



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

**CÉLULAS T REGULATÓRIAS (FOXP3+) E SUA RELAÇÃO COM PARÂMETROS
CLÍNICO-PATOLÓGICOS EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE
LÁBIO INFERIOR – ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO**

FERNANDO ANTONIO PORTELA DA CUNHA FILHO

CAMPINA GRANDE/ PB

2015

FERNANDO ANTONIO PORTELA DA CUNHA FILHO

**CÉLULAS T REGULATÓRIAS (FOXP3+) E SUA RELAÇÃO COM PARÂMETROS
CLÍNICO-PATOLÓGICOS EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE
LÁBIO INFERIOR – ESTUDO 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

Coorientador: Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez

CAMPINA GRANDE/ PB

2015

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.

C972c Cunha Filho, Fernando Antonio Portela da.
Células T regulatórias (foxp3+) e sua relação com parâmetros clínico-patológicos em carcinomas de células escamosas de lábio inferior – Estudo Imunoistoquímico [manuscrito] / Fernando Antonio Portela da Cunha Filho. - 2015.

76 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2015.

"Orientação: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa".

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Neoplasias labiais. 3. Linfócitos T. 4. Imunoistoquímica. I. Título.

21. ed. CDD 617.6

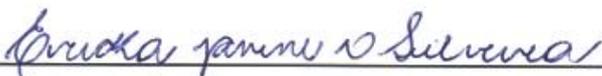
FERNANDO ANTONIO PORTELA DA CUNHA FILHO

**CÉLULAS T REGULATÓRIAS E SUA RELAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICO-
PATOLÓGICOS EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO
INFERIOR – ESTUDO 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.

Aprovado em 28/07/2015

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Éricka Janine Dantas da Silveira / UFRN

Membro titular (1º Examinador)



Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves / UEPB

Membro titular (2ª Examinador)



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka / UEPB

Membro titular (Orientador)

Dedicatória

DEDICATÓRIA

*Dedico a meus Pais, Maristela Viana, Denis Soares e
Fernando Portela, pelo apoio, incentivo e compreensão
em todas as etapas da minha vida. Vocês são exemplos a
serem seguidos!*

*E a Deus, por ter me possibilitado força e fé para
conquistar mais uma vitória em minha vida.*

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas contribuíram para que este momento se tornasse realidade.

Aos meus pais pelas palavras de incentivo que sempre dirigiram a mim.

À minha esposa. Sei o quanto foi difícil para você a minha ausência, no entanto, você sempre me incentivou e ajudou com carinho e compreensão nos momentos mais difíceis.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka. O senhor é um exemplo a ser seguido por todos, não só pela sua indiscutível capacidade intelectual e acadêmica, mas como uma pessoa justa e fraterna.

Obrigado ao meu coorientador, Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez. Sempre que necessitei, você estava pronto para me atender. Muito obrigado.

Agradeço aos membros da banca examinadora, Prof. Dra. Éricka Janine Dantas da Silveira e Prof. Dra. Pollianna Muniz Alves por terem aceitado participar e contribuir com seus conhecimentos para o engrandecimento deste trabalho.

Aos meus colegas de turma. Vocês foram essenciais proporcionando momentos de descontração ao longo de nossa árdua caminhada.

Obrigado a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), seus conhecimentos foram muito importantes para o meu crescimento.

Agradeço Hellen Bandeira de Pontes Santos pela sua presteza com os desafios encontrados no laboratório e a todos os funcionários do Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB, sem a ajuda de vocês não poderíamos ter realizado este trabalho.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelos auxílios financeiros que possibilitaram a realização deste trabalho e ao Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano, pelos casos gentilmente cedidos para a realização desta pesquisa.

