



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

PRISCILLA SUASSUNA CARNEIRO LÚCIO

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DAS SUBPOPULAÇÕES M1 E M2 DE
MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES (MATs) EM CARCINOMAS DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR**

CAMPINA GRANDE-PB

2013

PRISCILLA SUASSUNA CARNEIRO LÚCIO

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DAS SUBPOPULAÇÕES M1 E M2 DE
MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES (MAT) EM CARCINOMAS DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR**

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

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

Co-Orientador: Prof. Dr. Cassiano Francisco W. Nonaka

CAMPINA GRANDE-PB

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

L432a

Lúcio, Priscilla Suassuna Carneiro.

Análise imunoistoquímica das subpopulações M1 e M2 de macrófagos associados a tumores (MATs) em carcinomas de células escamosas de lábio inferior [manuscrito] / Priscilla Suassuna Carneiro Lúcio. – 2013.

71 f. : il. color.

Digitado

**Dissertação (Mestrado em Odontologia) -
Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de
Pós-Graduação e Pesquisa, 2013.**

“Orientação: Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy,
Departamento de Odontologia”.

1. Neoplasias. 2. Saúde bucal. 3. Imunoistoquímica. 4.
Boca. I. Título.

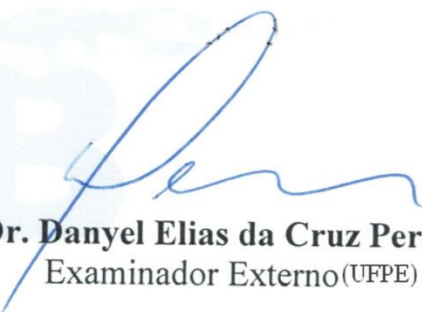
21. ed. CDD 617.6

PRISCILLA SUASSUNA CARNEIRO LÚCIO

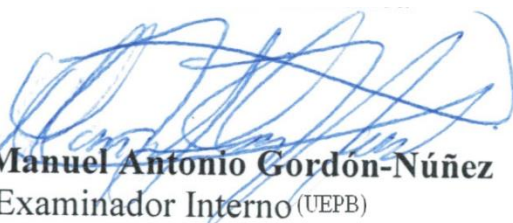
**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DAS SUBPOPULAÇÕES M1 E M2 DE
MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES (MAT) EM CARCINOMAS DE
CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR**

DATA DA DEFESA: 29/07/2013

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez
Examinador Externo (UFPE)



Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez
Examinador Interno (UEPB)



Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy
Orientador e Presidente da Banca (UEPB)



Dedicatória

*Aos meus pais, **George e Lúcia**,
exemplo de força, coragem e
superação, que fizeram de mim
quem sou e acreditaram em meus
sonhos*

*A minha querida irmã **Ana Silvia**,
pelo constante estímulo, incentivo,
carinho e força dedicados nos
momentos em que mais precisei*

*A minha tia **Dadá**, minha segunda
mãe, que sempre me apoiou e esteve
presente em todos os momentos
desta caminhada*

DEDICO



Agradecimientos

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*Meus sinceros agradecimentos aos meus Orientadores **Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy e Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, primeiramente por não terem desistido de mim e por confiarem sob minha responsabilidade o desenvolvimento deste trabalho, acreditando sempre que eu seria capaz de conduzi-lo.*

Agradeço a atenção, oportunidades e experiências a mim proporcionadas, pois todas, boas ou não tão “saborosas”, me fizeram crescer como profissional e ser humano.

Obrigada pela confiança e credibilidade em mim depositadas, pois estas constituíram o maior incentivo para que eu pudesse dar meus primeiros passos na Patologia e ultrapassar os obstáculos dessa caminhada.

Obrigada por todo ensinamento, carinho, risadas, paciência, mas principalmente por exercerem no sentido pleno a orientação e participação constante em minhas atividades.

A vocês, verdadeiros Mestres, dedico um singelo pensamento do autor Rubem Alves: “Ensinar é um exercício de imortalidade. De alguma forma continuamos a viver naqueles cujos olhos aprenderam a ver o mundo pela magia de nossa palavra. O professor, assim, não morre jamais...”

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pois sem ele nada sou e nada conseguiria. Agradeço por me amparar e me fortalecer em todas as batalhas diárias e por ter me guiado a mais esta conquista.

Aos meus pais **George e Lúcia**, meus maiores orientadores de vida, pois diante de suas limitações me proporcionaram sempre as melhores e possíveis oportunidades de crescimento, tendo que muitas vezes abdicar de seus próprios sonhos para que os meus pudessem se tornar reais. Agradeço por transmitirem o verdadeiro significado da palavra “família”! Obrigada por absolutamente tudo!

A minha irmã **Ana Silvia**, exemplo de profissional e ser humano, que despertou em mim o gosto pela docência e me incentivou a nunca desistir de meus objetivos. Obrigada pelo apoio incondicional!

Ao meu namorado **Igor Felipe Nóbrega**, pela paciência e cumplicidade que o fez superar a distância, mesmo que pequena, minhas ausências e “chatices”! Obrigada por estar ao meu lado e acreditar na minha capacidade mesmo nos momentos em que eu mesma duvidei!

A **Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira Aguiar**, pela receptividade, carinho e simplicidade com os quais me recebeu e compartilhou seus conhecimentos durante minha missão de estudos do PROCAD-UFMG.

As doutorandas do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFMG, **Patrícia e Daniela Cotta**, pela paciência, ajuda e conhecimentos compartilhados durante minha estadia em Belo Horizonte.

A minha amiga confidente e “mãe campinense”, **Betânia Lins**, pelos ensinamentos, conversas, momentos de descontração e apoio, pois tudo me fez amadurecer. Você é exemplo de força e determinação! Espero que o fim deste ciclo não nos separe, mas que possamos manter o companheirismo e amizade que construímos. Adoro você!

*A **Fábio, Manuela, Marcela e Vanessa**, companheiros de João Pessoa. Juntos vivenciamos a dor e a glória de cada um. Obrigada por serem companhias muito agradáveis e engraçadas nas nossas inúmeras viagens João Pessoa- Campina Grande- João Pessoa. Desejo sucesso a todos!*

*Aos meus colegas de sala **Armiliana, Leonardo, Lorena, Raulison, Renally, Roniery e Yêska** pelos momentos inesquecíveis e vínculos formados! Desejo sucesso a todos!*

*Aos demais **professores** do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba.*

*Aos funcionários e técnicos da Universidade Estadual da Paraíba, em especial a **Denise** (técnica do Laboratório de Histopatologia Oral) que se dispôs a ajudar nos cortes histológicos e sempre me deu força. Obrigada pela disponibilidade e alegria!*

*A **UEPB**, por proporcionar uma formação íntegra aos seus discentes.*

*A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo auxílio financeiro.*

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

*“Todo amanhã se cria num ontem, através de um hoje.
Temos que saber o que fomos para saber o que seremos.”*

Paulo Freire



Resumo

RESUMO

Pela ação direta da radiação ultravioleta e excluindo-se as alterações de pele, o lábio inferior é a estrutura mais acometida por lesões potencialmente malignas e malignas de origem epitelial. Um fator que pode interferir no prognóstico do carcinoma de células escamosas de lábio inferior (CCELI) consiste nos componentes do microambiente tumoral. Os macrófagos associados a tumores (MATs) representam parcela desta população celular e são divididos de acordo com seu estado de polarização: subtipo M1 (ativação clássica), exerce propriedades anti-tumorais por meio da destruição de células neoplásicas e o subtipo M2 (ativação alternativa), que apresentam atividade de regulação anti-inflamatória e favorece o escape de células neoplásicas da vigilância imunológica. Inúmeros estudos têm demonstrado um envolvimento de MATs com piores prognósticos em diversas neoplasias malignas, no entanto sua relação com o CCELI ainda não é conhecida. O presente estudo se propôs a analisar, por meio de técnica imunoistoquímica, a presença das subpopulações M1 e M2 de MATs em uma série de casos de CCELI e verificar um possível envolvimento destes subtipos celulares no desenvolvimento de metástase linfonodal regional. Cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina, obtidos de 30 casos de CCELI e divididos em dois grupos (15 casos com metástase linfonodal regional e 15 casos sem metástase linfonodal regional), foram avaliados sob microscopia de luz onde se determinou a gradação histopatológica de malignidade. O material foi submetido à técnica de dupla-coloração para os anticorpos monoclonais anti-CD68, anti-CD163 e anti-HLA-DR, obtendo assim distinção entre os MATs M1 (CD68/HLA-DR) e MATs M2 (CD68/CD163). Ao final, as células imunomarcadas foram contadas em 10 campos de maior positividade, estabelecendo a média de MATs M1 e M2 para cada caso. Os dados obtidos com as quantificações dos MATs M1 e M2 foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Possíveis diferenças entre as medianas para esses tipos celulares em relação aos parâmetros clínico-patológicos foram avaliadas por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney e provável correlação nas quantidades de MATs M1 e M2 foi verificada pelo teste de Spearman. A análise do *front* de invasão tumoral revelou presença dos dois subtipos celulares (MATs M1 e 2), tendo os MATs M1 associação significativa em lesões de maior tamanho (T2-T4) ($p = 0,049$). Com relação à ausência/presença de metástase linfonodal regional, estágio clínico e gradação histopatológica de malignidade, não se observou diferença estatisticamente significativa. No entanto, visualizou-se uma fraca correlação positiva, estatisticamente significativa entre os MATs M1 e M2 ($r = 0,385$; $p = 0,036$). Dessa forma conclui-se que os MATs não estão envolvidos na invasão tumoral de CCELI, no entanto são importantes para compreensão do comportamento biológico da doença. Além disso, o presente estudo incentiva o desenvolvimento de novas investigações sobre os diversos componentes do microambiente tumoral, a fim de sinalizar caminhos que busquem aprimorar e individualizar tratamentos para o câncer, a fim de se obter melhor qualidade de vida para pacientes que padecem desta doença.

Palavras-chave: Lábio, carcinoma de células escamosas, macrófagos associados a tumores, imunoistoquímica.

An abstract graphic of green smoke or mist rising from the bottom left corner and flowing horizontally towards the right. The smoke is composed of many thin, overlapping, curved lines, creating a sense of movement and depth. The color is a vibrant, slightly translucent green.

Abstract

ABSTRACT

By the direct action of ultraviolet and excluding skin changes, the lower lip is the structure most affected by potentially malignant and malignant lesions of epithelial origin. One factor that may step in the prognosis of squamous cell carcinoma of the lower lip (SCCLL) consists of the components of the tumor microenvironment. The tumor-associated macrophages (TAMs) are part of this cell population and are divided according to their state of polarization: M1 subtype (classical activation), exerts anti-tumor properties through the destruction of neoplastic cells and subtype M2 (alternative activation), which have anti-inflammatory activity and promotes neoplastic cells escape immune surveillance. Numerous studies have demonstrated the involvement of TAMs and poorer prognosis in several malignancies, however its relationship with SCCLL is not yet known. The present study aimed to analyze, through immunohistochemistry, the presence of M1 and M2 subpopulations of TAMs in a series of cases of SCCLL and verify a possible involvement of these cell subsets in the development of lymph node metastasis. Histological sections stained with hematoxylin and eosin, obtained from 30 cases of SCCLL and divided into two groups (15 cases with lymph node metastasis and 15 cases without lymph node metastasis), were evaluated under light microscopy where it determined the histopathological grading of malignancy. The material was subjected to double staining technique for the monoclonal antibodies anti-CD68, anti-CD163 and anti-HLA-DR. Obtained distinction between TAMs M1 (CD68/HLA-DR) and TAMs M2 (CD68/CD163). Then the immunostained cells were counted in 10 fields higher positive, establishing the average of M1 and M2 TAMs in each case. The data obtained from the measurements of TAMs M1 and M2 were subjected to the Kolmogorov-Smirnov test, which revealed the absence of normal distribution. Possible differences in the amounts of these cell types in relation to clinicopathological parameters were evaluated using the nonparametric test Mann-Whitney. Probable correlation in the amounts of TAMs M1 and M2 was verified by Spearman test. The analysis of tumor invasion front revealed the presence of the two cell subsets (TAMs M1 and M2). The TAMs M1 presented significant association in the largest lesions (T2-T4) ($p = 0.049$). With respect to the absence / presence of lymph node metastasis, clinical stage and histological grading of malignancy, there was no statistically significant difference. However, visualized weak positive correlation was statistically significant between the TAMs M1 and M2 ($r = 0.385$, $p = 0.036$). Thus it is concluded that the TMAs are not involved in tumor invasion SCCLL. However they are important for understanding the biological behavior of the disease. Furthermore, this study encourages the development of new research on the various components of the tumor microenvironment in order to signal paths that seek to enhance and individualize treatments for cancer, getting better quality of life for patients suffering from this disease.

