
	Present n (%)	Absent n (%)			Focal n (%)	Diffuse n (%)		
Tumor size/ extent								
T1	10 (40.0)	15 (60.0)	0.958*	1.01(0.57-1.78)	4 (40.0)	6 (60.0)	0.356**	0.74(0.32-1.71)
T2 –T4	26 (39.4)	40 (60.6)			14 (53.8)	12 (46.2)		
Nodal metastasis								
N0	20 (38.5)	32 (61.5)	0.804*	0.93(0.56-1.56)	8 (40.0)	12 (60.0)	0.180*	0.64(0.33-1.23)
N1 –N3	16 (41.0)	23 (59.0)			10 (62.5)	6 (37.5)		
Distant metastasis								
M0	35 (39.8)	53 (60.2)	0.656**	1.19(0.23-6.03)	17 (48.6)	18 (51.4)	0.500**	0.48(0.34-0.68)
M1	1 (33.3)	2 (66.7)			1 (100.0)	0 (0.0)		
Clinical stage								
I –II	18 (36.0)	32 (64.0)	0.443*	0.82(0.49-1.36)	8 (44.4)	10 (55.6)	0.505*	0.80(0.41-1.55)
III –IV	18 (43.9)	23 (56.1)			10 (55.6)	8 (44.4)		
WHO grading system								
Well/ moderately differentiated	33 (47.1)	37 (52.9)	0.006**	3.30(1.12-9.68)	17 (51.5)	16 (48.5)	0.500**	1.54(0.30-7.92)
Poorly differentiated	3 (14.3)	18 (85.7)			1 (33.3)	2 (66.7)		
Invasive front grading system								
Low-grade	16 (42.1)	22 (57.9)	0.674*	1.11(0.67-1.85)	6 (37.5)	10 (62.5)	0.180*	0.62(0.30-1.29)
High-grade	20 (37.7)	33 (62.3)			12 (60.0)	8 (40.0)		

SCC, Squamous cell carcinoma; MGCs, Multinucleated giant cells; HPFs, High power fields.

*Chi-Square test ** Fisher's exact test

Table 3 Distribution of cases of lower lip SCC according to presence/ distribution of MGCs reaction and single parameters of the histopathological system proposed by Bryne et al. (22).

Parameters	MGCs reaction		P	95% IC	Distribution of MGCs		P	95% CI
	Present n (%)	Absent n (%)			Focal n (%)	Diffuse n (%)		
Degree of keratinization								
High/ Moderate	26 (51.0)	25 (49.0)	0.012*	2.03(1.11-3.71)	11 (42.3)	15 (57.7)	0.132**	0.60(0.33-1.10)
Minimal/ Absent	10 (25.0)	30 (75.0)			7 (70.0)	3 (30.0)		
Nuclear pleomorphism								
Little/ Moderate	25 (43.1)	33 (56.9)	0.359*	1.29(0.73-2.27)	11 (44.0)	14 (56.0)	0.235**	0.69(0.36-1.29)
Abundant/ Extreme	11 (33.3)	22 (66.7)			7 (63.6)	4 (36.4)		
Pattern of invasion								
Pushing borders/ Solid cords, bands and/or strands	11 (32.4)	23 (67.6)	0.277*	0.73(0.41-1.30)	5 (45.5)	6 (54.5)	0.717*	0.87(0.41-1.84)
Small groups	25 (43.9)	32 (56.1)			13 (52.0)	12 (48.0)		
Inflammatory infiltrate								
Marked	22 (41.5)	31 (58.5)	0.653*	1.12(0.66-1.90)	9 (40.9)	13 (59.1)	0.171*	0.63(0.33-1.20)
Moderate/ Slight/ Absent	14 (36.8)	24 (63.2)			9 (64.3)	5 (35.7)		

SCC, Squamous cell carcinoma; MGCs, Multinucleated giant cells; HPFs, High power fields.

*Chi-Square test ** Fisher's exact test

Considerações finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Investigações sobre as reações de CGM em neoplasias malignas epiteliais são escassas e impossibilitam o estabelecimento do real significado, além do impacto dessas células no prognóstico e na modulação das respostas imunes. O presente estudo demonstrou, pela primeira vez, que a reação de CGM provavelmente não está envolvida com a progressão tumoral em CCE de lábio inferior. Contudo, a ocorrência dessas células foi maior em lesões com alto e moderado grau de ceratinização no *front* de invasão tumoral e em lesões bem e moderadamente diferenciadas. Essas observações sugerem que, similarmente aos CCE intra-orais, a presença das CGM no microambiente tumoral das neoplasias de lábio inferior pode representar uma resposta do tipo corpo estranho à ceratina produzida pelas células tumorais.

Em relação ao perfil de polarização das CGM, no contexto dos CCE intra-orais, tem sido sugerido que essas células apresentam um fenótipo M2. Por sua vez, os achados deste estudo sugerem que, no microambiente do CCE de lábio inferior, as CGM apresentam um fenótipo predominantemente M1 (HLA-DR⁺). Como os CCE localizados neste sítio anatômico geralmente apresentam um comportamento biológico menos agressivo quando comparado aos CCE intra-orais, a maior quantidade de CGM com fenótipo M1 pode estar relacionada à modulação de eventos antitumorais no microambiente tumoral dessas neoplasias malignas.