Resumo

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCE) de lábio inferior é uma das neoplasias malignas mais comuns da região de cabeça e pescoço. Apesar disso, vários aspectos relacionados à progressão dessa lesão permanecem incompletamente compreendidos. Evidências mostram que as células T regulatórias (Tregs), por desempenharem importante papel na supressão da atividade de diversas células do sistema imune, podem estar envolvidas na progressão tumoral e associadas ao comportamento biológico mais agressivo em várias neoplasias. Apesar desses achados, investigações a respeito da presença desses tipos celulares nos CCEs de lábio inferior são escassas. O objetivo deste estudo foi avaliar, por meio de imunistoquímica, a quantidade de células Tregs (FoxP3+) no microambiente de CCEs de lábio inferior e relacioná-la com parâmetros clínico-patológicos (tamanho/ extensão do tumor, metástase em nodos regionais, metástase à distância, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade). A amostra foi constituída por 50 casos de CCE de lábio inferior. Os dados clínicos foram obtidos a partir dos prontuários médicos dos pacientes e o grau histopatológico de malignidade da lesão foi avaliado no *front* de invasão tumoral, de acordo com o sistema proposto por Bryne *et al.* (1992). Para o estudo imunistoquímico, foram quantificados, em 10 campos microscópicos ao longo do *front* de invasão tumoral, os linfócitos exibindo positividade nuclear para o FoxP3 e, em seguida, determinada a média de células Tregs para cada caso. As comparações das medianas das células Tregs em relação aos parâmetros clínico-patológicos foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Possíveis associações do grau histopatológico de malignidade das lesões com os parâmetros clínicos foram avaliadas por meio do teste exato de Fisher. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$). A maioria dos CCEs de lábio inferior sem metástase nodal regional ($n = 17$; 81,0%) foram classificados como de baixo grau de malignidade ($p < 0,001$). Por sua vez, a maioria dos pacientes nos estágios III e IV ($n = 22$; 84,6%) apresentaram tumores de alto grau de malignidade ($p < 0,001$). Foram observados linfócitos FoxP3+ em todos os casos avaliados, com uma tendência a uma maior quantidade destes tipos celulares, sem diferenças estatisticamente significativas, em lesões de menor tamanho, sem metástase nodal regional e em estágios clínicos iniciais ($p > 0,05$). Lesões de baixo grau de malignidade revelaram maior quantidade de linfócitos FoxP3+ em comparação com as de alto grau ($p = 0,019$), com medianas de 16,00 e 6,60, respectivamente. Tumores com intenso infiltrado inflamatório exibiram maior mediana de linfócitos FoxP3+ ($p = 0,035$). De forma similar, CCEs de lábio inferior com bordas infiltrativas bem delimitadas ou arranjos em cordões, bandas e/ ou trabéculas sólidas revelaram maior mediana de linfócitos FoxP3+ em comparação com tumores arranjos em pequenos grupos celulares ($p = 0,003$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na quantidade de linfócitos FoxP3+ em relação ao grau de ceratinização ($p = 0,525$) e ao grau de pleomorfismo nuclear ($p = 0,343$) nas lesões. Os resultados do presente estudo sugerem a participação das células Tregs na modulação das respostas imunes e inflamatórias no microambiente dos CCEs de lábio inferior. O papel desempenhado por estas células pode ser mais importante em estágios iniciais do que em estágios avançados da carcinogênese labial.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas, neoplasias labiais, linfócitos T, estadiamento de neoplasias, gradação de tumores, imunistoquímica.

Abstract

ABSTRACT

The squamous cell carcinoma (SCC) of lower lip is one of the most common malignancies of the head and neck region. Nevertheless, several aspects related to the progression of this lesion remain incompletely understood. Evidence shows that regulatory T cells (Tregs) play a major role in the suppression of the activity of various immune system cells, they may be involved in tumor progression and associated with the most aggressive biological behavior of various tumors. Despite these findings, there are few studies about the presence of these cell types in the SCC of lower lip. The objective of this study was to evaluate, through immunohistochemistry, the amount of Tregs cells (FoxP3+) in the microenvironment of SCCs of the lower lip and to relate this with clinicopathological parameters (tumor size / extent, regional nodal metastasis, distant metastasis, clinical stage and histopathological grade of malignancy). The sample consisted of 50 cases of SCC of the lower lip. Clinical data were obtained from medical records of patients and the histopathological grade of malignancy of the lesion was evaluated in the invasive front, according to the system proposed by Bryne *et al.* (1992). For the immunohistochemical study, lymphocytes exhibiting nuclear positivity for FoxP3 were counted in 10 microscopic fields at the tumor invasive front and the mean value was calculated for each case. Comparisons of the medians of Tregs cells according to clinicopathological parameters were performed using the nonparametric Mann-Whitney test. Possible associations between histopathological grade of malignancy and clinical parameters were analyzed by Fisher's exact test. The level of significance was set at 5% ($p < 0.05$). Most SCCs of the lower lip without regional nodal metastasis ($n = 17$; 81.0%) were classified as low-grade malignancy ($p < 0.001$). In turn, the majority of patients in stages III and IV ($n = 22$; 84.6%) had high-grade tumors ($p < 0.001$). FoxP3+ lymphocytes were observed in all cases evaluated, with a tendency for higher amounts of these cell types, although not statistically significant, in lesions of small size, without regional nodal metastasis, and in early clinical stages ($p > 0.05$). Low-grade malignancy lesions revealed higher amount of FoxP3+ lymphocytes in comparison with high-grade tumors ($p = 0.019$), with medians of 16.00 and 6.60, respectively. Tumors with intense inflammatory infiltrate exhibited higher median of FoxP3+ lymphocytes ($p = 0.035$). Similarly, SCCs of the lower lip with well-delineated infiltrating borders or arranged in solid cords, bands and/ or strands showed greater median of FoxP3+ lymphocytes compared to tumors arranged in small groups ($p = 0.003$). No statistically significant differences were observed in the amount of FoxP3+ lymphocytes in relation to the degree of keratinization ($p = 0.525$) and the degree of nuclear pleomorphism ($p = 0.343$) in the lesions. The results of this study suggest the involvement of Treg cells in the modulation of immune and inflammatory responses in the microenvironment of SCCs of the lower lip. The role of these cells may be more important in the initial stages than in the advanced stages of lip carcinogenesis.

Key-words: Squamous cell carcinoma, lip neoplasms, T-lymphocytes, neoplasm staging, neoplasm grading, immunohistochemistry.