Keywords: Lips, squamous cell carcinoma, tumor-associated macrophages, immunohistochemistry.

***Lista de abreviaturas
e siglas***



LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

UV	Ultravioleta
CCE	Carcinoma de células escamosas
CCEO	Carcinoma de células escamosas oral
DNA	Ácido desoxirribonucleico
CCELI	Carcinoma de células escamosas de lábio inferior
CMATs	Células mielóides associadas a tumores
MATs	Macrófagos associados a tumores
IL	Interleucina
T	Tamanho/extensão do tumor
N	Metástase linfonodal regional
M	Metástase à distância
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFMG	Universidade Federal de Minas gerais
PROCAD	Programa nacional de cooperação acadêmica
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
INCA	Instituto nacional do câncer
HE	Hematoxilina/Eosina
RR	Risco relativo
IC	Intervalo de confiança
SGHM	Sistema de gradação histopatológica de malignidade



Lista de figuras

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A) Fotomicrografia do *front* de invasão de CCELI de alto grau de malignidade (H/E,100×). B) Fotomicrografia do *front* de invasão de CCELI de baixo grau de malignidade (H/E,100×). C) e D) Fotomicrografia de MATs M1 no *front* de invasão de CCELI (CD68/HLA-DR+, 400×). E) e F) Fotomicrografia de MATs M2 no *front* de invasão de CCELI (CD68/CD163+, 400×).

***Lista de quadros e
tabelas***



LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Elenco de variáveis dependentes e independentes do estudo.

Quadro 2. Sistema de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin, Gospodarowicz, Wittekind (2011).

Quadro 3. Categorias de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin, Gospodarowicz, Wittekind (2011).

Quadro 4. Sistema de gradação histopatológica de malignidade no “*front*” de invasão proposto por Bryne (1998).

Quadro 5. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Tabela 1. Distribuição absoluta e relativa dos casos de carcinoma de células escamosas de lábio inferior de acordo com os parâmetros clínico-patológicos.

Tabela 2. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (*p*) para a quantidade de MATs M1 em relação aos parâmetros clínico-patológicos.


Tabela 3. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (*p*) para a quantidade de MATs M2 em relação aos parâmetros clínico-patológicos.



Sumário

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	25
2	OBJETIVOS	29
2.1	OBJETIVO GERAL	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3	METODOLOGIA	31
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	31
3.2	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	31
3.3	LOCAL DO ESTUDO	31
3.4	POPULAÇÃO	32
3.5	AMOSTRA	32
3.5.1	Critérios de Inclusão	32
3.5.2	Critérios de Exclusão	32
3.6	VARIÁVEIS	33
3.7	ESTUDO CLÍNICO	33
3.8	ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO.....	35
3.9	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO.....	36
3.9.1	Método Imunoistoquímico	36
3.9.2	Análise Imunoistoquímica	39
3.10	ANÁLISE ESTATÍSTICA	40
4	ARTIGO	42
4.1	APRESENTAÇÃO	42
4.2	ARTIGO A SER SUBMETIDO	43
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	63
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICES	70
	ANEXOS	72



Considerações iniciais

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O câncer é causado por alterações no material genético de células transformadas. Estas anomalias podem ser resultado dos efeitos de agentes carcinógenos, como o tabagismo, radiação, substâncias químicas ou agentes infecciosos. As interações complexas entre agentes carcinogênicos e o genoma do hospedeiro podem explicar porque somente alguns indivíduos desenvolvem câncer após a exposição a um carcinógeno conhecido. Tal doença é considerada um problema de saúde pública, cuja prevenção e o diagnóstico precoce ainda constituem as melhores formas de reverter essa situação (INCA, 2011).

O carcinoma de células escamosas (CCE) corresponde à neoplasia mais frequente da cavidade oral, sendo considerada uma doença multifatorial e de alta incidência no mundo (DAHER; PEREIRA; OLIVEIRA, 2008; MARTINS et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009; HASSON, 2008; ORTHOLAN et al., 2009). Por ter uma localização anatômica favorável à incidência da radiação ultravioleta (UV), o lábio inferior, particularmente o vermelhão do lábio é a estrutura mais acometida por lesões potencialmente malignas e malignas de origem epitelial, em especial, nas regiões que geograficamente são favorecidas por uma maior intensidade de raios solares (HORTA et al., 2007; MAROCCHIO et al., 2010; SOUZA et al., 2011).

Embora seja uma lesão bastante incidente, compreendendo 10,8% a 30% de todos os carcinomas de células escamosas oral (CCEO), os eventos moleculares envolvidos na progressão e desenvolvimento dos tumores de lábio ainda são pobremente compreendidos. No entanto sabe-se que a exposição crônica à radiação UV sem proteção é o principal fator associado ao seu desenvolvimento (SALGARELLI et al., 2009; EL-ROUBY, 2010; SOUZA et al., 2011; GUTIERREZ-PASCUAL et al., 2012).

A exposição contínua aos raios UV acumulam erros (mutações) na replicação do DNA (ácido desoxirribonucleico). Os mecanismos pelos quais essa radiação pode danificar o DNA são por meio da excitação direta das moléculas e a geração de espécies reativas de oxigênio (WARMER; WEI, 1997). Essas mutações, dentre outras alterações, podem descontrolar genes críticos para a regulação do ciclo celular. Tal fato tem sido encontrado no gene supressor de tumor p53, cuja principal função compreende a parada do ciclo celular na fase G1 para reparo do DNA danificado ou a condução à apoptose celular quando os danos tornaram-se excessivos (LUCENA et al., 2012).

A capacidade mutagênica da radiação UV foi verificada em 1960, com a descoberta da formação do fotodímero ciclobutano, após a irradiação da base timina. Posteriormente identificou-se o que seria a “assinatura do ultravioleta”: a produção de mutações em pontos específicos do DNA (onde existiam duas bases pirimídicas adjacentes), levando à formação do dímero de pirimidina ciclobutílica e de fotoprodutos pirimidina-pirimidona (GARINIS; JANS; VAN DER HORST, 2006). A via de excisão de nucleotídeos, por sua vez, tenta corrigir esse erro, porém sua habilidade se torna comprometida diante de uma exposição solar excessiva (BRASILEIRO FILHO, 2011).

Geralmente o carcinoma de células escamosas de lábio inferior (CCELI) é diagnosticado em homens (6:1) de pele clara, entre a quarta e sexta décadas de vida, com histórico de exposição crônica a radiação solar, sem proteção (HASSON, 2008; SOUZA et al., 2011; GUTIERREZ-PASCUAL et al., 2012). Essa lesão apresenta ainda baixa agressividade e metástases tardias (DAHER; PEREIRA; OLIVEIRA, 2008). Entretanto, a forma de diferenciação histopatológica e o padrão de invasão tumoral estão correlacionados ao comportamento biológico da lesão, podendo ser auxiliares na identificação de pacientes com maior risco de apresentar envolvimento linfonodal (BRYNE, 1991; BRYNE, 1998). O prognóstico favorável dessas lesões se dá em estágios iniciais de diagnóstico, com taxas de sobrevida de cinco anos aos pacientes. Porém quando há metástases regionais essa taxa cai de 30% a 70% (BILKAY et al., 2003; DE AQUINO et al., 2012; CHEN et al., 2013).

Outro fator diretamente relacionado ao prognóstico do CCELI consiste nos componentes do microambiente tumoral. Embora se apresente de forma favorável, a inflamação pode demonstrar uma função dual a partir do momento em que há um desvio de suas atividades naturais em favor do crescimento e invasão tumoral (MANTOVANI; SICA; ALLAVENA, 2007; SICA et al., 2008; EIRO; VIZOSO, 2012).

O papel pró-tumoral das células mielóides associadas a tumores (CMATs) revela-se na capacidade destas expressarem distintos programas funcionais em resposta a diferentes sinais e/ou condições microambientais (VAUPEL; MAYER, 2007; MANTOVANI; SICA, 2010).

Os macrófagos associados a tumores (MATs) representam parcela desta população celular e são divididos de acordo com seu estado de polarização: M1 (ativação clássica) e M2 (ativação alternativa). O subtipo M1 é responsável, principalmente, por manter a atividade pró-inflamatória por meio da expressão elevada de citocinas como a interleucina (IL)-12, -23 e IFN- γ . Além disso, promove destruição de células neoplásicas pela ação de óxido nítrico e espécies de oxigênio reativo. Por sua

vez, o subtipo M2 possui poderosas estratégias capazes de favorecer o escape da das células neoplásicas da vigilância imunológica por meio da produção de citocinas anti-inflamatórias e imunossupressoras (IL-10 e TGF- β), inibição das funções inflamatórias e citotóxicas do subtipo M1, indução da angiogênese, remodelação e reparo tecidual, condições estas que contribuem para o crescimento e disseminação tumoral (GORDON, 2007; MARTINEZ; HELMING; GORDON, 2009; MA et al., 2010; SICA, 2010; BAAY et al., 2011; CASSETTA; CASSOL; POLI, 2011; SHAPIRO; LUTATY; ARIEL, 2011; FUJII et al., 2012; MERRY et al., 2012; SICA et al., 2012; COSTA et al., 2013).

Posto isso, inúmeros estudos têm demonstrado um envolvimento dos MATs, em especial o subtipo M2, com piores prognósticos em diversas neoplasias malignas (LISSBRANT et al., 2000; RYDER et al., 2008; JENSEN et al., 2009; KURAHARA et al., 2009; KAWAHARA et al., 2010; MUKHTAR et al., 2011; FUJII et al., 2012; ZHANG et al., 2012; COSTA et al., 2013). No entanto sua relação com carcinomas orais e com o CCELI ainda não está completamente conhecida.

Dessa forma, a presente pesquisa se propôs a analisar, por meio de técnica imunoistoquímica, a presença das subpopulações M1 e M2 de MATs em uma série de casos de CCELI e verificar um possível envolvimento destes subtipos celulares no desenvolvimento de metástase linfonodal regional. Pretendeu-se com esta pesquisa subsidiar estudos futuros que trabalhem os componentes do microambiente tumoral na busca e identificação de marcadores biológicos clinicamente eficazes que possam fornecer informações úteis na determinação do prognóstico e individualização dos tratamentos.



Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, através da técnica de imunohistoquímica, a presença das subpopulações M1 e M2 de MATs (CD68, HLA-DR e CD163) em CCELI e verificar um possível envolvimento destes subtipos celulares com o desenvolvimento de metástase linfonodal regional.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Relacionar a expressão imunohistoquímica em dupla-marcação para as proteínas CD68/HLA-DR e CD68/CD163 com os dados clínicos dos pacientes: sexo, idade, tamanho/extensão do tumor (T), metástases linfonodais regionais (N), metástase à distância (M) e estágio clínico;
- Relacionar a expressão imunohistoquímica em dupla-marcação para as proteínas CD68/HLA-DR e CD68/CD163 com a gradação histopatológica de malignidade dos tumores proposta por Bryne (1998).



Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo buscou autorização das instituições envolvidas, foi cadastrado na Base de Registros de Pesquisa envolvendo seres humanos (Plataforma Brasil) (ANEXO A) e submetido à apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB. Conforme parecer número 0202.0.133.000-12 (ANEXO B), seu protocolo foi aprovado e a pesquisa iniciada.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente estudo caracterizou-se por uma pesquisa de caráter observacional, com corte transversal, consistindo em uma análise imunoistoquímica, descritiva e comparativa da presença das subpopulações M1 e M2 de MATs em CCELI.

3.3 LOCAL DO ESTUDO

O estudo utilizou o Hospital Napoleão Laureano, João Pessoa – PB, centro de referência no atendimento aos pacientes com câncer do estado da Paraíba, para seleção dos casos de CCELI.

A análise da gradação histopatológica de malignidade dos tumores foi realizada por dois examinadores previamente calibrados, no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande – PB.

O estudo imunoistoquímico foi realizado no Laboratório de Patologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte – MG, cujos estudos em parceria entre os dois centros, UEPB e UFMG, são possibilitados pelo Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD), através do Edital PROCAD/NF2009. Bem como também contou com o apoio do Laboratório de Imunoistoquímica do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), Natal-RN.

3.4 POPULAÇÃO

A população do presente estudo foi constituída por todos os casos de CCELI, diagnosticados e registrados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/João Pessoa – PB, no período de Janeiro de 2002 a Junho de 2012, que atendessem aos critérios de inclusão e exclusão.

3.5 AMOSTRA

A técnica de amostragem empregada no estudo foi do tipo não-probabilista por conveniência. A amostra foi dividida em dois grupos: um com 15 casos de CCELI sem metástase linfonodal regional e outro com 15 casos de CCELI com metástase linfonodal regional, verificando os critérios de inclusão e exclusão listados abaixo.

3.5.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo, os casos de CCELI oriundos de ressecção cirúrgica, cujos prontuários contemplassem os dados necessários para realização do estudo clínico, além de possuírem blocos de parafina que apresentassem qualidade e quantidade suficiente de material biológico para realização do estudo histomorfológico e imunoistoquímico.

3.5.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos os casos provenientes de biópsia incisional, pois poderiam apresentar quantidade insuficiente de material biológico para avaliação histomorfológica e imunoistoquímica. Também não foram considerados os casos de pacientes que tinham se submetido previamente a tratamento quimioterápico e/ou radioterápico, assim como foram excluídos os casos de tumores recidivados.

3.6 VARIÁVEIS

Quadro 1. Elenco de variáveis dependentes e independentes do estudo.

VARIÁVEL	MENSURAÇÃO	VARIÁVEL (PLANO DE ANÁLISE)	VARIÁVEL MENSURAÇÃO)	CATEGORIZAÇÃO
Sexo	Masculino Feminino	Independente	Qualitativa Nominal	-
Idade	Anos	Independente	Quantitativa Discreta	-
Raça/Cor	Branco; Amarelo Pardo; Indígena; Negra	Independente	Qualitativa Nominal	Branco Não-Branco
Gradação histopatológica (Bryne, 1998)	Baixo grau de malignidade Alto grau de malignidade	Independente	Qualitativa Nominal	-
Tamanho/extensão do tumor (T)	Tx; T0; Tis T1; T2; T3; T4a; T4b	Independente	Qualitativa Nominal	T1- tumor até 2 cm T2-T4- tumor acima de 2 cm
Metástase regional (N)	Nx; N0 N1; N2; N3	Independente	Qualitativa Nominal	N0- Metástase linfonodal ausente N1-N2- Metástase linfonodal presente
Metástase à distância (M)	M0 M1	Independente	Qualitativa Nominal	M0- Metástase à distância ausente M1- Metástase à distância presente
Estádio Clínico	0; I; II; III; IVA; IVB; IVC	Independente	Qualitativa Nominal	I-II- estágio inicial III-IV- estágio avançado
M1	unidades	Dependente	Quantitativa Discreta	média
M2	unidades	Dependente	Quantitativa Discreta	média

3.7 ESTUDO CLÍNICO

Inicialmente foram anotados os números originais tanto do prontuário quanto da peça parafinada, tal qual estavam registrados no serviço de origem. Em seguida foram coletadas informações com relação ao sexo do paciente, idade, raça, tamanho/extensão do tumor (T), metástases regionais (N), metástases à distância (M) e estágio clínico, conforme ficha específica (APÊNDICE A).

A idade foi coletada sem categorização prévia. Com relação à etnia, foi descrita de acordo com a classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE): brancos, pardos, negros/pretos, amarelos e indígenas. Posteriormente estes foram categorizados em brancos e não-brancos.

O estadiamento dos pacientes foi registrado mediante o descrito no prontuário, adotando-se a classificação TNM da UICC (Union for International Cancer Control) usada pelo INCA (Instituto Nacional do Câncer).

Para o estadiamento clínico, foram utilizados os parâmetros elencados na sétima edição da Classificação TNM dos Tumores Malignos (SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2011), os quais são apresentados nos Quadros 2 e 3.

Quadro 2. Sistema de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin, Gospodarowicz, Wittekind (2011).

T – TUMOR PRIMÁRIO	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em seu diâmetro maior
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 pterigóides, base do crânio ou artéria carótida interna
N – LINFONODOS REGIONAIS	
NX	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
M – METÁSTASE À DISTÂNCIA	
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância

Quadro 3. Categorias de estadiamento clínico TNM para o CCE de lábio, preconizado por Sobin, Gospodarowicz, Wittekind (2011).

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

A fim de facilitar os testes estatísticos as variáveis T, N, M e estágio clínico foram categorizadas conforme apresentadas no quadro de variáveis (QUADRO 1).

3.8 ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 5µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina (HE). Sob microscopia de luz (*Leica DM 500*, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), os espécimes de CCELI foram examinados com aumentos de 100× e 400×. Ao longo do “*front*” de invasão tumoral, foi realizada análise da gradação histopatológica de malignidade dos espécimes, de acordo com o sistema proposto por Bryne (1998) (Quadro 4).

Estas informações foram também anotadas em ficha específica (APÊNDICE A).

Quadro 4. Sistema de gradação histopatológica de malignidade no “*front*” de invasão tumoral proposto por Bryne (1998).

Aspectos Morfológicos	Escore de Malignidade			
	1	2	3	4
Grau de Ceratinização	Altamente ceratinizado (mais de 50% das células)	Moderadamente ceratinizado (20 a 50% das células)	Mínima ceratinização (5 a 20% das células)	Nenhuma ceratinização (0 a 5% das células)
Pleomorfismo Nuclear	Pouco pleomorfismo nuclear (mais de 75% das células maduras)	Moderado pleomorfismo nuclear (50 a 75% das células maduras)	Abundante pleomorfismo (25 a 50% das células maduras)	Pleomorfismo nuclear extremo (0 a 25% das 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)	Dissociação celular difusa e pronunciada, em pequenos grupos e/ou células individuais (N<15)
Infiltrado Inflamatório	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

Os escores obtidos em cada um dos parâmetros foram somados, obtendo-se o escore final de malignidade do caso. As lesões que apresentaram escores finais entre 4 e 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). Ressalta-se que a gradação histopatológica de malignidade foi realizada por dois examinadores previamente treinados, sem que os mesmos tivessem conhecimento sobre os dados clínicos da lesão. Os casos que se apresentaram discordantes foram resolvidos por consenso.

3.9 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

3.9.1 Método imunoistoquímico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3 μ m de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro devidamente limpas, desengorduradas e silanizadas conforme protocolo do Laboratório de Patologia Experimental do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Departamento de Odontologia da UFMG. Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*EnVision™ G/2 Doublestain System*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), utilizando anticorpos monoclonais anti-CD68, anti-CD163 e anti-HLA-DR (Quadro 5).

A técnica utilizada seguiu o protocolo descrito abaixo:

- Desparafinização:
 - Xilol I (*Overnight*);
 - Xilol II (15 minutos);
- Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);

- Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
 - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (3 trocas);
- ⇒ Recuperação antigênica (Quadro 5);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada;
- ⇒ Incubação com solução bloqueadora (*Dual Endogenous Enzime*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (5 minutos);
- ⇒ Passagens em solução de TRIS-HCl 20mM, pH 7,4, à temperatura ambiente (1 banho rápido + 1 banho de 5 minutos);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário (CD68), em solução diluente (*Antibody diluent with background reducing components*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (60 minutos);
- ⇒ Passagens em solução de TRIS-HCl 20mM, pH 7,4, à temperatura ambiente (1 banho rápido + 1 banho de 5 minutos);
- ⇒ Incubação com anticorpo secundário polimerizado à peroxidase (*Polymer/HRP*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (10 minutos);
- ⇒ Passagens em solução de TRIS-HCl 20mM, pH 7,4, à temperatura ambiente (1 banho rápido + 2 banhos de 5 minutos cada);
- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (Liquid DAB+ Substrate, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (10-15 minuto);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (3 trocas);
- ⇒ Incubação com solução bloqueadora (*Doublestain block*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (3 minutos);
- ⇒ Passagens em solução de TRIS-HCl 20mM, pH 7,4, à temperatura ambiente (1 banho rápido + 1 banho de 5 minutos);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário (CD163/HLA-DR), em solução diluente (*Antibody diluent with background reducing components*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (60 minutos);
- ⇒ Passagens em solução de TRIS-HCl 20mM, pH 7,4, à temperatura ambiente (1 banho rápido + 1 banho de 5 minutos);

- ⇒ Incubação com anticorpo secundário conjugado com polímero de dextrano (*Rabbit/Mouse Link*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (10 minutos);
- ⇒ Passagens em solução de TRIS-HCl 20mM, pH 7,4, à temperatura ambiente (1 banho rápido + 2 banhos de 5 minutos cada);
- ⇒ Incubação com anticorpo polimerizado à fosfatase alcalina (*Polymer/AP*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (10 minutos);
- ⇒ Passagens em solução de TRIS-HCl 20mM, pH 7,4, à temperatura ambiente (1 banho rápido + 2 banhos de 5 minutos cada);
- ⇒ Revelação da reação com solução cromógena de vermelho permanente (*Permanent Red Substrate-Chromogen*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (15-20 minuto);
- ⇒ Passagem em água destilada (1 banho de 5 minutos);
- ⇒ Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (15-30 segundos);
- ⇒ Passagens rápidas em água destilada (3 trocas);
- ⇒ Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
- Álcool etílico 70°GL (2 minutos);
 - Álcool etílico 90°GL (2 minutos);
 - Álcool etílico absoluto I (2 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ⇒ Duas passagens em xilol:
- Xilol I (5 minutos);
 - Xilol II (10 minutos);
- ⇒ Montagem em resina *PermOUNT*® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

Quadro 5. 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 BM 95°C, 30 min	60 minutos
CD163	10D6	Novocastra	1:200	Citrato, pH 6,0 BM 95°C, 30 min	60 minutos
HLA-DR	TAL. 1B5	Dako	1:800	Citrato, pH 6,0 BM 95°C, 30 min	60 minutos

Como controles positivo para os anticorpos anti-CD68, anti-HLA-DR e CD163 foram utilizados espécimes de lesão periapical. O controle negativo consistiu na substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão.