Referências

REFERÊNCIAS

- ADAMS, D. O. The granulomatous inflammatory response. A review. **Am. J. Pathol.**, v. 84, n. 1, p. 164-92, 1976.
- AKATSU, T. *et al.* Gallbladder carcinoma with osteoclast-like giant cells. **J. Gastroenterol.**, v. 41, n. 1, p. 83-7, 2006.
- ALBINI, A.; SPORN, M. B. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, n. 2, p. 139-47, 2007.
- ALEMÁN-MEZA, L. *et al.* Osteoclastic giant cell rich squamous cell carcinoma of the uterine cervix: a case report and review of the literature. **Case Rep. Pathol.**, v. 2014, p. 415328, 2014.
- ANNERTH, G.; BATSAKIS, J. G.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 95, n. 9, p. 229-49, 1987.
- ATHANOSOU, N. A. *et al.* The origin and nature of stromal osteoclast-like multinucleated giant cells in breast carcinoma: implications for tumour osteolysis and macrophage biology. **Br. J. Cancer**, v. 59, n. 4, p. 491-8, 1989.
- BAAY, M. *et al.* Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2011, p. 1-12, 2011.
- BATISTA, A. C. *et al.* Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 109, n. 3, p. e74-9, 2010
- BIASOLI, É. R. *et al.* Lip cancer: a clinicopathological study and treatment outcomes in a 25-year experience. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, 2016. [Epub ahead of print]
- BINDER, F. H. *et al.* Interleukin-4-induced β -catenin regulates the conversion of macrophages to multinucleated giant cells. **Mol. Immunol.**, v. 54, n. 2, p. 157-63, 2013.
- BRANDWEIN-GENSLER, M. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 29, n. 2, p. 167-78, 2005.
- BRODERS, A. C. Squamous-cell epithelioma of the lip: a study of five hundred and thirty-seven cases. **J. Am. Med. Assoc.**, v. 6, p. 656-64, 1920.
- BRYNE, M. *et al.* Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J. Pathol.**, v. 166, n. 4, p. 375-81, 1992.
- _____. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 18, n.8, p. 432-7, 1989.

BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Dis.**, v. 4, n. 2, p. 70-7, 1998.

BILKAY, U. *et al.* Management of lower lip cancer: a retrospective analysis of 118 patients and review of the literature. **Ann. Plast. Surg.**, v. 50, n. 1, p. 43-50, 2003.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 1501p.

BROOKS, E. *et al.* Multinucleated giant cells' incidence, immune markers, and significance: a study of 172 cases of papillary thyroid carcinoma. **Head Neck Pathol.**, v. 3, n. 2, p. 95-9, 2009.

CAMISASCA, D. R. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features in patients with and without recurrence. **ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.**, v. 73, n. 3, p. 170-6, 2011.

CARDESA, A. *et al.* Squamous cell carcinoma. In: Barnes, L. *et al.* **World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of head and neck tumors**. Lyon: IARC Press, 2005, p.118-121.

CARINCI, F. *et al.* Genetic portrait of mild and severe lingual dysplasia. **Oral Oncol.**, v. 41, n. 4, p. 365-74, 2005.

CHENSUE, S. W. *et al.* Role of IL-4 and IFN-gamma in *Schistosoma mansoni* egg-induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution, and relationship to macrophage function. **J. Immunol.**, v. 148, n. 3, p. 900-6, 1992.

COSTA, A. L. L; ARAÚJO JÚNIOR, R. F.; RAMOS, C. C. F. Correlação entre a classificação clínica TNM e as características histológicas de malignidade do carcinoma epidermóide oral. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 71, n. 2, p. 181-7, 2005.

COSTA, N. L. *et al.* Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 49, n. 3, p. 216–23, 2013.

COZZOLINO, I. *et al.* Neuroendocrine differentiation in breast carcinoma with osteoclast-like giant cells. Report of a case and review of the literature. **Int. J. Surg.**, v. 12, n. 2, p. S8-11, 2014.

DANIEL, F. I. *et al.*, Immunohistochemical expression of DNA methyltransferases 1, 3a, and 3b in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, 2016. [Epub ahead of print]

DECKARD-JANATPOUR, K. *et al.* Tumors of the pancreas with osteoclast-like and pleomorphic giant cells: an immunohistochemical and ploidy study. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v. 122, n. 3, p. 266-72, 1998.

DEFIFE, K. M. *et al.* Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression. **J. Immunol.**, v. 158, n. 7, p. 3385-90, 1997.

DIOSCORIDI, L.; BISOGNI, D.; FRESCHI, G. Hepatocellular carcinoma with osteoclast-like giant cells: report of the seventh case in the literature. **Case Rep. Surg.**, v. 2015, p. 836105, 2015.

DOMÍNGUEZ-GORDILLO, A. *et al.* The pattern of lip câncer occurrence over the 1990-2011 period in public hospitals in Madrid, Spain. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 45, n. 3, p. 202-10, 2016.

EMANUEL, P. O.; SHIM, H.; PHELPS, R. G. Poorly differentiated squamous cell carcinoma with osteoclastic giant-cell-like proliferation. **J. Cutan. Pathol.**, v. 34, n. 12, p. 930-3, 2007.

ESSA, A. A. *et al.* Keratin pearl degradation in oral squamous cell carcinoma: reciprocal roles of neutrophils and macrophages. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 43, n. 10, p. 778-84, 2014.