Lista de Ilustrações

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Quadro 1. Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.....	31
Quadro 2. Variável dependente analisada no estudo.....	31
Quadro 3. Sistema de estadiamento clínico TNM para o carcinoma de células escamosas de lábio, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).....	32
Quadro 4. Categorias de estadiamento clínico TNM para o carcinoma de células escamosas de lábio, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).....	33
Quadro 5. Sistema de gradação histopatológica de malignidade no <i>front</i> de invasão, proposto por Bryne <i>et al.</i> (1992).....	33
Quadro 6. Especificidade, nº do catálogo, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação do anticorpo primário utilizado no estudo.....	34
Figura 1. (A) Linfócitos FoxP3+ (setas) no <i>front</i> de invasão de CCE de lábio inferior de baixo grau de malignidade com intenso infiltrado inflamatório (Advance, × 400). (B) Linfócitos FoxP3+ (setas) no <i>front</i> de invasão de CCE de lábio inferior de alto grau de malignidade com escasso infiltrado inflamatório (Advance, × 400).....	53
Figura 2. Gráficos box-plot da quantidade de linfócitos FoxP3+ nos carcinomas de células escamosas de lábio inferior de acordo com o tamanho do tumor, a metástase linfonodal regional, o estágio clínico e o grau histopatológico de malignidade.....	54
Figura 3. Gráficos box-plot da quantidade de linfócitos FoxP3+ nos carcinomas de células escamosas de lábio inferior de acordo com o grau de ceratinização, o grau de pleomorfismo nuclear, o padrão de invasão e a intensidade do infiltrado inflamatório.....	55

Lista de Tabelas

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Distribuição absoluta e relativa dos casos de carcinoma de células escamosas de lábio inferior de acordo com os parâmetros clínico-patológicos.....	52

Lista de Abreviações e Siglas

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

- **APC:** Do inglês *antigen-presenting cell*, traduzido como célula apresentadora de antígeno.
- **BSA:** Do inglês *bovine serum albumin*, traduzido como albumina de soro bovino.
- **CA:** Califórnia (Estado Americano).
- **CCE:** Carcinoma de células escamosas.
- **CD4:** Do inglês *cluster of differentiation 4*, traduzido como grupamento de diferenciação 4.
- **CD8:** Do inglês *cluster of differentiation 8*, traduzido como grupamento de diferenciação 8.
- **CD25:** Do inglês *cluster of differentiation 25*, traduzido como grupamento de diferenciação 25.
- **DE:** Do alemão *Deutschland*, traduzido como Alemanha.
- **DNA:** Do inglês *deoxyribonucleic acid*, traduzido como ácido desoxirribonucleico.
- **FoxP3:** Do inglês *Forkhead box p3*, refere-se ao fator de transcrição FoxP3.
- **IL:** Illinois (Estado Americano).
- **IL-10:** Do inglês *interleukin-10*, traduzido como interleucina-10.
- **IL-35:** Do inglês *interleukin-35*, traduzido como interleucina-35.
- **M2:** Do inglês *macrophage cell phenotype 2*, traduzido como macrófago do fenótipo 2.
- **MD:** Maryland (Estado Americano).
- **MG:** Minas Gerais (Estado Brasileiro).
- **MO:** Missouri (Estado Americano).
- **NK:** *Natural Killer*.
- **NJ:** Do Inglês *New Jersey*, traduzindo Nova Jersey (Estado Americano).
- **PB:** Paraíba (Estado Brasileiro).
- **PBS:** Do inglês *phosphate buffered saline*, traduzido como tampão fosfato-salino.
- **Ph:** Potencial Hidrogeniônico.
- **RN:** Rio Grande do Norte (Estado Brasileiro).
- **SCC:** Do inglês *squamous cell carcinoma*, traduzido como carcinoma de células escamosas.

- **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.
- **TGF- β :** Do inglês *transforming growth factor- β* , traduzido como fator transformante de crescimento- β .
- **TNM:** Tumor-Nodo-Metástase.
- **Treg:** Do inglês *regulatory T cell*, traduzido como célula T regulatória.
- **UEPB:** Universidade Estadual da Paraíba.
- **UFMG:** Universidade Federal de Minas Gerais.
- **UFRN:** Universidade Federal do Rio Grande do Norte.
- **UK:** Do inglês *United Kingdom*, traduzido como Reino Unido.
- **USA:** Do inglês *United States of America*, traduzido como Estados Unidos da América.
- **UV:** Ultravioleta.
- **UVB:** Ultravioleta B.

Sumário

SUMÁRIO

	Página
1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	22
2 OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
3 METODOLOGIA	29
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	29
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	29
3.3 POPULAÇÃO.....	29
3.4 AMOSTRA.....	29
3.4.1 Critérios de inclusão	30
3.4.2 Critérios de exclusão	30
3.5 VARIÁVEIS.....	30
3.6 ESTUDO CLÍNICO.....	31
3.7 ESTUDO MORFOLÓGICO.....	33
3.8 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO.....	34
3.8.1 Método imunoistoquímico	34
3.8.2 Análise imunoistoquímica	36
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
4 ARTIGO	39
4.1 APRESENTAÇÃO.....	39
4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO.....	40
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	58
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICES	66
ANEXOS	70

Considerações Iniciais

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O carcinoma de células escamosas (CCE) de lábio inferior é uma neoplasia maligna frequente na região de cabeça e pescoço, representando cerca de 10,8% a 66,5% dos casos de câncer oral, a depender da região geográfica estudada (CZERNINSKI; ZINI; SGAN-COHEN, 2010; SOUZA *et al.*, 2011). Sua etiologia tem sido fortemente associada à exposição crônica à radiação solar ultravioleta (UV), especialmente a UVB (280-315nm) (CZERNINSKI; ZINI; SGAN-COHEN, 2010; SOUZA *et al.*, 2011). No entanto, hábitos parafuncionais, fatores sociodemográficos, imunossupressão e maior susceptibilidade genética podem atuar de maneira sinérgica, contribuindo para o desenvolvimento destas lesões (FIGUERO RUIZ *et al.*, 2004; MORSELLI *et al.*, 2007; VAN LEEUWEN *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2011).