3.9.2 Análise Imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, cada espécime foi analisada, sob microscopia de luz por dois examinadores previamente treinados.

A análise das subpopulações de MATs foi realizada de forma quantitativa, adaptando-se a metodologia utilizada no estudo de Ma et al. (2010). Primeiramente, ao longo do “*front*” de invasão tumoral, sob aumento de 100×, foram selecionados 10 campos de maior imunorreatividade aos anticorpos anti-CD68/anti-HLA-DR (MATs M1) e anti-CD68/anti-CD163 (MATs M2). Sob aumento de 400×, cada um destes campos foi fotomicrografado (Microscópio óptico CARL ZEISS® Axilab, AXIOcam MRC da ZEISS®, *software* Axiovision Rel 4.8.2 da ZEISS®/ Computador Acer® *Aspire one 722*). Com o auxílio do programa *ImageJ*® (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), em cada um destes campos, foi realizada a contagem das células exibindo dupla marcação CD68/HLA-DR e CD68/CD163. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se o número total de células apresentando dupla marcação para CD68/HLA-DR e CD68/CD163. Finalmente, com este último dado, foi calculada a média de MATs M1 e M2 para cada caso.

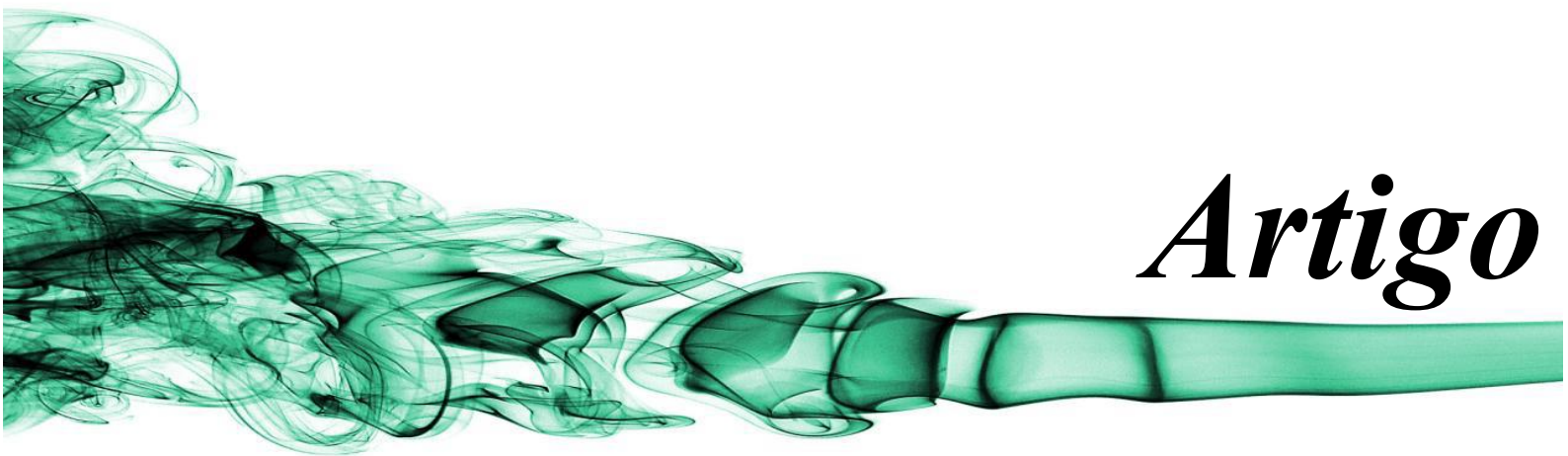
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após análises das informações clínicas, o estudo histomorfológico e imunoistoquímico, os resultados obtidos foram organizados em uma planilha com o auxílio do programa *Microsoft Excel*, versão 2007 e em seguida exportada para o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), no qual foram realizadas as análises estatísticas pertinentes.

Estatísticas descritivas foram utilizadas para caracterizar a casuística.

Os dados obtidos com as quantificações dos MATs M1 (CD68/HLA-DR-positivos) e M2 (CD68/CD163-positivos) foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, possíveis diferenças entre as medianas para esses tipos celulares em relação aos parâmetros clínico-patológicos (tamanho do tumor primário, metástase linfonodal regional, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade) foram avaliadas por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para isto, lesões classificadas como T2, T3 e T4 foram reunidas em um único grupo e comparadas a lesões classificadas como T1. De forma similar, tumores classificados como N1 e N2 foram reunidos em um único grupo e comparados com tumores classificados como N0. Em relação ao estadiamento clínico, casos em estádios iniciais (I e II) foram comparados com casos em estádios avançados (III e IV).

Para determinar possíveis correlações entre as quantidades de MATs M1 e M2 nos CCELI, foi empregado o teste de correlação de Spearman. Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, o nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).



Artigo

4 ARTIGO

4.1 APRESENTAÇÃO

A presente pesquisa foi previamente apresentada e aprovada na qualificação desenvolvida pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB.

Como resultado de sua execução, um artigo é apresentado nessa dissertação: **Análise da presença de macrófagos associados a tumores (MATs) e sua relação com parâmetros clínicos-patológicos em carcinoma de células escamosas de lábio inferior.**

O referido artigo será submetido ao periódico *Experimental and Molecular Pathology*, cujas normas de formatação e submissão do manuscrito estão elencadas no Anexo C.

O periódico *Experimental and Molecular Pathology* possui fator de impacto 2.128 e *qualis* A2, de acordo com classificação da CAPES.

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

**IMUNOEXPRESSÃO DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES
(MATs) E SUA RELAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICOS-PATOLÓGICOS
EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR**

Priscilla Suassuna Carneiro LÚCIO¹; Daniela Cotta RIBEIRO²; Maria Cássia Ferreira AGUIAR³; Pollianna Muniz ALVES⁴; Cassiano Francisco Weege NONAKA⁴; Gustavo Pina GODOY⁴

¹ Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, PB, Brasil.

² Aluna do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

³ Professora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil.

⁴ Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina grande, PB, Brasil.

Autor correspondente:

Gustavo Pina Godoy

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Av. das Baraúnas, s/n – Bodocongó – Campina Grande – PB – Brasil

CEP 58429-600 Fone/fax: +55 83 3315-3471

E-mail: gruiga@hotmail.com

Abreviações: CCE, carcinoma de células escamosas; CCEO, carcinoma de células escamosas oral; CCELI, carcinoma de células escamosas de lábio inferior; MATs, macrófagos associados a tumores; MMPs, metaloproteinases de matriz.

RESUMO

Os macrófagos associados a tumores (MATs) são divididos de acordo com seu estado de polarização: M1 (ativação clássica) e M2 (ativação alternativa). O presente estudo se propôs a analisar, por meio de técnica imunoistoquímica, a presença das subpopulações M1 e M2 de MATs em uma série de casos de CCELI e verificar um possível envolvimento destes subtipos celulares no desenvolvimento de metástase linfonodal regional. Foram avaliados 30 casos de CCELI divididos em dois grupos (15 casos com metástase linfonodal regional e 15 casos sem metástase linfonodal regional) nos quais, determinou-se a gradação histopatológica de malignidade. O material foi submetido à técnica de dupla-coloração para os anticorpos monoclonais anti-CD68, anti-CD163 e anti-HLA-DR, obtendo assim distinção entre os MATs M1 (CD68/HLA-DR) e MATs M2 (CD68/CD163). A amostra foi avaliada pelos testes de Mann-Whitney e de Spearman. A análise do *front* de invasão tumoral revelou presença dos dois subtipos celulares (MATs M1 e M2), tendo os MATs M1 diferença significativa em lesões de maior tamanho (T2-T4) ($p = 0,049$). Com relação à ausência/presença de metástase linfonodal regional, estágio clínico e gradação histopatológica de malignidade, não se observou diferença estatisticamente significativa. No entanto, visualizou-se uma fraca correlação positiva, estatisticamente significativa entre os MATs M1 e M2 ($r = 0,385$; $p = 0,036$). A ausência de relação entre MATs e metástase linfonodal regional em CCELI não exclui a participação destas células na patogênese tumoral, pois fatores secretados por MATs podem favorecer inúmeros mecanismos de imunossupressão local e sistêmica ou, ainda, a expressão fenotípica de outras células inflamatórias que provavelmente podem trabalhar em favor do crescimento, remodelação e invasão tumoral.

Palavras-chave: Lábio, carcinoma de células escamosas, macrófagos associados a tumores, imunoistoquímica.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas corresponde à neoplasia maligna epitelial que pode afetar a cavidade oral e vermelhão do lábio. Devido à acessibilidade direta da radiação ultravioleta, esta lesão corresponde à principal alteração de acometimento do lábio inferior (Martins et al., 2008; Ribeiro et al., 2009; Hasson, 2008; Ortholan et al., 2009; Marocchio et al., 2010; Souza et al., 2011).

O carcinoma de células escamosas de lábio inferior (CCELI) compreende 10,8% a 30% de todos os carcinomas de células escamosas oral (CCEO) e sua patogenia ainda permanece obscura. No entanto sabe-se que a exposição crônica à radiação ultravioleta (UV) sem proteção é o principal fator associado ao seu desenvolvimento (Salgarelli et al., 2009; Souza et al., 2011; Gutierrez-Pascual et al., 2012).

Apesar da relativa facilidade de detecção, os primeiros sinais de aparecimento do CCELI são negligenciados. Poucos casos são identificados precocemente quando ainda é possível obter cura sem maiores prejuízos estéticos e funcionais ao paciente. A maioria das lesões é diagnosticada em estágios mais avançados, na presença de metástases linfonodais regionais, possuindo, desta forma, um prognóstico mais sombrio. Nesses casos, tem-se uma diminuição nas taxas de sobrevida de 5 anos entre 30% a 70% (Bilkay et al., 2003; Daher et al., 2008; de Aquino et al., 2012; Chen et al., 2013).

Outro fator diretamente relacionado ao prognóstico do CCELI consiste nos componentes do microambiente tumoral. Sendo normalmente favoráveis ao reparo tecidual, as células inflamatórias podem demonstrar uma função dual a partir do momento em que as células neoplásicas são capazes de desviar as atividades inflamatórias naturais em favor do crescimento e invasão tumoral (Mantovani et al., 2007; Sica et al., 2008; Eiro and Vizoso, 2012).

O papel pró-tumoral das células inflamatórias resulta na capacidade destas expressarem distintos programas funcionais em resposta a diferentes sinais e/ou condições microambientais (Vaupel and Mayer, 2007; Mantovani and Sica, 2010; Costa et al., 2013).

Os macrófagos, principais representantes de defesa no microambiente tumoral, quando associados a tumores (MATs), são fenotipicamente reconhecidos sob duas polarizações: M1 e M2. O fenótipo M1 por ser uma ativação macrofágica clássica possui propriedades pró-inflamatórias, mantendo níveis constantes e elevados de citocinas como interleucina-12, -23 e IFN- γ . Além disso, são capazes de destruir células neoplásicas por meio de espécies reativas de oxigênio. Por sua vez, o subtipo M2,

correspondendo uma ativação macrofágica alternativa, tem condições moleculares que viabilizam o escape de células neoplásicas da vigilância imunológica. Essa capacidade imunossupressora tumoral é reflexo da produção de citocinas anti-inflamatórias e imunossupressoras (Interleucina-10 e TGF- β), inibição das funções inflamatórias e citotóxicas do subtipo M1, indução da angiogênese, remodelação e reparo tecidual, condições estas que contribuem para o crescimento e disseminação tumoral (Gordon, 2007; Martinez et al., 2009; Ma et al., 2010; Sica, 2010; Baay et al., 2011; Cassetta et al., 2011; Shapiro et al., 2011; Fujii et al., 2012; Merry et al., 2012; Sica et al., 2012; Costa et al., 2013).