_____. Tumour-associated macrophages are recruited and differentiated in the neoplastic stroma of oral squamous cell carcinoma. **Pathology**, v.48, n. 3, p. 219-27, 2016.

FAIS, S. *et al.* Multinucleated giant cells generation induced by interferon-gamma. Changes in the expression and distribution of the intercellular adhesion molecule-1 during macrophages fusion and multinucleated giant cell formation. **Lab. Invest.**, v. 71, n. 5, p. 737-44, 1994.

FELLER, L.; ALTINI, M.; LEMMER, J. Inflammation in the context of oral cancer. **Oral Oncol.**, v. 49, n. 9, p. 887-92, 2013.

FRANÇA, C. M. *et al.* Macrophage migration inhibitory factor and oral cancer. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 42, n. 5, p. 368-73, 2013.

FUJII, N. *et al.* Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 41, n. 6, p. 444-51, 2012.

FUJITA, Y. *et al.* Prognostic significance of interleukin-8 and CD163-positive cell infiltration in tumor tissues in patients with oral squamous cell carcinoma. **PLoS One**, v. 9, n. 12, p. e110378, 2014.

GAO, H. Q. *et al.* Locally advanced undifferentiated carcinoma with osteoclast-like giant cells of the pancreas. **World J. Gastroenterol.**, v. 21, n. 2, p. 694-8, 2015.

GUTIÉRREZ-PASCUAL, M. *et al.* Squamous cell carcinoma of the lip: a retrospective study of 146 patients. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, v. 26, n. 9, p. 1116-21, 2012.

GRIVENNIKOV, S. I.; KARIN, M. Inflammation and oncogenesis: a vicious connection. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, v. 20, n. 1, p. 65-71, 2010.

HASSON, O. Squamous cell carcinoma of the lower lip. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 66, n. 6, p. 1259-62, 2008.

HATANO, Y. *et al.* Tumor associated osteoclast-like giant cells promote tumor growth and lymphangiogenesis by secreting vascular endothelial growth factor-C. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 446, n. 1, p. 149-54, 2014.

HAYASHI, S. *et al.* Combined large cell neuroendocrine with giant cell carcinoma of the lungs: a case report. **World J. Surg. Oncol.**, v. 11, n. 1, p. 205, 2013.

HE, K. F. *et al.* CD163+ tumor associated macrophages correlated with prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. **Biomed. Res. Int.**, v. 2014, p. 838632, 2014.

HELMING, L.; GORDON, S. Macrophage fusion induced by IL-4 alternative activation is a multistage process involving multiple target molecules. **Eur. J. Immunol.**, v. 37, n. 1, p. 33-42, 2007.

_____. The molecular basis of macrophage fusion. **Immunobiology**, v. 212, n. 9-10, p. 785-93, 2009.

HEUSINKVELD, M.; VAN DER BURG, S. H. Identification and manipulation of tumor associated macrophages in human cancer. **J. Transl. Med.**, v. 9, p. 216, 2011.

HU, Y. *et al.* Tumor-associated macrophages correlate with the clinicopathological features and poor outcomes via inducing epithelial to mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. **J. Exp. Clin. Cancer Res.**, v. 35, p. 12, 2016.

HUR, Y. H. *et al.* Undifferentiated carcinoma of the pancreas with steoclast-like giant cells. **J. Korean Surg. Soc.**, v. 81, n. 2, p. 146-50, 2011.

IMURA, J. *et al.* Endometrial adenosquamous carcinoma with osteoclast-like giant cells: immunohistochemistry and histogenesis. **APMIS**, v. 113, n. 2, p. 140-4, 2005.

JACQUET, S. F. *et al.* Fine-needle aspiration cytopathology--an accurate diagnostic modality in mammary carcinoma with osteoclast-like giant cells: a study of 8 consecutive cases. **Cancer Cytopathol.**, v. 118, n. 6, p. 468-73, 2010.

JANG, K. T. *et al.* Clinicopathologic characteristics of 29 invasive carcinomas arising in 178 pancreatic mucinous cystic neoplasms with ovarian-type stroma: implications for management and prognosis. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 39, n. 2, p. 179-82, 2015.

JENSEN, T. O. *et al.* Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. **J. Clin. Oncol.**, v. 27, n. 20, p. 3330-7, 2009.

JO, S. Huge undifferentiated carcinoma of the pancreas with osteoclast-like giant cells. **World J. Gastroenterol.**, v. 20, n. 10, p. 2725-30, 2014.

KADEMANI, D. Oral cancer. **Mayo Clin. Proc.**, v. 82, n. 7, p. 878-87, 2007.

KAZAZI, F. *et al.* Interleukin 4 and human immunodeficiency virus stimulate LFA-1-ICAM-1-mediated aggregation of monocytes and subsequent giant cell formation. **J. Gen. Virol.**, v. 75, n. Pt 10, p. 2795-802, 1994.

KAWAI, T.; AKIRA, S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. **Immunity**, v. 34, n. 5, p. 637-50, 2011.

KOMOHARA, Y. *et al.* Possible involvement of the M2 anti-inflammatory macrophage phenotype in growth of human gliomas. **J. Pathol.**, v. 216, n. 1, p. 15-24, 2008.

KOONTONGKAEW, S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. **J. Cancer**, v. 4, n. 1, p. 66-83, 2013.

KORNEVS, E. *et al.* 5-year experience with lower lip cancer. **Stomatologija**, v. 7, n. 3, p. 95-8, 2005.