A carcinogenicidade da radiação UVB é atribuída à formação de dímeros de pirimidina no ácido desoxirribonucleico (DNA), em especial, dímeros de timina (BRASILEIRO FILHO, 2011). Este tipo de lesão no DNA é corrigida pela via de excisão de nucleotídeos, mas com a exposição solar excessiva, a capacidade desta via de reparo é sobrepajada e, assim, parte da lesão do DNA não é corrigida (KUMAR *et al.*, 2010). Os dímeros de pirimidina podem ser formados em proto-oncogenes, genes supressores de tumor e genes reguladores da apoptose, e o desenvolvimento da neoplasia resulta de falha no reparo dessas mutações (KUMAR *et al.*, 2010). Além disso, tem sido demonstrado que a radiação UV não apenas atua nas fases de iniciação e promoção da carcinogênese, mas também interfere na resposta do sistema imune às células neoplásicas malignas (HO; MURPHY, 2008).

O CCE de lábio inferior é usualmente diagnosticado em indivíduos do sexo masculino, de pele clara e acima dos 50 anos de idade (BILKAY *et al.*, 2003; ANTUNES; ANTUNES, 2004; SOUZA *et al.*, 2011; GUTIÉRREZ-PASCUAL *et al.*, 2012). Embora essa lesão possa surgir *de novo*, muitos casos se originam a partir da transformação maligna de patologias pré-existentes, com destaque para a queilite actínica (SOUZA *et al.*, 2011). A sua localização anatômica em uma área de fácil visualização favorece o diagnóstico precoce. Porém, possivelmente em decorrência da ausência de sintomatologia, em muitos casos, o CCE de lábio inferior progride para estágios mais avançados antes do diagnóstico inicial (VUKADINOVIC *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2011).

Quando comparado com carcinomas intraorais, o CCE de lábio inferior apresenta um melhor prognóstico, com taxas de sobrevida em 5 anos que variam de 80% a 90%, se diagnosticado em estágios iniciais (KORNEVS *et al.*, 2005; SARGERAN *et al.*, 2009;

GUTIÉRREZ-PASCUAL *et al.*, 2012). Por outro lado, quando são identificadas metástases nodais regionais, apenas 25% a 50% dos pacientes atingem a sobrevida de 5 anos, configurando um pior prognóstico (BILKAY *et al.*, 2003; KORNEVS *et al.*, 2005; SARGERAN *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ-PASCUAL *et al.*, 2012).

A avaliação do tamanho/ extensão do tumor primário (T), das metástases em linfonodos regionais (N) e das metástases à distância, constitui a base do sistema de estadiamento clínico dos tumores (TNM) (SOBIN; WITEKIND, 2002). Esse sistema é o mais amplamente utilizado para guiar o planejamento do tratamento, estimar a resposta clínica à terapia e determinar a sobrevida dos pacientes (SOBIN; WITTEKIND, 2002; SAWAIR *et al.*, 2003; LOURENÇO *et al.*, 2007). No entanto, por vezes, casos com o mesmo estadiamento clínico TNM exibem cursos clínicos e desfechos distintos (JAMADAR *et al.*, 2014). Nesse sentido, com o objetivo de fornecer conhecimentos adicionais que pudessem explicar o comportamento biológico discrepante de neoplasias com aspectos clínicos aparentemente similares, foram desenvolvidos vários sistemas de gradação histopatológica de malignidade (SGHMs) (BRODERS, 1920; WAHI, 1971; CRISSMAN *et al.*, 1984; JAKOBSSON *et al.*, 1973; ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA, 1987; BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2005; ALMANGUSH *et al.*, 2015).

Dentre os diversos SGHMs existentes, merece destaque aquele proposto por Bryne *et al.* (1992). Este sistema, que pode ser utilizado em espécimes obtidos com biópsias incisionais, baseia-se na avaliação de quatro parâmetros (grau de ceratinização, padrão de invasão, pleomorfismo nuclear e infiltrado inflamatório) na área mais invasiva do tumor, denominada *front* de invasão (BRYNE, 1998). Para Bryne (1998), as características morfológicas no *front* de invasão poderiam refletir melhor o prognóstico dos carcinomas, já que vários eventos moleculares importantes ocorrem na interface tumor-hospedeiro, como aumento da proliferação celular, perdas e ganhos de moléculas de adesão, secreção de enzimas proteolíticas e angiogênese.