Apesar de alguns estudos terem sugerido uma associação significativa entre os MATs e um pior prognóstico em pacientes com CCEO (Li et al., 2002; Marcus et al., 2004; Liu et al., 2008; Fuji et al., 2012; Zhang et al., 2012; Costa et al., 2013), pouco foi descrito a despeito do CCELI e esses fenótipos macrofágicos. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar a presença das subpopulações M1 e M2 de MATs em uma série de casos de CCELI e verificar um possível envolvimento destes subtipos celulares no desenvolvimento de metástase linfonodal regional.

MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo retrospectivo foi conduzido entre os anos de 2002 a 2012 e foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba, Brasil (protocolo nº 0202.0.133.000-12).

Espécimes

Foram selecionados 30 casos de CCELI os quais foram identificados e registrados pelo serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano, João Pessoa-PB, Brasil. A amostra foi então dividida em 15 casos com metástase linfonodal regional presente e 15 casos sem metástase linfonodal regional ausente. Foram incluídos na amostra apenas os casos de CCELI provenientes de ressecções cirúrgicas, cujos blocos parafinados apresentavam quantidade e qualidade de material biológico suficiente para desenvolver as análises histopatológicas e imunoistoquímicas. Foram excluídos os casos de tumores recidivados e provenientes de pacientes submetidos previamente a tratamento quimioterápico e/ou radioterápico, bem como aqueles casos cujas informações clínicas (sexo, idade, tamanho/extensão do tumor, presença de

metástases linfonodais regionais, metástases à distância e estágio clínico) estivessem incompletas. Para o estadiamento clínico foram utilizados os parâmetros elencados na sétima edição da Classificação TNM dos Tumores Malignos (Sobin et al., 2011).

Análise histopatológica

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e emblocada em parafina foi submetida a cortes de 5µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro limpas e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), os espécimes de CCELI foram examinados com aumentos de 100× e 400×. Ao longo do “*front*” de invasão tumoral foi realizada análise da gradação histopatológica de malignidade dos espécimes, de acordo com o sistema proposto por Bryne (1998). Para este sistema são atribuídos escores de 1 a 4 para os parâmetros analisados (grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório). Em seguida, os escores foram somados a fim de se obter o escore final de malignidade do caso. Adotando-se a metodologia proposta por Silveira et al. (2007) as lesões que apresentaram escores finais entre 4 e 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. Ressalta-se que a gradação histopatológica de malignidade foi realizada por dois examinadores previamente treinados, sem que os mesmos tivessem conhecimento sobre os dados clínicos da lesão. Os casos que se apresentaram discordantes foram resolvidos por consenso.

Análise imunoistoquímica

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 limpas, desengorduradas e silanizadas. Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*EnVision™ G/2 Doublestain System, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA*), utilizando dupla-coloração para os anticorpos monoclonais anti-CD68, anti-CD163 e anti-HLA-DR (Quadro 1). O anticorpo primário CD68 foi corado em marrom com DAB+, e CD163 e HLA-DR foram corados com o vermelho permanente (*Permanent Red*), cujas marcações se mostraram citoplasmáticas. As células que se

apresentaram com uma coloração castanho-avermelhada foram consideradas positivas para a contagem. Adicionalmente, para os MATs M1 também foi considerada a morfologia celular, uma vez que linfócitos também podem exibir positividade ao HLA-DR. Deste modo, células arredondadas e com citoplasma globoso foram consideradas positivas à dupla marcação CD68/HLA-DR (MATs M1).

Amostras de lesão periapical foram utilizadas como controles positivos para os anticorpos anti-CD68, anti-HLA-DR e CD163. O controle negativo consistiu na substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão.

Contagem celular

A análise das subpopulações de MATs foi realizada de forma quantitativa, adaptando-se a metodologia utilizada por Ma et al. (2010). Ao longo do “*front*” de invasão tumoral, sob aumento de 100× (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), foram selecionados 10 campos de maior imunorreatividade aos anticorpos anti-CD68/anti-HLA-DR (MATs M1) e anti-CD68/anti-CD163 (MATs M2). Sob aumento de 400×, cada um destes campos foi fotomicrografado (Microscópio óptico CARL ZEISS® Axilab, AXIOcam MRC da ZEISS®, *software* Axiovision Rel 4.8.2 da ZEISS®/ Computador Acer® *Aspire one 722*). Com o auxílio do programa *ImageJ*® (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), em cada um destes campos, foi realizada a contagem das células exibindo dupla marcação CD68/HLA-DR e CD68/CD163. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se o número total de células apresentando dupla marcação CD68/HLA-DR e CD68/CD163. Finalmente, com este último dado, foi calculada a média de MATs M1 e M2 para cada caso.

Análise estatística

Os resultados obtidos com as análises clínicas, morfológicas e imunoistoquímicas foram submetidos à análise estatística, com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Estatísticas descritivas foram utilizadas para caracterizar a casuística.

Os dados obtidos com as quantificações dos MATs M1 (CD68/HLA-DR-positivos) e M2 (CD68/CD163-positivos) foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, possíveis diferenças entre as medianas para esses tipos celulares em relação aos parâmetros clínico-patológicos (tamanho do tumor primário, metástase linfonodal regional, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade) foram avaliadas por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Para isto, lesões classificadas como T2, T3 e T4 foram reunidas em um único grupo e comparadas a lesões classificadas como T1. De forma similar, tumores classificados como N1 e N2 foram reunidos em um único grupo e comparados com tumores classificados como N0. Em relação ao estadiamento clínico, casos em estádios iniciais (I e II) foram comparados com casos em estádios avançados (III e IV).

Para determinar possíveis correlações entre as quantidades de MATs M1 e M2 nos CCELI, foi empregado o teste de correlação de Spearman. Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, o nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0.05$).

RESULTADOS

Análise clínica e morfológica

Dos 30 casos de CCELI analisados no presente estudo, 24 (80,0%) foram diagnosticados em pacientes do sexo masculino e 6 (20,0%) em pacientes do sexo feminino, com proporção homem:mulher de 4:1. A idade dos pacientes variou de 26 a 86 anos, com uma média de $62,1 \pm 18,9$ anos. Em relação ao tamanho/ extensão do tumor e a metástase linfonodal regional, foi observada maior frequência de casos com classificação T2 (60,0%) e N0-Ausência de metástase linfonodal regional (50,0%). Por sua vez, metástase à distância não foi identificada em nenhum dos 30 casos. Com relação ao estadiamento clínico, constatou-se maior frequência dos estádios III (40,0%) e II (33,3%), seguidos dos estádios I (16,7%) e IV (10,0%) (Tabela 1). Em relação à gradação histopatológica de malignidade, a análise no *front* de invasão tumoral revelou 22 casos (73,3%) com alto grau de malignidade e 8 casos (26,7%) com baixo grau de malignidade (Tabela 1; Fig. 1A e B).

Análise imunoistoquímica

A análise dos MATs M1 no *front* de invasão tumoral revelou a presença destes tipos celulares em todos os casos de CCELI avaliados, com valores médios que variaram de 17,10 a 54,60 (Fig. 1C e D). De forma similar, todos os casos de CCELI analisados revelaram MATs M2, com valores médios que variaram de 12,40 a 64,00 (Fig. 1E e F).

Em relação ao tamanho dos tumores, para os MATs M1 foram constatadas medianas de 23,70 (variação: 18,80 – 35,30) para as lesões T1 e de 29,90 (variação: 17,10 – 54,60) para as lesões T2-T4. Por sua vez, para os MATs M2, tumores classificados como T1 revelaram mediana de 27,50 (variação: 18,00 – 40,80) e lesões classificadas como T2-T4 exibiram mediana de 35,40 (variação: 12,40 – 64,00). O teste não-paramétrico de Mann-Whitney revelou diferença estatisticamente significativa para os MATs M1, com uma maior quantidade destes tipos celulares nas lesões T2 – T4 em comparação com as lesões T1 ($p = 0,049$) (Tabela 2).

Em relação à metástase linfonodal regional, a análise dos MATs M1 revelou medianas de 26,80 (variação: 20,10 – 54,60) para os tumores N0 e de 35,30 (variação: 17,10 – 43,30) para os tumores N1 – N2. Para os MATs M2, lesões classificadas como N0 revelaram mediana de 37,30 (variação: 14,10 – 64,00) e lesões classificadas como N1 – N2 exibiram mediana de 27,50 (variação: 12,40 – 44,50). O teste não-paramétrico de Mann-Whitney não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação às quantidades de MATs M1 e M2 ($p = 0,917$ e $p = 0,110$, respectivamente) (Tabela 2 e 3).

Como a metástase à distância não foi identificada em nenhum dos 30 casos da presente amostra, não foi possível realizar análises estatísticas para avaliar possíveis diferenças na quantidade de MATs M1 e M2 em relação a este parâmetro clínico.

Considerando o estágio clínico, a análise dos MATs M1 revelou medianas de 26,80 (variação: 20,10 – 54,60) para lesões em estádios I – II e de 35,30 (variação: 17,10 – 43,30) para lesões em estádios III – IV. Para os MATs M2, casos classificados como estágio I – II exibiram mediana de 37,30 (variação: 14,10 – 64,00) e casos classificados como estágio III – IV apresentaram mediana de 27,50 (variação: 12,40 – 44,50). O teste não-paramétrico de Mann-Whitney não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação às quantidades de MATs M1 e M2 ($p = 0,917$ e $p = 0,110$, respectivamente) (Tabela 2 e 3).

Em relação ao grau histopatológico de malignidade, a avaliação dos MATs M1 demonstrou medianas de 24,95 (variação: 17,10 – 31,70) nos tumores de baixo grau e de 32,60 (variação: 18,80 – 54,60) nos tumores de alto grau de malignidade. Para os MATs M2, lesões de baixo grau de malignidade revelaram mediana de 24,55 (variação: 14,10 – 48,70) e lesões de alto grau exibiram mediana de 33,00 (variação: 12,40 – 64,00). O teste não-paramétrico de Mann-Whitney não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em relação às quantidades de MATs M1 e M2 ($p = 0,083$ e $p = 0,281$, respectivamente) (Tabela 2 e 3).

O teste de correlação de Spearman revelou uma fraca correlação positiva, estatisticamente significativa, entre as quantidades de MATs M1 e M2 nos CCELI ($r = 0,385$; $p = 0,036$).

DISCUSSÃO

Os anticorpos CD68, HLA-DR e CD163 são largamente utilizados para identificar macrófagos. No entanto, essas moléculas também são expressas por outros tipos celulares: células dendríticas imaturas CD1a-positivas (sensíveis ao CD68), linfócitos periféricos (reativos ao HLA-DR) e algumas células dendríticas (identificadas pelo CD163). Desta forma, postula-se que a dupla-coloração com os marcadores macrofágicos CD68/HLA-DR (MATs M1) ou CD68/CD163 (MATs M2) pode identificar mais especificamente os MATs (Wada et al., 2012).

Os MATs compõem a maior parcela celular do microambiente tumoral, produzindo várias citocinas que promovem imunossupressão e favorecem o crescimento e progressão tumoral. Por outro lado, os MATs podem também colaborar com uma efetiva resposta antitumoral. Isso pode ser resultado de diferenças no comportamento biológico entre diversas neoplasias e/ou mecanismos moleculares de escape imunológico (Baay et al., 2011; Costa et al., 2013).