KUMAR, V. *et al.* **Robbins & Cotran – Bases Patológicas das Doenças**. 8 ed. São Paulo: Elsevier, 2010. 1480p.

KUROKAWA, H. *et al.* The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 34, n. 6, p. 329-33, 2005.

LAGWINSKI, N. *et al.* Squamous cell carcinoma of the bladder: a clinicopathologic analysis of 45 cases. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 31, n. 12, p. 1777-87, 2007.

LANGHANS, T. Ueber Riesenzellen mit wandständigen Kernen in Tuberkeln und die fibrose Form des Tuberkels. **Virchows Arch. Patol. Anat.**, v. 42, n. 382-404, 1868.

LAOUI, D. *et al.* Tumor-associated macrophages in breast cancer: distinct subsets, distinct functions. **Int. J. Dev. Biol.**, v. 55, n. 7-9, p. 861-7, 2011.

LINDENBLATT, R. C. *et al.* Oral squamous cell carcinoma grading systems – analysis of the best survival predictor. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 41, n. 1, p. 34-9, 2012.

LOURENÇO, S. Q. C. *et al.* Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: revisão de sistemas propostos. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, n. 3, p. 325-33, 2007.

LUMENG, C. N.; SALTIEL, A.R. Inflammatory links between obesity and metabolic disease. **J. Clin. Invest.**, v. 121, n. 6, p. 2111-7, 2011.

MA, J. *et al.* The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. **BMC Cancer**, v. 10, p. 112, 2010.

MARUCCIA, M. *et al.* Lip cancer: a 10-year retrospective epidemiological study. **Anticancer Res.**, v. 32, n. 4, p. 1543-6, 2012.

MC CASH, S. I. *et al.* Undifferentiated carcinoma of the renal pelvis with osteoclast-like giant cells: a report of two cases. **APMIS**, v. 118, n. 5, p. 407-12, 2010.

MCNALLY A. K; ANDERSON, J. M. Beta1 and beta2 integrins mediate adhesion during macrophage fusion and multinucleated foreign body giant cell formation. **Am. J. Pathol.**, v. 160, n. 2, p. 621-30, 2002.

_____. Foreign body-type multinucleated giant cells induced by interleukin-4 express select lymphocyte co-stimulatory molecules and are phenotypically distinct from osteoclasts and dendritic cells. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 91, n. 3, p. 673-81, 2011.

_____. Interleukin-4 induces foreign body giant cells from human monocytes/macrophages. Differential lymphokine regulation of macrophage fusion leads to morphological variants of multinucleated giant cells. **Am. J. Pathol.**, v. 147, n. 5, p. 1487-99, 1995.

MCNALLY, A. K.; MACEWAN, S. R.; ANDERSON, J. M. Foreign body-type multinucleated giant cell formation requires protein kinase C beta, delta, and zeta. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 84, n. 1, p. 37-45, 2008.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n; 7203, p. 428-35, 2008.

MORENO, J. L. *et al.* IL-4 promotes the formation of multinucleated giant cells from macrophage precursors by a STAT6-dependent, homotypic mechanism: contribution of E-cadherin. **J. Leukoc. Biol.**, v. 82, n. 6, p. 1542-53, 2007.

MORSELLI, P. *et al.* Clinical parameters in T1N0M0 lower lip squamous cell carcinoma. **J. Craniof. Surg.**, v. 18, n. 5, p. 1078-82, 2007.

MÖST, J.; NEUMAYER, H.P.; DIERICH, M.P. Cytokine-induced generation of multinucleated giant cells in vitro requires interferon-gamma and expression of LFA-1. **Eur. J. Immunol.**, v. 20, n. 8, p. 1661-7, 1990.

NIU, Y. *et al.* Breast carcinoma with osteoclastic giant cells: case report and review of the literature. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 7, n. 4, p. 1788-91, 2014.

NJOUMI, N. *et al.* Undifferentiated pancreatic carcinoma with osteoclast-like giant cells: a case report. **J. Gastrointest. Cancer**, v. 45, n. 1, p. 96-8, 2014.

OKADA, Y. *et al.* Cell-to-cell adhesion via intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte function-associated antigen-1 pathway is involved in 1alpha,25(OH)2D3, PTH and IL-1alpha-induced osteoclast differentiation and bone resorption. **Endocr. J.**, v. 49, n. 4, p. 483-95, 2002.

OLIVEIRA ALVES, M. G. *et al.* Study of MDM2 and SUMO-1 expression in actinic cheilitis and lip cancer. **Arch. Dermatol. Res.**, v. 306, n. 9, p. 837-41, 2014.

OROSZ, Z.; TÓTH, E.; VISKI, A. Osteoclastoma-like giant cell tumor of the lung. **Pathol. Oncol. Res.**, v. 2, n. 1-2, p. 84-8, 1996.

OZTURK, K. *et al.* Squamous cell carcinoma of the lip: survival analysis with long-term follow-up. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 272, n. 11, p. 3545-50, 2014.

PANG, L.C. Sarcomatoid squamous cell carcinoma of the uterine cervix with osteoclast-like giant cells: report of two cases. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 17, n. 2, p. 174-7, 1998.

PAPADIMITRIOU, J.M.; WALTERS, M.N. Macrophage polykarya. **CRC Crit. Rev. Toxicol.**, v. 6, n. 3, p. 211-55, 1979.