Diversas pesquisas avaliaram o potencial prognóstico do SGHM proposto por Bryne *et al.* (1992) em CCE orais, com resultados conflitantes (KUROKAWA *et al.*, 2005; SILVEIRA *et al.*, 2007; LINDENBLATT *et al.*, 2012; SAWAZAKI-CALONE *et al.*, 2015). Especificamente em CCEs de lábio inferior, Santos *et al.* (2014), em estudo com 59 casos desta neoplasia, encontraram associação estatisticamente significativa entre o baixo grau de malignidade das lesões e a ausência de metástases nodais regionais ($p = 0,030$) e o estágio clínico inicial ($p = 0,043$), bem como entre o alto grau de malignidade e o maior tamanho das lesões ($p = 0,040$).

Evidências acumuladas mostram que as interações entre as células do sistema imune e as células neoplásicas são capazes de modular a progressão e o desenvolvimento dos tumores (PIVA *et al.*, 2011; MORALES-KASTRESANA *et al.*, 2013; PIVA *et al.*, 2013; MARABELLE *et al.*, 2014). Por meio de um sistema complexo de alterações no microambiente tumoral, que envolve a participação de diversas células e mediadores químicos, as células neoplásicas são capazes de evadir a resposta imune antitumoral. Neste processo, as células neoplásicas recrutam vários tipos celulares para o microambiente tumoral que são capazes de suprimir a resposta imune, como os macrófagos M2, as células supressoras derivadas da linhagem mieloide e as células T regulatórias (Tregs) (DURAY *et al.*, 2010; SIMONSON; ALLISON, 2010; PIVA *et al.*, 2011; PIVA *et al.*, 2013).

As células Tregs são células da linhagem linfocítica que expressam constitutivamente as moléculas CD4, CD25 e o fator de transcrição nuclear *Forkhead box P3* (FoxP3). Este último é uma molécula essencial para que as células T se diferenciem em células Tregs e executem funções imunossupressoras (FONTENOT; GAVIN; RUDENSKY, 2003; HORI; NOMURA; SAKAGUCHI, 2003). Diversos estudos têm destacado o FoxP3 como um dos mais confiáveis marcadores para identificação das células Tregs (WADA *et al.*, 2010; SIMONSON; ALLISON, 2010; LUO; LI, 2013; HANAKAWA *et al.*, 2014).

As células Tregs podem suprimir uma grande variedade de células do sistema imune, incluindo linfócitos B, células *Natural Killer* (NK), células T CD4⁺ e T CD8⁺, bem como monócitos e células dendríticas (SCHMIDT; OBERLE; KRAMMER, 2012). Para desempenharem suas funções, as células Tregs possuem um verdadeiro arsenal de mecanismos regulatórios à disposição, os quais têm sido divididos em quatro categorias principais: citocinas inibitórias, citólise, modulação das funções das células apresentadoras de antígenos (APCs) e interrupção metabólica. A produção de citocinas inibitórias, como interleucina-10 (IL-10), interleucina-35 (IL-35) e fator transformante de crescimento- β (TGF- β), é considerada um dos principais mecanismos de supressão utilizados pelas células Tregs (TANG; BLUESTONE, 2008; SOJKA; HUANG; FOWELL, 2008; VIGNALI; COLLISON; WORKMAN, 2008; WORKMAN *et al.*, 2009).

Por desempenharem importante papel na supressão da resposta imune, as células Tregs têm sido implicadas na progressão tumoral e associadas ao comportamento biológico mais agressivo em diversas neoplasias (BATES *et al.*, 2006; STRAUSS *et al.*, 2007; SZCZEPANSKI *et al.*, 2009; HERMANS *et al.*, 2014). Neste sentido, diversos estudos sugerem que uma maior quantidade de células Tregs no microambiente tumoral pode estar relacionada a maior imunorregulação local, com conseqüente diminuição da resposta imunológica, culminando em

um pior prognóstico (BATES *et al.*, 2006; CHIKAMATSU *et al.*, 2007; STRAUSS *et al.*, 2007; XU *et al.*, 2010; GAUR *et al.*, 2012; HERMANS *et al.*, 2014).

Em CCEs de cavidade oral, uma maior quantidade de células Tregs tem sido associada com a presença de metástase nodal regional (GAUR *et al.*, 2012), estadiamento clínico avançado (GAUR *et al.*, 2012), baixas taxas de sobrevida geral (WATANABE *et al.*, 2010) e de sobrevida livre de doença (HANAKAWA *et al.*, 2014). Por outro lado, outras pesquisas evidenciaram que uma maior quantidade de células Tregs pode estar relacionada a um melhor prognóstico em CCEs de cavidade oral (LIM *et al.*, 2014; WOLF *et al.*, 2015). Apesar desses importantes achados, até a presente data (Pubmed Database – acesso em 13/07/2015), destacam-se apenas dois estudos que analisaram as células Tregs em CCEs de lábio inferior. Um desses estudos foi realizado com uma amostra relativamente pequena (n = 6) de CCEs de lábio inferior (MOREIRA *et al.*, 2010) e o outro não relacionou a quantidade dessas células com achados clínico-patológicos (KUALES *et al.*, 2011).