A presença e aumento da infiltração de MATs concomitante ao aumento do tamanho/extensão do tumor em todos os casos de CCELI estudados são consistentes com os resultados do trabalho de Liu et al. (2008). Denota-se, portanto, no processo de desenvolvimento tumoral, a existência de um microambiente rico em fatores que favorecem a polarização e proliferação celular. No entanto diferença significativa só foi constatada no que diz respeito aos macrófagos M1, representando, assim, uma resposta inflamatória positiva do hospedeiro ao processo de carcinogênese em CCELI ao acreditar que os MATs M1 estão envolvidos na citotoxicidade desses tumores. Essa

capacidade citotóxica também pode favorecer a atração de outras células inflamatórias, como por exemplo, linfócitos, passíveis de desencadear uma resposta Th1, sendo mais uma vez favorável à contenção da expansão tumoral.

Desse modo, estudos indicam que os MATs, de forma dual, podem estar associados a um prognóstico favorável em pacientes com câncer de próstata e colo-retal ou, em outras neoplasias, podem contribuir para piores prognósticos como em pacientes com CCE de esôfago, orofaringe e cavidade oral (Shimura et al., 2000; Li et al., 2002; Marcus et al., 2004; Liu et al., 2008; Zhang et al., 2012; Costa et al., 2013).

Até o presente momento não há estudos que relacionem os MATs com desenvolvimento de metástases regionais em CCELI (Pubmed Database). No entanto, Li et al. (2002), Liu et al. (2008) e Marcus et al. (2004) demonstraram por imunoistoquímica associação significativa entre MATs e o desenvolvimento de linfonodos clinicamente positivos em CCEO e de orofaringe. Do mesmo modo e com dosagem de citocinas, Costa et al. (2013), verificaram diferença significativa entre o número de MATs e presença/ausência de metástase regional, sendo o subtipo M2 predominante nos casos com metástase. Isso indica o perfil pró-tumoral dos macrófagos M2, tendo em vista que esse fenótipo promove angiogênese, remodelação da matriz extracelular pela expressão de metaloproteinases de membrana (MMPs), condições que favorecem a disseminação neoplásica.

Por sua vez, Fujii et al. (2012) demonstraram em uma série de casos de CCEO não haver evidência de associação entre uma infiltração de MATs e desenvolvimento de metástase linfonodal regional.

Todavia, diante de tais informações contraditórias, ressalta-se que a presença de nódulos linfáticos clinicamente positivos ainda compreende importante indicador na predição da sobrevida do paciente (da Silveira et al., 2010).

Em seu estudo, El-Rouby (2010) ao analisar possível associação da angiogênese com CCEO e o carcinoma verrucoso, verificou maior reatividade aos MATs no CCEO, acompanhada por um aumento na densidade vascular. Isso fez com que se considerasse o potencial papel dos MATs na promoção do crescimento e metástase do CCEO, quando o carcinoma verrucoso é considerado uma variante de baixo grau do CCEO.

O estágio clínico da doença no diagnóstico inicial é fator determinante no resultado do tumor (da Silveira et al., 2010). Embora Fujii et al. (2012) tenham trabalhado com CCEO, verifica-se que os dados do estudo ora realizado corroboram seus resultados, uma vez que o aumento de MATs M1 em estágios mais avançados da doença é acompanhado por uma diminuição de MATs M2. Em uma metanálise da

literatura, Zhang et al. (2012) também demonstraram associação significativa entre elevada densidade de MATs e estágios mais avançados da doença em CCEO [RR= 1,49 (IC 95%, 1,17-1,89)]. Ainda, ao avaliar somente o subtipo macrofágico M2, nenhuma significância estatística foi encontrada.

Apesar do sistema TNM ser utilizado como auxiliar na determinação de protocolos terapêuticos e estimar sobrevida, nem sempre ele é capaz de estabelecer o desfecho clínico para pacientes com CCEO. Por isso, ferramentas complementares são utilizadas e aprimoradas com o objetivo de serem úteis na determinação do prognóstico para pacientes com esses tumores (Sobin, Wittekind, 2002). Nesse contexto, a gradação histopatológica de malignidade assume posição de destaque, uma vez que células com caráter mais agressivo são encontradas em zonas mais profundas (*front* de invasão tumoral), podendo predizer um provável comportamento da lesão como um todo (Bryne, 1998; da Silveira et al., 2010).

No presente estudo foi utilizado o sistema de gradação histopatológica de malignidade (SGHM) proposto por Bryne (1998), o qual verificou expressivo número de casos com alto grau de malignidade (n=22). Embora os MATs não tenham demonstrado diferenças significativas, a elevação do índice pode ser relacionada à existência de outras células inflamatórias e eventos moleculares capazes de modular o microambiente tumoral em favor do tumor.

Em conjunto os resultados do presente estudo sugerem que os MATs não estão envolvidos na invasão tumoral de CCELI, no entanto são importantes para compreensão do comportamento biológico do CCELI, sinalizando, assim, a necessidade de se investigar os diversos constituintes inflamatórios e não-inflamatórios do microambiente tumoral na busca de tratamentos individualizados e menos mutiladores, a fim de se obter melhor qualidade de vida para pacientes que padecem desta doença.

CONFLITOS DE INTERESSE

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Hospital Napoleão Laureano pela colaboração na coleta dos dados clínicos e espécimes utilizados no estudo. Agradecemos também o apoio financeiro oferecido pela CAPES.

REFERÊNCIAS

- Baay, M., et al., 2011. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clin Dev Immunol.* 2011, 565187.
- Bilkay, U., et al., 2003. Management of lower lip cancer: a retrospective analysis of 118 patients and review of the literature. *Ann Plast Surg.* 50, 43-50.
- Bryne, M., 1998. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Dis.* 4, 70-7.
- Cassetta, L., et al., 2011. Macrophage polarization in health and disease. *ScientificWorldJournal.* 11, 2391-402.
- Costa, N. L., et al., 2013. Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 49, 216-23.
- da Silveira, E. J., et al., 2010. Analysis of local immunity in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. *Exp Mol Pathol.* 88, 171-5.
- de Aquino, A. R., et al., 2012. Immunoeexpression of claudin-1 and Nm23-H1 in metastatic and nonmetastatic lower lip squamous-cell carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 20, 595-601.
- Eiro, N., Vizoso, F. J., 2012. Inflammation and cancer. *World J Gastrointest Surg.* 4, 62-72.
- El-Rouby, D. H., 2010. Association of macrophages with angiogenesis in oral verrucous and squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 39, 559-64.
- Fujii, N., et al., 2012. Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. *J Oral Pathol Med.* 41, 444-51.
- Gordon, S., 2007. The macrophage: past, present and future. *Eur J Immunol.* 37 Suppl 1, S9-17.
- Gutierrez-Pascual, M., et al., 2012. Squamous cell carcinoma of the lip. A retrospective study of 146 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 26, 1116-21.
- Hasson, O., 2008. Squamous cell carcinoma of the lower lip. *J Oral Maxillofac Surg.* 66, 1259-62.
- Li, C., et al., 2002. Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 9, 1219-23.
- Liu, S. Y., et al., 2008. Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 44, 277-85.
- Ma, J., et al., 2010. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer.* 10, 112.
- Mantovani, A., Sica, A., 2010. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr Opin Immunol.* 22, 231-7.
- Marcus, B., et al., 2004. Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 101, 2779-87.
- Marocchio, L. S., et al., 2010. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. *J Oral Sci.* 52, 267-73.
- Martinez, F. O., et al., 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu Rev Immunol.* 27, 451-83.
- Merry, R., et al., 2012. Oral health and pathology: a macrophage account. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 50, 2-7.
- Ortholan, C., et al., 2009. Oral cavity squamous cell carcinoma in 260 patients aged 80years or more. *Radiother Oncol.* 93, 516-23.

- Ribeiro, A. C., et al., 2009. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 47, 95-8.
- Salgarelli, A. C., et al., 2009. Surgical treatment of lip cancer: our experience with 106 cases. *J Oral Maxillofac Surg.* 67, 840-5.
- Shapiro, H., et al., 2011. Macrophages, meta-inflammation, and immuno-metabolism. *ScientificWorldJournal.* 11, 2509-29.
- Shimura, S., et al., 2000. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. *Cancer Res.* 60, 5857-61.
- Sica, A., 2010. Role of tumour-associated macrophages in cancer-related inflammation. *Exp Oncol.* 32, 153-8.
- Sica, A., et al., 2008. Macrophage polarization in tumour progression. *Semin Cancer Biol.* 18, 349-55.
- Sica, A., et al., 2012. Origin and Functions of Tumor-Associated Myeloid Cells (TAMCs). *Cancer Microenviron.* 5, 133-49.
- Silveira, E. J., et al., 2007. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol.* 15, 376-83.
- Sobin, L.H., Wittekind, C., 2002. TNM classification of malignant tumors. 6th ed. New York: John Wiley & Sons. 239p.
- Sobin, L.H., et al., 2011. TNM classification of malignant tumors. 7th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell. 336p.
- Souza, R. L., et al., 2011. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 16, e757-62.
- Vaupel, P., Mayer, A., 2007. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metastasis Rev.* 26, 225-39.
- Wada, N., et al., 2012. Tumour-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. *Histopathology.* 60, 313-9.
- Zhang, Q. W., et al., 2012. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. *PLoS One.* 7, e50946.

Quadro 1. 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 BM 95°C, 30 min	<i>60 minutos</i>
CD163	10D6	Novocastra	1:200	Citrato, pH 6,0 BM 95°C, 30 min	<i>60 minutos</i>
HLA-DR	TAL. 1B5	Dako	1:800	Citrato, pH 6,0 BM 95°C, 30 min	<i>60 minutos</i>

Tabela 1. Distribuição absoluta e relativa dos casos de carcinoma de células escamosas de lábio inferior de acordo com os parâmetros clínico-patológicos

Parâmetros clínico-patológicos	n (%)
Sexo	
<i>Masculino</i>	24 (80,0)
<i>Feminino</i>	6 (20,0)
Tumor	
<i>T1</i>	9 (30,0)
<i>T2</i>	18 (60,0)
<i>T3</i>	2 (6,7)
<i>T4</i>	1 (3,3)
Nodo	
<i>N0</i>	15 (50,0)
<i>N1</i>	13 (43,3)
<i>N2</i>	2 (6,7)
<i>N3</i>	0 (0,0)
Metástase	
<i>M0</i>	30 (100,0)
<i>M1</i>	0 (0,0)
Estádio clínico	
<i>Estádio I</i>	5 (16,7)
<i>Estádio II</i>	10 (33,3)
<i>Estádio III</i>	12 (40,0)
<i>Estádio IV</i>	3 (10,0)
Grau histopatológico de malignidade	
<i>Baixo grau</i>	8 (26,7)
<i>Alto grau</i>	22 (73,3)

Tabela 2. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (*p*) para a quantidade de MATs M1 em relação aos parâmetros clínico-patológicos.