PANG, L.C. Sarcomatoid squamous cell carcinoma of the uterine cervix with osteoclast-like giant cells: report of two cases. **Int. J. Gynecol. Pathol.**, v. 17, n. 2, p. 174-7, 1998.

PATIL, S.; RAO, R.S.; GANAVI, B.S. A foreigner in squamous cell carcinoma! **J. Int. Oral Health**, v. 5, n. 5, p. 147-50, 2013.

RENA, W. *et al.* Surgical management of squamous cell carcinoma of the lower lip: an experience of 109 cases. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 19, n. 4, p. e398-402, 2014.

RIO, E. *et al.* Interstitial brachytherapy for lower lip carcinoma: global assessment in a retrospective study of 89 cases. **Head Neck**, v. 35, n. 3, p. 350-3, 2013.

ROSAI, J. Carcinoma of pancreas simulating giant cell tumor of bone. Electron microscopic evidence of its acinar origin. **Cancer**, v. 22, n. 2, p. 333-44, 1968.

ROSEBUSH, M.S. *et al.* Oral cancer: enduring characteristics and emerging trends. **J. Tenn. Dent. Assoc.**, v. 91, n. 2, p. 24-7, 2011.

SALGARELLI, A.C. *et al.* Surgical treatment of lip cancer: our experience with 106 cases. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 67, n. 4, p. 840-5, 2009.

SANTOS, H.B. *et al.* Histopathological grading systems and their relationship with clinical parameters in lower lip squamous cell carcinoma. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 43, n. 5, p. 539-45, 2014.

SARGERAN, K. *et al.* Survival after lip cancer diagnosis. **J. Craniofac. Surg.**, v. 20, n. 1, p. 248-52, 2009.

SASAKI, A. *et al.* Sarcomatoid hepatocellular carcinoma with osteoclast-like giant cells: case report and immunohistochemical observations. **Pathol. Int.**, v. 47, n. 5, p. 318-24, 1997.

SAWAZAKI-CALONE, I. *et al.* The prognostic value of histopathological grading systems in oral squamous cell carcinomas. **Oral Dis.**, v. 21, n. 6, p. 755-61, 2015.

SAWAIR, F. A. *et al.* Invasive front grading: reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 32, n. 1, p. 1-9, 2003.

SCHUSSEL, J. L.; PINTO JÚNIOR, D. S.; MARTINS, M. T. Altered β -catenin expression related to cancer progression on actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. **Ann. Diagn. Pathol.**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2011.

SCULLY, C.; BAGAN, J. V. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. **Oral Dis.**, v. 15, n. 6, p. 388-99, 2009.

- SHISHIDO-HARA, Y. et al. Two cases of breast carcinoma with osteoclast giant cells: are the osteoclast giant cells pro-tumoural differentiation of macrophages? **Diagn. Pathol.**, v. 5, p. 55, 2010.
- SICA, A. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Semin. Cancer Biol.**, v. 18, n. 5, p. 349-55, 2008.
- SILVEIRA, E.J.D. et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of the squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. **Int. J. Surg. Pathol.**, v. 15, n. 4, p. 376-83, 2007.
- SINGH, M. et al. Osteoclastic giant cell rich carcinoma cervix: a rare entity. **J. Obstet. Gynaecol.**, v. 32, n. 5, p. 499-501, 2012.
- SISSONS, J. R. et al. Cutting edge: microRNA regulation of macrophage fusion into multinucleated giant cells. **J. Immunol.**, v. 189, n. 1, p. 23-7, 2012.
- SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumors**. 6th ed., New Jersey: John Wiley & Sons, 2002. 264p.
- SOUZA, R. L. et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 16, n. 6, p. e757-62, 2011.
- TABAS, I. Macrophage death and defective inflammation resolution in atherosclerosis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 10, n. 1, p. 36-46, 2010.
- THODE, C. et al. Significance of myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 40, n. 3, p. 201-7, 2011.
- VANDERLEI, J. P. et al. Management of neck metastases in T2N0 lip squamous cell carcinoma. **Am. J. Otolaryngol.**, v. 34, n. 2, p. 103-6, 2013.
- VUKADINOVIC, M. et al. Surgical management of squamous cell carcinoma of the lip: analysis of a 10-year experience in 223 patients. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 65, n. 4, p. 675-90, 2007.
- WADA, T. et al. A male case of an undifferentiated carcinoma with osteoclast-like giant cells originating in an indeterminate mucin-producing cystic neoplasm of the pancreas. A case report and review of the literature. **World J. Surg. Oncol.**, v. 9, p. 100, 2011.
- WANG, S. et al. Expression of CD163, interleukin-10, and interferon-gamma in oral squamous cell carcinoma: mutual relationships and prognostic implications. **Eur. J. Oral Sci.**, p. 122, n. 3, p. 202-9, 2014.
- WEATHERSPOON, D. J. et al. Oral cavity and oropharyngeal cancer incidence trends and disparities in the United States: 2000-2010. **Cancer Epidemiol.**, v. 39, n. 4, p. 497-504, 2015.
- WEBER, M. et al. Prognostic significance of macrophage polarization in early stage oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.**, v. 52, p. 75-84, 2016.

WITTEKIND, C. et al. TNM residual tumor classification revisited. **Cancer**, v. 94, p. 2511-6, 2002.