Dessa forma, o presente estudo se propôs a realizar uma análise, por meio de imunoistoquímica, da quantidade de células Tregs no microambiente de CCEs de lábio inferior, estabelecendo relações com parâmetros clínico-patológicos (tamanho/ extensão do tumor, metástase em nodos regionais, metástase à distância, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade). Pretendeu-se, com esta pesquisa, contribuir com mais esclarecimentos a respeito dos mecanismos relacionados à progressão tumoral nos CCEs de lábio inferior, fornecendo subsídios para uma possível aplicação das células Tregs como indicadores prognósticos ou como alvos potenciais para estratégias imunoterapêuticas nestas lesões.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo se propôs a realizar uma análise, por meio de imunohistoquímica, da quantidade de células Tregs (FoxP3+) no microambiente de CCEs de lábio inferior.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a presença e quantificar as células Tregs (FoxP3+) no *front* de invasão tumoral de CCEs de lábio inferior;
- Relacionar a quantidade de células Tregs (FoxP3+) nos CCEs de lábio inferior com parâmetros clínicos (tamanho/ extensão do tumor, metástase em nodos regionais, metástase à distância e estágio clínico);
- Avaliar possíveis diferenças na quantidade de células Tregs (FoxP3+) nos CCEs de lábio inferior de acordo com o grau histopatológico de malignidade dos tumores.
- Relacionar a quantidade de células Tregs (FoxP3+) em CCEs de lábio inferior com o grau de ceratinização, o grau de pleomorfismo nuclear, o padrão de invasão e a intensidade do infiltrado inflamatório nas lesões.

Metodologia

3 METODOLOGIA

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

A presente pesquisa foi cadastrada na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil) e submetida à análise de seu conteúdo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Conforme parecer nº 631.357 (ANEXO A), seu protocolo foi aprovado.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo desenvolvido consistiu em uma pesquisa de caráter observacional, analítica, com corte transversal, caracterizada pela análise, registro e quantificação das células Tregs, por meio da imunistoquímica, em CCEs de lábio inferior, estabelecendo-se relações com parâmetros clínicos (tamanho/ extensão do tumor, metástase em nodos regionais, 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 CCEs 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 Agosto de 2014.

3.4 AMOSTRA

Através de técnica de amostragem do tipo não probabilista, por conveniência, foram

selecionados 50 casos de CCEs de lábio inferior, todos emblocados em parafina.

3.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra, apenas os casos de CCEs de lábio inferior provenientes de ressecção cirúrgica, os quais possibilitaram a avaliação do *front* de invasão tumoral. Além disso, só foram incluídos no estudo os casos cujos prontuários continham informações relativas ao sexo e idade dos pacientes, bem como ao tamanho do tumor, metástase em nodos regionais, metástase à distância e estágio clínico.

3.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídas da amostra as lesões de pacientes submetidos previamente à radioterapia ou quimioterapia. Adicionalmente, foram excluídos da pesquisa os casos com quantidades insuficientes de material biológico para realização dos estudos morfológico e imunoistoquímico.

3.5 VARIÁVEIS

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

Quadro 1. Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Tamanho do tumor	Tamanho/ extensão do tumor primário	T1 T2 T3 T4
Metástase nodal regional	Metástase em linfonodos regionais	N0 N1 N2 N3
Metástase à distância	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 I Estádio II Estádio III Estádio IV
Grau histopatológico de malignidade	Classificação histopatológica do tumor considerando o grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório	Baixo grau de malignidade Alto grau de malignidade
Grau de ceratinização	Grau de ceratinização das células tumorais	Alto Moderado Baixo Ausente
Pleomorfismo nuclear	Grau de pleomorfismo nuclear das células tumorais	Pouco Moderado Intenso Extremo
Padrão de invasão	Padrão de invasão das células tumorais	Bordas bem delimitadas Cordões, bandas e/ ou trabéculas infiltrativas Pequenos grupos / cordões de células infiltrativas (n>15) Infiltração em pequenos grupos celulares e/ ou células individuais (n<15)
Infiltrado inflamatório	Intensidade do infiltrado inflamatório	Intenso Moderado Escasso Ausente

Quadro 2. Variável dependente analisada no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Células Tregs	Linfócitos, localizados no <i>front</i> de invasão tumoral, exibindo imunopositividade nuclear para FoxP3.	Número de células Tregs (FoxP3+)

3.6 ESTUDO CLÍNICO

Informações a respeito do sexo e idade dos pacientes, bem como em relação à presença de metástase em nodos regionais, metástase à distância e 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 carcinoma de células escamosas 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 carcinoma de células escamosas 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. Em sequência, os cortes teciduais 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 do grau histopatológico de malignidade, no *front* de invasão tumoral, de acordo com o sistema proposto por Bryne *et al.* (1992) (QUADRO 5).

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

Os escores obtidos em cada um dos parâmetros foram somados, obtendo-se o escore final de malignidade do caso. As lesões com escore final igual ou inferior 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). A análise da gradação histopatológica foi realizada sem que os examinadores tivessem conhecimento dos dados clínicos relacionados ao caso. Os casos cujas gradações histopatológicas de malignidade, determinadas pelos examinadores, apresentaram-se discordantes foram resolvidos por consenso. Os dados obtidos com esta avaliação foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE B).

3.8 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

3.8.1 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 preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropiltrióxido, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*ADVANCETM HRP*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), utilizando anticorpo monoclonal anti-FoxP3 (QUADRO 6).

Quadro 6. Especificidade, nº do catálogo, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação do anticorpo primário utilizado no estudo.