Parâmetros clínico-patológicos	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	Soma dos postos	U	<i>p</i>
Tamanho do tumor							
<i>T1</i>	9	23,70	20,75 – 29,25	10,67	96,00	51,00	0,049
<i>T2 – T4</i>	21	29,90	23,40 – 40,60	17,57	369,00		
Metástase regional							
<i>N0</i>	15	26,80	23,50 – 31,70	15,33	230,00	110,00	0,917
<i>N1 – N2</i>	15	35,30	21,40 – 40,50	15,67	235,00		
Estádio clínico							
<i>I – II</i>	15	26,80	23,50 – 31,70	15,33	230,00	110,00	0,917
<i>III – IV</i>	15	35,30	21,40 – 40,50	15,67	235,00		
Grau histopatológico de malignidade							
<i>Baixo grau</i>	8	24,95	20,95 – 27,70	10,88	87,00	51,00	0,083
<i>Alto grau</i>	22	32,60	22,65 – 40,55	17,18	378,00		

Tabela 3. Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (*p*) para a quantidade de MATs M2 em relação aos parâmetros clínico-patológicos.

Parâmetros clínico-patológicos	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	Soma dos postos	U	<i>p</i>
Tamanho do tumor							
<i>T1</i>	9	27,50	20,10 – 32,65	12,22	110,00	65,00	0,182
<i>T2 – T4</i>	21	35,40	25,00 – 43,40	16,90	355,00		
Metástase regional							
<i>N0</i>	15	37,30	25,90 – 42,50	18,07	271,00	74,00	0,110
<i>N1 – N2</i>	15	27,50	18,00 – 35,40	12,93	194,00		
Estádio clínico							
<i>I – II</i>	15	37,30	25,90 – 42,50	18,07	271,00	74,00	0,110
<i>III – IV</i>	15	27,50	18,00 – 35,40	12,93	194,00		
Grau histopatológico de malignidade							
<i>Baixo grau</i>	8	24,55	17,15 – 39,20	12,63	101,00	65,00	0,281
<i>Alto grau</i>	22	33,30	26,80 – 40,85	16,55	364,00		

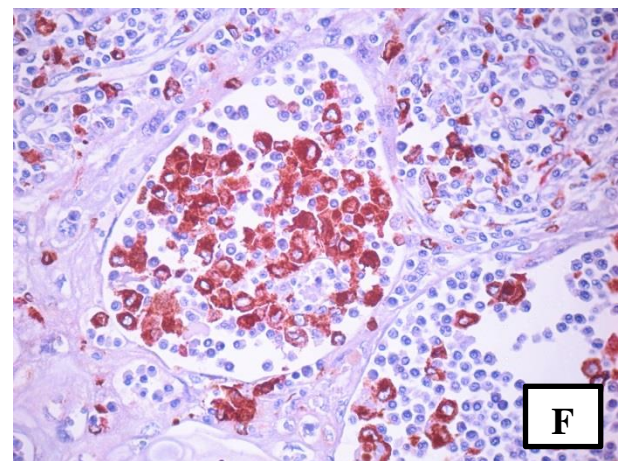
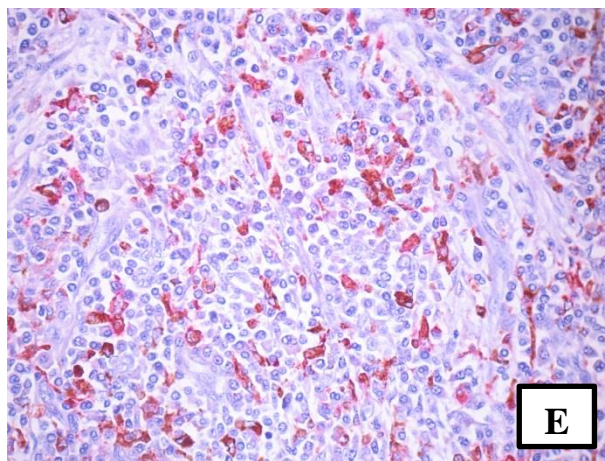
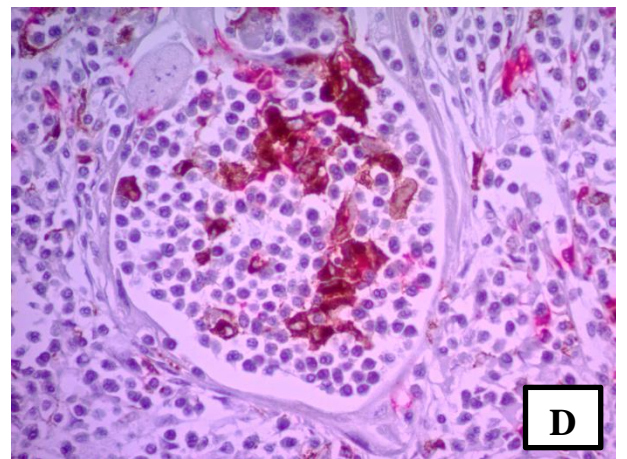
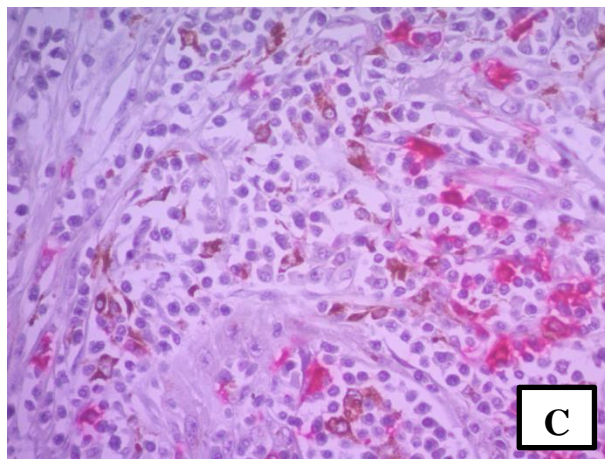
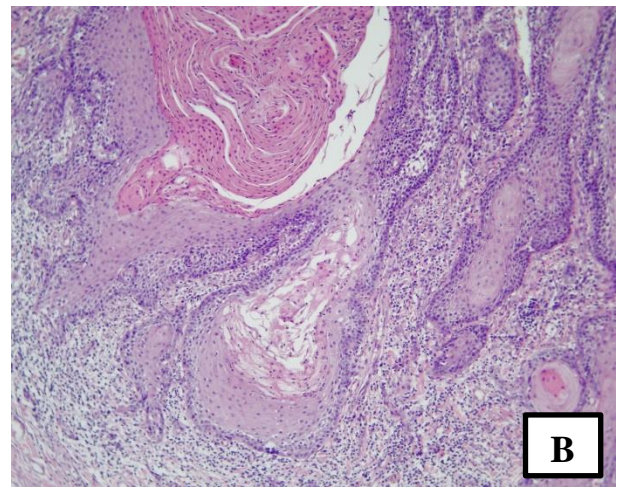
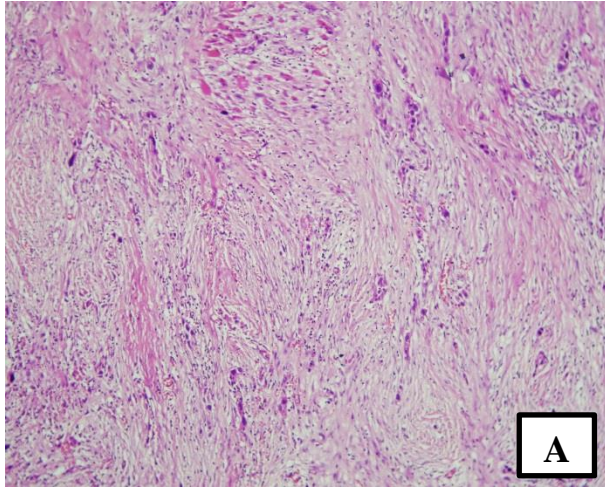


Figura 1. A) Fotomicrografia do *front* de invasão de CCELI de alto grau de malignidade (H/E,100×). B) Fotomicrografia do *front* de invasão de CCELI de baixo grau de malignidade (H/E,100×). C) e D) Fotomicrografia de MATs M1 no *front* de invasão de CCELI (CD68/HLA-DR+,400×). E) e F) Fotomicrografia de MATs M2 no *front* de invasão de CCELI (CD68/CD163+,400×).



Considerações Finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS


Apresentando facilidade para diagnóstico através de observação direta, o CCELI ainda possui elevada frequência de acometimento, tornando seu tratamento mais oneroso e mutilador ao paciente.

Lesões que poderiam ser diagnosticadas precocemente são negligenciadas e identificadas em momento seguinte quando já se tem avanço local e/ou sistêmico da doença, fazendo com que o prognóstico se torne mais sombrio, além de diminuição nas taxas de sobrevida.

A invasão tumoral está associada a diversos mecanismos de escape imunológico. Dentre as alterações de adesão célula-célula, remodelação da matriz extracelular e transição epitélio-mesenquimal, os MATs assumem posição de destaque. Sua atividade dual estabelece relação positiva ou negativa em diversas neoplasias epiteliais.

No entanto a ausência de relação entre MATs e metástase linfonodal regional em CCELI não exclui a participação destas células no processo de invasão tumoral, pois fatores secretados por MATs podem favorecer inúmeros mecanismos de imunossupressão local e sistêmica ou, ainda, a expressão fenotípica de outras células inflamatórias que provavelmente podem trabalhar em favor do crescimento, remodelação e invasão tumoral.

Ao tentar verificar possível relação entre MATs e o envolvimento linfonodal regional em CCELI, o presente estudo se torna desbravador do assunto, incentivando o desenvolvimento de mais investigações dos diversos componentes do microambiente tumoral, sendo capazes de sinalizar caminhos que busquem aprimorar e individualizar tratamentos para o câncer, a fim de se obter melhor qualidade de vida para pacientes que padecem desta doença.



Referências

REFERÊNCIAS

1. BAAY, M. et al. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. **Clin Dev Immunol**, v. 2011, n. 2011, p. 1-12, Sep 2011.
2. 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, Jan 2003.
3. BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1501p. 2011.
4. BRYNE, M. Prognostic value of various molecular and cellular features in oral squamous cell carcinomas: a review. **J Oral Pathol Med**, v. 20, n. 9, p. 413-20, Oct 1991.
5. _____. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Dis**, v. 4, n. 2, p. 70-7, Jun 1998.
6. CASSETTA, L.; CASSOL, E.; POLI, G. Macrophage polarization in health and disease. **ScientificWorldJournal**, v. 11, p. 2391-402, Dec 2011.
7. 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, Mar 2013
8. CHEN, T. C. et al. The clinical predictive factors for subsequent distant metastasis in patients with locoregionally advanced oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 49, n. 4, p. 367-73, Apr 2013.
9. DAHER, G.C.A.; PEREIRA, G.A.; OLIVEIRA, A.C.A. Características epidemiológicas de casos de câncer de boca registrados em hospital de Uberaba no período 1999-2003: um alerta para a necessidade de diagnóstico precoce. **Rev Bras Epidemiol**, v. 11, n. 4, p. 584-96, Dez 2008.
10. DE AQUINO, A. R. et al. Immunoexpression of claudin-1 and Nm23-H1 in metastatic and nonmetastatic lower lip squamous-cell carcinoma. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 20, n. 6, p. 595-601, Dec 2012.
11. EIRO, N.; VIZOSO, F. J. Inflammation and câncer. **World J Gastrointest Surg**, v. 4, n. 3, p. 62-72, Mar 2012.
12. EL-ROUBY, D. H. Association of macrophages with angiogenesis in oral verrucous and squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med**, v. 39, n. 7, p. 559-64, Aug 1 2010.
13. 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, Jul 2012.