WOOFF, J. *et al.* Osteoclast-like giant cell reaction associated with cutaneous squamous cell carcinoma: a report of 2 cases and review of the literature. **Am. J. Dermatopathol.**, v. 31, n. 3, p. 282-7, 2009.

YANG, Y. L. *et al.* Invasive ductal carcinoma with osteoclastic giant cells of breast: clinicopathologic characteristics. **Breast J.**, v. 19, n. 3, p. 329-30, 2013.

YOZU, M.; GLENGARRY, J.; AHMED, S. S. Cutaneous squamous cell carcinoma associated with proliferation of osteoclast-like giant cells. **J. Pak. Med. Assoc.**, v. 61, n. 9, p. 922-5, 2011.

YU, G. *et al.* Squamous cell carcinoma of the uterine cervix associated with osteoclast-like giant cells: A case report and review of the literature. **Oncol. Lett.**, v. 8, n. 4, p. 1595-1598, 2014.

ZAKI, M. A. A. *et al.* Prognostic implication of types of tumor-associated macrophages in Hodgkin lymphoma. **Virchows Arch.**, v. 459, n. 4, p. 361-6, 2011.

ZHOU, S. *et al.* Invasive breast carcinomas of no special type with osteoclast-like cells frequently have a luminal phenotype. **Virchows Arch.**, v. 464, n. 6, p. 681-8, 2014.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UEPB.

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS – CEP/UEPB
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
 PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Prof.ª Dra. Dornília Pedrosa de Araújo
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DO RELATOR

Número do Protocolo: 24294813.9.0000.5187

Data da 1ª relatoria PARECER DO AVALIADOR: 05/02/2014

Pesquisador(a) Responsável: CASSIANO FRANCISCO WEEGE NONAKA

Situação do parecer: Aprovado

Apresentação do Projeto: O projeto é intitulado: ***“ESTUDOS MORFOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO DAS REAÇÕES DE CÉLULAS GIGANTES SEMELHANTES A OSTEOCLASTOS EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS”***. O presente estudo se propõe a avaliar a frequência das reações de células gigantes semelhante a osteoclastos (CGSO), bem como suas características imunoistoquímicas (CD68, CD163 e HLA-DR), em uma série de casos de carcinomas de células escamosas orais, e relacioná-las com parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase em linfonodos regionais, metástase à distância e estágio clínico) e grau histopatológico de malignidade dos tumores. A amostra será constituída por 70 casos de carcinoma de células escamosas oral (35 destes localizados em lábio inferior e 35 oriundos de sítios intraorais) com metástase linfonodal regional e 70 casos sem metástase (35 localizados em lábio inferior e 35 localizados em sítios intraorais). Informações a respeito da presença de metástase linfonodal regional e do estadiamento clínico (TNM) serão coletadas nos prontuários médicos dos pacientes. Para o estudo morfológico, serão realizados cortes com 5µm de espessura no material biológico emblocado em parafina, os quais serão estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz, dois examinadores previamente treinados realizarão a análise das reações de CGSO, considerando a presença/ausência, localização (*front* de invasão/ cório tumoral) e distribuição (focal/ difusa) desses tipos celulares. Além disso, será determinado o grau histopatológico de malignidade das lesões, utilizando os sistemas propostos por Bryne (1998) e pela OMS (CARDESA et al., 2005). Para avaliação do perfil imunoistoquímico das reações de CGSO, serão utilizados os anticorpos anti-CD163, anti-CD68 e anti-HLA-DR, em sistema de dupla-marcação. Em sequência, em 5 campos de maior imunoreatividade aos anticorpos, serão quantificadas as células positivas, estabelecendo-se as médias de CGSO com perfil M1 (CD68/HLA-DR) e M2 (CD68/CD163). Possíveis associações entre os achados morfológicos, os parâmetros clínicos e os graus histopatológicos de malignidade serão avaliadas por meio do teste do Qui-quadrado ou do teste exato de Fisher. Após a análise da distribuição de dados, as comparações das quantidades de CGSO M1 e M2, de acordo com os parâmetros clínicos e histopatológicos, serão realizadas por testes paramétricos (t de Student e Anova ONE-Way) ou não paramétricos (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis). O nível de significância será estabelecido em 5% ($p < 0,05$). Espera-se encontrar associação da grande quantidade e do perfil imunoistoquímico da reação de CGSO M1, nos carcinomas de células escamosas orais, com o pequeno tamanho dos tumores, com a ausência de metástase em linfonodos regionais e à distância e com o estadiamento da doença em estágios iniciais. Com este trabalho, pretende-se contribuir para o esclarecimento da natureza das reações de CGSO nos carcinomas de células escamosas orais e verificar uma possível relação das mesmas com o comportamento biológico dos tumores.