Especificidade	Nº catálogo	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
FoxP3	Ab22510	Abcam	1:150	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 30 min	60 minutos

Como controle positivo, foram utilizados cortes histológicos de tonsila. O controle negativo consistiu na substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão.

A técnica utilizada seguiu o 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)

⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);

⇒ Recuperação antigênica (QUADRO 6);

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);

⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);

⇒ 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);

⇒ Duas passagens em água destilada (5 minutos cada);

⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);

⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário, em solução diluente (*Antibody diluent with background reducing components*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA);

⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);

⇒ Incubação com anticorpo secundário (*ADVANCE™ HRP Link*, Dako North America Inc., Carpinteria, 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);
- ⇒ Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*ADVANCE™ HRP Enzyme*, Dako North America Inc., Carpinteria, 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) (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).

3.8.2 Análise imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, cada espécime foi analisado, sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), por dois examinadores previamente treinados. Destaca-se que a análise imunoistoquímica foi realizada sem que os examinadores tivessem conhecimento dos dados clínico-patológicos relacionados ao caso.

A análise das células Tregs (FoxP3+) foi realizada de forma quantitativa, com base em uma adaptação da metodologia utilizada por Schwarz *et al.* (2008). Primeiramente, ao longo do

front de invasão tumoral, sob aumento de 100×, foram selecionadas 10 áreas de maior imunorreatividade ao anticorpo anti-FoxP3. Sob aumento de 400×, cada uma dessas áreas foi fotomicrografada (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. Com o auxílio do programa *ImageJ*® (*Image Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA), em cada um dos campos fotomicrografados, foi realizada a contagem dos linfócitos exibindo imunomarcção nuclear para o FoxP3, independente da intensidade da coloração acastanhada. Os valores obtidos em cada um desses campos foram somados, estabelecendo-se o número total de linfócitos FoxP3+. Com esse último dado, foi calculada a média de células Tregs (FoxP3+) para cada caso. Os dados obtidos com esta avaliação foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE C).

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com os estudos clínicos, morfológicos e imunoistoquímicos foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Possíveis associações do grau histopatológico de malignidade das lesões com os parâmetros clínicos foram avaliadas por meio do teste exato de Fisher. Os dados obtidos com a contagem dos linfócitos FoxP3+ foram submetidos à análise de distribuição, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, as comparações das medianas das células Tregs de acordo com os diversos parâmetros clínico-patológicos foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Artigo

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 deste projeto, 1 artigo é apresentado nesta dissertação: **Células T regulatórias FoxP3+ e sua relação com parâmetros clínico-patológicos em carcinomas de células escamosas de lábio inferior**. O referido artigo será submetido ao periódico *Brazilian Dental Journal* (Qualis Odontologia B1), cujas normas para submissão de trabalhos se encontram no Anexo B.

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

Células T regulatórias FoxP3+ e sua relação com parâmetros clínico-patológicos em carcinomas de células escamosas de lábio inferior

Fernando Antonio Portela da Cunha Filho¹, Maria Cássia Ferreira de Aguiar², Leão Pereira Pinto³, Lélia Batista de Souza³, Manuel Antonio Gordón-Nuñez¹, Cassiano Francisco Weege Nonaka¹

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

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

³*Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, RN, Brasil.*

Título breve: Células Tregs em carcinoma de lábio inferior

Autor correspondente:

Cassiano Francisco Weege Nonaka

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia – Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Rua Juvêncio Arruda, s/n – Bodocongó – Campina Grande – PB – Brasil

CEP 58429-600 Phone/ Fax: +55 83 3315-3471

e-mail: cfwnonaka@gmail.com

Células T regulatórias FoxP3+ e sua relação com parâmetros clínico-patológicos em carcinomas de células escamosas de lábio inferior

Título breve: Células Tregs em carcinoma de lábio inferior

SUMMARY

This study aimed to evaluate, by immunohistochemistry, the amount of FoxP3+ T regulatory (Treg) cells in the microenvironment of squamous cell carcinomas (SCC) of lower lip and to relate this with clinicopathological parameters (size/extent of the tumor, metastases in regional nodes, distant metastasis, clinical stage and histopathological grade of malignancy). Fifty SCC of lower lip were selected. Lymphocytes exhibiting nuclear positivity for FoxP3 were counted in 10 microscopic fields at the tumor invasive front and the mean value was calculated for each case. FoxP3+ lymphocytes were observed in all cases evaluated, with a tendency for higher amounts of these cell types in lesions of small size, without regional nodal metastasis, and in early clinical stages ($p > 0.05$). Low-grade malignancy lesions revealed higher amount of FoxP3+ lymphocytes in comparison with high-grade tumors ($p = 0.019$). Tumors with intense inflammatory infiltrate exhibited higher median of FoxP3+ lymphocytes ($p = 0.035$). Lesions arranged in the form of small cell groups exhibited lower median of FoxP3+ lymphocytes ($p = 0.003$). No statistically significant differences were observed in the amount of FoxP3+ lymphocytes according to the degrees of keratinization ($p = 0.525$) and nuclear pleomorphism ($p = 0.343$) in the tumors. The results of this study suggest the involvement of Treg cells in the modulation of immune and inflammatory responses in the microenvironment of SCCs of the lower lip. The role of these cells may be more important in the initial stages than in the advanced stages of lip carcinogenesis.