14. GARINIS, G. A.; JANS, J.; VAN DER HORST, G. T. Photolyases: capturing the light to battle skin cancer. **Future Oncol**, v. 2, n. 2, p. 191-9, Apr 2006.
15. GORDON, S. The macrophage: past, present and future. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 1, p. S9–S17, Nov 2007.
16. GUTIERREZ-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, Sep 2012
17. HASSON, O. Squamous cell carcinoma of the lower lip. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 6, p. 1259-62, Jun 2008.
18. HORTA, M.C.R. et al. p53 and p21WAF1/CIP1 overexpression at the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 36, n. 2, p. 88–92, Feb 2007.
19. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil** . Rio de Janeiro : INCA, 2011. 118 p.
20. 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.3330–37, Jul 2009.
21. KAWAHARA, A. et al. Infiltration of thymidine phosphorylase-positive macrophages is closely associated with tumor angiogenesis and survival in intestinal type gastric cancer. **Oncol Rep**, v. 24, n. 2, p. 405-15, Aug 2010.
22. KURAHARA, H. et al. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. **J Surg Res**, v. 167, n. 2, p. e211-9, May 15 2011.
23. LISSBRANT, I.F. et al. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. **Int J Oncol**, v. 17, n.3, p.445–51, Sep 2000.
24. LUCENA, E. E. S. et al. Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. **Oral Dis**, v. 18,n. 6, p. 575-9, Sep 2012.
25. 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, Mar 2010.
26. MAROCCHIO, L. S. et al. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. **J Oral Sci**, v. 52, n. 2, p. 267-73, Jun 2010.
27. MANTOVANI, A.; SICA, A. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 2, p. 231-7, Apr 2010.

28. _____; SICA, A.; ALLAVENA, P. Inflammation and cancer: from bench to bedside? **J Support Oncol**, v. 5, n. 4, p. 164-5, Apr 2007.
29. MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 451-83, 2009.
30. MARTINS, M.A.T. et al. Avaliação do conhecimento sobre o câncer bucal entre universitários. **Rev Bras Cir Cabeça Pescoço**, v. 37, n. 4, p. 191-7, out-dez 2008.
31. MERRY, R. et al. Oral health and pathology: a macrophage account. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 50, n. 1, p. 2-7, Jan 2012
32. MUKHTAR, R.A.; NSEYO, O.; CAMPBELL, M.J. et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics. **Expert Rev Mol Diagn**, v.11, n.1, p. 91–100, Jan 2011.
33. NISHIE, A. et al. Macrophage infiltration and heme oxygenase-1 expression correlate with angiogenesis in human gliomas. **Clin Cancer Res**, v.5, n.5, p.1107–13, May 1999.
34. ORTHOLAN, C. et al. Oral cavity squamous cell carcinoma in 260 patients aged 80years or more. **Radiother Oncol**, v. 93, n. 3, p. 516-23, Dec 2009.
35. RIBEIRO, A.C.P. et al. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people – a descriptive study in Brazilians. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 47, n. 2, p. 95-8, Mar 2009.
36. RYDER, M. et al. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 15, n. 4, p. 1069-74, Dec 2008.
37. 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, Apr 2009
38. SHAPIRO, H.; LUTATY, A.; ARIEL, A. Macrophages, meta-inflammation, and immuno-metabolism. **ScientificWorldJournal**, v. 11, p. 2509-29, Dec 2011.
39. SICA, A. Role of tumour-associated macrophages in cancer-related inflammation. **Exp Oncol**, v. 32, n. 3, p. 153-8, Sep 2010.
40. _____. et al. Macrophage polarization in tumour progression. **Semin Cancer Biol**, v. 18, n. 5, p. 349-55, Oct 2008.
41. _____. et al. Origin and Functions of Tumor-Associated Myeloid Cells (TAMCs). **Cancer Microenviron**, v. 5, n. 2, p. 133-49, Aug 2012.

42. SILVEIRA, E. J. et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. **Int J Surg Pathol**, v. 15, n. 4, p. 376-83, Oct 2007
43. SOBIN, L.H.; GOSPODAROWICZ, M.K., WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumors**. 7th ed. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell; 2011. 336p.
44. 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, Sep 2011.
45. VAUPEL, P.; MAYER, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. **Cancer Metastasis Rev**, v. 26, n. 2, p. 225-39, Jun 2007.
46. WAMER, W. G.; WEI, R. R. In vitro photooxidation of nucleic acids by ultraviolet A radiation. **Photochem Photobiol**, v. 65, n. 3, p. 560-3, Mar 1997.
47. ZHANG, Q. W. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e50946, Dec 2012.



Apêndices

APÊNDICE A

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
FICHA INDIVIDUAL

CONTROLE DE IDENTIFICAÇÃO

NºFICHA: _____ NºPRONTUARIO: _____ NºPEÇA: _____

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

1. Sexo: 0() Masculino 1() Feminino
2. Idade: _____ anos
3. Raça: 0() Branco 1() Amarelo 2() Pardo 3() Indígena 4() Preto/Negra
(IBGE, 2010)
4. T: _____ N: _____ M: _____
5. Estádio da lesão: 0() Estádio 0 1() Estádio I 2() Estádio II
3() Estádio III 4() Estádio IV
() Estádio IVA () Estádio IVB () Estádio IVC
(Sobin; Gospodarowicz; Wittekind, 2011)

ASPECTO MORFOLÓGICO E GRADUAÇÃO DE MALIGNIDADE

LÂMINA HE: _____

1. Grau de ceratinização

- 0() Escore 1 – Altamente ceratinizada (mais de 50% das células)
1() Escore 2 – Moderada ceratinizada (20 a 50% das células)
2() Escore 3 – Mínima ceratinização (5 a 20% das células)
3() Escore 4 – Nenhuma ceratinização (0 a 5% das células)

2. Pleomorfismo nuclear

- 0() Escore 1 – Pouco pleomorfismo nuclear (Mais de 75% das células maduras)
1() Escore 2 – Moderado pleomorfismo nuclear (50 a 75% das células maduras)
2() Escore 3 – Abundante pleomorfismo nuclear (25 a 50% das células maduras)
3() Escore 4 – Extremo pleomorfismo nuclear (0 a 25% das células maduras)

3. Padrão de invasão:

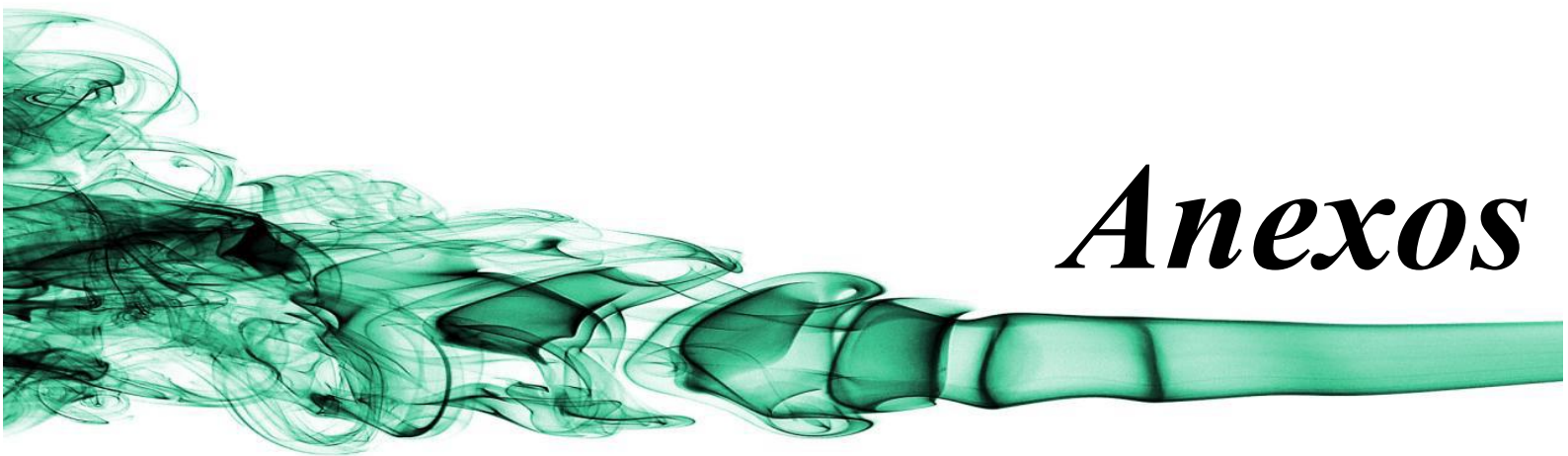
- 0() Escore 1 – Bordas infiltrativas bem delimitadas
1() Escore 2 – Cordões, bandas e/ou trabéculas sólidas infiltrativas
2() Escore 3 – Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (n>15)
3() Escore 4 – Dissociação celular difusa e profunda em pequenos grupos e/ou células individuais (n<15)

4. Infiltrado inflamatório

- 0() Escore 1 – Infiltrado intenso
1() Escore 2 – Infiltrado moderado
2() Escore 3 – Infiltrado escasso
3() Escore 4 – Infiltrado ausente

0() Baixo grau [escore de 4 a 8] 1() Alto grau [escore acima de 9]

(Bryne, 1998; Silveira et al., 2007)

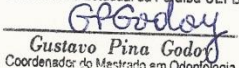
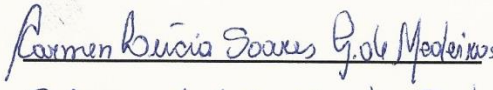
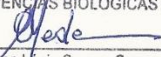


Anexos



MINISTÉRIO DA SAÚDE - Conselho Nacional de Saúde - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

FOLHA DE ROSTO PARA PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. Projeto de Pesquisa: Análise imuno-histoquímica das subpopulações M1 e M2 de macrófagos associados a tumores (MAT) em carcinomas de células escamosas de lábio inferior		2. CAAE:	
3. Área Temática:			
4. Área do Conhecimento: Grande Área 4. Ciências da Saúde			
PESQUISADOR RESPONSÁVEL			
5. Nome: Gustavo Pina Godoy			
6. CPF: 857.629.974-72		7. Endereço (Rua, n.º): CAPITAO JOAO ALVES DE LIRA 1325 BELA VISTA APTO 402 CAMPINA GRANDE PARAIBA 58428800	
8. Nacionalidade: BRASILEIRA	9. Telefone: (83) 3321-9616	10. Outro Telefone:	11. Email: gruiga@hotmail.com
12. Cargo: COORDENADOR DO MESTRADO EM ODONTOLOGIA DA UEPB			
<p>Termo de Compromisso: Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo e a publicar os resultados sejam eles favoráveis ou não. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto acima. Tenho ciência que essa folha será anexada ao projeto devidamente assinada por todos os responsáveis e fará parte integrante da documentação do mesmo.</p>			
Data: <u>24 / 05 / 12</u>		Universidade Estadual da Paraíba-UEPB  Gustavo Pina Godoy Coordenador do Mestrado em Odontologia	
Assinatura			
INSTITUIÇÃO PROPONENTE			
13. Nome: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB / Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesqui		14. CNPJ: 12.671.814/0001-37	15. Unidade/Órgão: DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
16. Telefone: (83) 3315-3373		17. Outro Telefone: (83) 33153326	
<p>Termo de Compromisso (do responsável pela instituição): Declaro que conheço e cumprirei os requisitos da Resolução CNS 196/96 e suas Complementares e como esta instituição tem condições para o desenvolvimento deste projeto, autorizo sua execução.</p>			
Responsável: 		CPF: <u>675044504-72</u>	
Cargo/Função: <u>Professora (Chefe Adjunta Depto.)</u>		UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  Profª Dra. Carmen Lúcia Soares Gomes de Medeiros Chefe Adjunta do Deptº de Odontologia	
Data: <u>24 / 05 / 2012</u>		Assinatura	
PATROCINADOR PRINCIPAL			
Não se aplica.			