Objetivo da Pesquisa: Tem como Objetivo Geral: avaliar a frequência das reações de CGSO, bem como suas características imunoistoquímicas (CD68, CD163 e HLA-DR), em uma série de casos de carcinomas de células escamosas orais, com o intuito de verificar uma possível relação destas reações com o comportamento biológico do tumor e objetivos específicos: 1- Relacionar a presença das reações de CGSO com parâmetros clínicos (tamanho do tumor primário, envolvimento de linfonodos regionais, envolvimento por metástases distantes e estágio clínico); 2 - Relacionar a presença das reações de CGSO com o grau histopatológico de malignidade dos carcinomas de células escamosas orais; 3 - Relacionar o perfil imunoistoquímico das CGSO, por meio da imunorreatividade aos anticorpos anti-CD68, anti-CD163 e anti-HLA-DR, com parâmetros clínicos (tamanho do tumor primário, envolvimento de linfonodos regionais, envolvimento por metástases distantes e estágio clínico); 4 - Relacionar o perfil imunoistoquímico das CGSO, por meio da imunorreatividade aos anticorpos anti-CD68, anti-CD163 e anti-HLA-DR, com o grau histopatológico de malignidade dos carcinomas de células escamosas orais.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: **Riscos:** Não existem riscos inerentes a esta pesquisa, uma vez que a coleta de dados será em fichas clínicas e utilizará lâminas histológicas e espécimes biológicos mantidos em arquivo, os riscos potenciais implicados na participação nesta pesquisa não estão ao alcance de percepções.

Benefícios: contribuir para a identificação de possíveis indicadores de agressividade tumoral em carcinomas de células escamosas orais.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: O estudo encontra-se com uma fundamentação teórica estruturada atendendo as exigências protocolares do CEP-UEPB mediante a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde e RESOLUÇÃO/UEPB/CONSEPE/10/2001 que rege e disciplina este CEP.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória e Parecer do Avaliador: Encontram-se anexados os termos de autorização necessários para o estudo. Diante do exposto, somos pela aprovação do referido projeto. Salvo melhor juízo.

Recomendações: Atende a todas as exigências protocolares do CEP mediante Avaliador e Colegiado. Diante do exposto, não necessita de recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações: O presente estudo encontra-se sem pendências, devendo o mesmo prosseguir com a execução na íntegra de seu cronograma de atividades.

Situação do parecer: Aprovado

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBÁ/
PRO-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA/
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Prof.ª Dra. Domilcia Pedrosa de Araújo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B – Normas para submissão de trabalhos no periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine*.

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance

Useful Websites: Submission Site, Articles published in *Journal of Oral Pathology & Medicine*, Author Services, Wiley Blackwell Publishing's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

1. GENERAL

Journal of Oral Pathology & Medicine publishes manuscripts of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology. Review papers on topical and relevant subjects will receive a high priority and articles requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as brief reports not exceeding three printed pages. All submitted manuscripts falling within the overall scope of the Journal will be assessed by suitably qualified reviewers, but manuscripts in an incorrect format will be returned to the author without review.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in *Journal of Oral Pathology & Medicine*. Authors are encouraged to visit Wiley Blackwell Publishing Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

2. ETHICAL GUIDELINES

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors.

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, and drafting the article or revising it critically for important intellectual content.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

Images of, or Information about, Identifiable Individuals: It is the author's responsibility to obtain consent from patients and other individuals for use of information, images, audio files,

interview transcripts, and video clips from which they may be identified. To ensure we have the rights we require please provide a signed consent form in all instances. Consent Form Template.

- If the person is a minor, consent must be obtained from the child's parents or guardians.
- If the person is dead, we consider it essential and ethical that you obtain consent for use from the next of kin. If this is impractical you need to balance the need to use the photo against the risk of causing offence. In all cases ensure you obscure the identity of the deceased.
- If using older material, or for material obtained in the field, for which signed release forms are, for practical purposes, unobtainable, you will need to confirm in writing that the material in question was obtained with the person's understanding that it might be published.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 Conflict of Interest

All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest for generally accepted definitions on conflict of interest? Please enclose this information under the heading 'Conflict of Interest Statement'.

2.5 Appeal of Decision

Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by emailing the editor with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

2.6 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.7 Copyright Assignment

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author

Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and

visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

2.8 OnlineOpen

Journal of Oral Pathology & Medicine offers authors the opportunity to publish their paper OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp. Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review

process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. For further instructions, please contact Editorial Assistant Gill Smith at JOPM.office@editorialoffice.co.uk

3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site:<http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>.
- Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.
- If you are registering as new user.
 - After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.
- If you are registered as user, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre'.

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, acknowledgements and conflict of interest statement, tables, and figure legends, but *no* embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Journal of Oral Pathology & Medicine* will be reviewed by two experts in the field. *Journal of Oral Pathology & Medicine* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.6. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.7. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.8. Submission of Revised Manuscripts

To submit a revised manuscripts please locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Research Articles: of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology.

3,000 words maximum, 6 figures and/or tables, and no more than 30 references

Review Papers: *Journal of Oral Pathology & Medicine* commissions review papers and also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm> and are subject to peer-review.

3,000 words maximum, 6 figures and/or tables, and no more than 50 references

Case Reports: Please note that *Journal of Oral Pathology & Medicine* no longer accepts

submissions of case reports.

Brief Reports: Original research material requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as Brief Reports. 1,000 words maximum.

Letters to the Editor: Letters, if of broad interest, are encouraged. Letters should not be confused with Brief Reports. Letters may deal with material in papers published in *Journal of Oral Pathology & Medicine* or they may raise new issues, but should have important implications.

750 words maximum. One figure or table, 5 references.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 6 published pages are subject to a charge of USD 163 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters.

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: Use only standard abbreviations (Vancouver System). All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. Useful is Baren DN, ed. *Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors.* 4. ed. London: Royal Society of Medicine.

Font: When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation.

5.3. Structure

All papers submitted to *Journal of Oral Pathology & Medicine* should include: title page, abstract, main text, references and tables, figures, figure legends and conflict of interest statement where appropriate. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal format will be returned to the author(s).

Title Page: Should be part of the manuscript document uploaded for review and include: The title of the article, a running title of no more than 50 letters and spaces, 2-5 keywords, complete names and institution for each author, corresponding author's name, address, email address and fax number.

Abstract: is limited to 250 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings in accordance with Index Medicus (Medical Subject Headings): background, methods, results and conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

Main Text of Original Articles: should be divided into introduction, material and methods, results and discussion.

Introduction: should clearly state the purpose of the article. Give only strictly pertinent references. Exhaustive literature reviews are inappropriate.

Materials and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This may for example include antibodies etc. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(i) Clinical trials: Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper. .

(ii) Experimental subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether

appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

(iii) Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Results: Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables, illustrations, or both: emphasize or summarize only important observations.

Discussion: Emphasize the new and important aspects of the study and conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data given in the Results section. Include in the Discussion the implications of the findings and their limitations and relate the observations to other relevant studies.

Main Text of Review Articles comprise an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. See also above under Ethical Guidelines.

Conflict of Interest Statement: All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest for generally accepted definitions on conflict of interest? See also above under Ethical Guidelines.

5.4. References

References should be kept to the pertinent minimum and numbered consecutively in the order in which they appear in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses). References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which are based on the formats used in Index Medicus. Try to avoid using abstracts as references. Include manuscripts accepted, but not published; designate the abbreviated title of the journal followed by (in press). Information from manuscripts not yet accepted, should be cited in the text as personal

communication. The references must be verified by the author(s) against the original documents. Titles should be abbreviated in accordance with the style used in Index Medicus and the Vancouver System.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

Examples of the Journal's reference style:

(1) Standard journal article

(List all authors when 6 or less; when 7 or more, list only the first 3 and add et al.)

BUCHNER A, SCIUBBA JJ. Peripheral epithelial odontogenic tumors: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987; 63: 688-97.

HEINIC GS, GREENSPAN D, MACPHAIL LA, et al. Oral Histoplasma capsulatum infection in association with HIV infection: a case report. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 85-9.

(2) Corporate author

European Collaborative Study. Risk factors for mother-to-child transmission of HIV-1. *Lancet* 1992; 339: 1007-12.

(3) No author given

Anonymous. 'The importance of being early' [leader]. *Br Dent J* 1991; 170: 167.

(4) Journal supplement

MØLLER-PETERSEN J. Evaluation of diagnostic tests. Design and phases. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52: suppl. (208): 35-50.

CROSS SS, SCHOLFIELD JH, KENNEDY A, COTTON DWK. Measuring the fractal dimension of tumour borders. *J Pathol* 1992; 168: 117A (abstr).

(5) Journal paginated by issue

HILLAM C. Dentistry in Europe in the 1790's. *Dent Historian* 1992; 22: (May): 31-4.

(6) Book

PINDBORG JJ. Atlas of diseases of the oral mucosa. Copenhagen: Munksgaard, 1992: 50-66.

(7) Chapter in a book

VAN DER WAAL I. Salivary gland neoplasms. In: PRABHU SR, WILSON DF, DAFTARY DK, JOHNSON NW, eds. *Oral diseases in the tropics*. Oxford: Oxford Medical, 1992; 478-86.

(8) Published proceedings paper

DRINNAN AJ. Review of the literature: educational aspects of oral medicine. In: MILLARD HD, MASON DK, eds. *World workshop on oral medicine*. Chicago: Year Book Medical,

1989; 5-11.

(9) Agency publication

MUIR C, WATERHOUSE J, MACK T, POWELL J, WHELAN S. Cancer incidence in five continents: Vol. 5. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987; IARC Scientific Publications No. 88.

(10) Dissertation or thesis

CHUNGPANICH S. The diagnostic and prognostic potential of nucleolar organizer regions in oral epithelial dysplasia. MMedSci Thesis, University of Sheffield, 1989.

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page. Tables with greater than 6 columns will be counted as multiple tables.

Figures: All figures should clarify the text and their number be kept to a minimum. Text on figures should be in CAPITALS. Line drawings should be professionally drawn; half-tones should exhibit high contrast. Multi-paneled figures will be counted as multiple figures. Figures can contain multiple images as long as these are grouped together on one page per figure with one legend for each figure.

Due to space constraints within the Journal, no more than 6 figures and/or tables will be allowed

All figures and artwork must be provided in electronic format. Figure legends should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used: they should not contain any details of methods.

Submit your figures as EPS, TIFF or PDF files. Use 300 dpi resolution for photographic images and 600 dpi resolution for line art. Full details of the submission of artwork are available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

6. AFTER ACCEPTANCE

6.1 Proofs

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file.

6.2 Supporting Information

If you have previously provided Supporting Information with your article, please note it will not be edited or altered from its original format during the Production process. Although a proof of your Supporting Information is not available, it will appear online when your article is published.

6.3 Early View

Journal of Oral Pathology & Medicine is covered by Wiley Blackwell Publishing's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. Early View articles are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.4 Offprints

The corresponding author will receive a free PDF offprint that can be downloaded via Author Services. Please sign up for the service if you would like to access your free article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers.

Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more information.

6.5 Author Services

Online production tracking through Wiley Blackwell's Author Services Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

Apêndices