KEY WORDS: squamous cell carcinoma, lower lip, forkhead box P3, regulatory T cells, immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) de lábio inferior é uma das neoplasias malignas mais comuns da região de cabeça e pescoço, representando até 66,5% dos casos de câncer oral (1). Embora esteja localizado em uma região anatômica que favorece o diagnóstico precoce, um número importante de casos de CCE de lábio inferior são identificados em estágios avançados, quando já existem metástases nodais regionais (2). Nestas situações, as taxas de sobrevida em 5 anos podem se reduzir de 80% para apenas 25%, configurando um pior prognóstico (3,4). Apesar da frequência relativamente alta do CCE de lábio inferior e do importante impacto das metástases nodais regionais no prognóstico desta lesão, diversos aspectos relacionados à sua progressão permanecem incompletamente compreendidos.

Estudos revelam que as interações entre células neoplásicas e células do sistema imune são capazes de modular a progressão e o desenvolvimento dos tumores (5,6). Neste processo, as células neoplásicas podem recrutar vários tipos celulares capazes de suprimir a resposta imune no microambiente tumoral, com destaque para as células T regulatórias (Tregs) (5). As células Tregs são células da linhagem linfocítica que expressam constitutivamente as moléculas CD4, CD25 e o fator de transcrição nuclear *Forkhead box P3* (FoxP3). Este último, um fator essencial para que os linfócitos T se diferenciem em células Tregs e executem funções imunossupressoras (6,7), tem sido referenciado como um dos mais confiáveis marcadores para identificação destes tipos celulares (6,8).

Através da liberação de citocinas inibitórias, citólise, modulação das funções das células apresentadoras de antígenos (APC) e interrupção metabólica, as células Tregs podem suprimir uma grande variedade de células do sistema imune, incluindo linfócitos B, células *Natural Killer* (NK), células T CD4⁺ e T CD8⁺, bem como monócitos e células dendríticas (9). A produção de citocinas inibitórias, como interleucina-10 (IL-10), interleucina-35 (IL-35) e fator transformante de crescimento- β (TGF- β), é considerada um dos principais mecanismos de supressão utilizados pelas células Tregs (10).

Diversos estudos têm relacionado a maior quantidade de células Tregs no microambiente tumoral com uma diminuição da resposta imune antitumoral, culminando em piores prognósticos (11,12). Em CCEs de cavidade oral, uma maior quantidade de células Tregs tem sido associada com a presença de metástase nodal regional (13), estadiamento clínico avançado (13), baixas taxas de sobrevida geral (14) e de sobrevida livre de doença (8). Por outro lado, outras pesquisas evidenciaram que uma maior quantidade de células Tregs pode estar relacionada a um melhor prognóstico em CCEs de cavidade oral (15,16). Apesar desses achados, até a presente data (Pubmed Database – acesso em 13/07/2015), destacam-se apenas

dois estudos sobre células Tregs em CCEs de lábio inferior. Um desses estudos foi realizado com uma amostra relativamente pequena ($n = 6$) de CCEs de lábio inferior (17) e o outro não relacionou a quantidade dessas células com achados clínico-patológicos (18).

Dessa forma, o presente estudo se propôs a realizar uma análise imunoistoquímica da quantidade de células Tregs (FoxP3+) no microambiente de CCEs de lábio inferior, estabelecendo relações com parâmetros clínico-patológicos (tamanho/ extensão do tumor, metástase nodal regional, metástase à distância, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade). Pretendeu-se, com esta pesquisa, contribuir com mais esclarecimentos a respeito dos mecanismos relacionados à progressão tumoral nos CCEs de lábio inferior.

MATERIAL E MÉTODOS

Cinquenta casos de CCE de lábio inferior, obtidos dos arquivos do hospital Napoleão Laureano, João Pessoa, PB, Brasil, foram selecionados para este estudo. Informações a respeito do sexo e idade dos pacientes, bem como em relação à presença de metástase em nodos regionais, metástase à distância e estágio clínico (TNM) foram coletadas nos prontuários médicos dos pacientes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brasil.

Para o estudo morfológico, cortes com $5\mu\text{m}$ de espessura foram obtidos a partir do material biológico embocado em parafina. Em sequência, esses cortes teciduais 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 gradação histopatológica de malignidade dos espécimes, no *front* de invasão tumoral, de acordo com o sistema proposto por Bryne et al. (19). Nesse sistema, são atribuídos escores aos seguintes parâmetros: grau de ceratinização, padrão de invasão, pleomorfismo nuclear e infiltrado inflamatório. Em sequência, os escores são somados para ser obtido o escore final de malignidade do caso. Com base na metodologia utilizada por Silveira et al. (20), lesões com escore final igual ou menor que 8 foram classificadas como de baixo grau de malignidade e tumores com escore final igual ou superior a 9 foram classificados como de alto grau de malignidade.

Imunoistoquímica

A partir do material fixado em formol e embocado em parafina, cortes com $3\mu\text{m}$ de espessura foram obtidos e estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de

organosilano. Os cortes teciduais foram desparafinizados e, em seguida, imersos em peróxido de hidrogênio a 3% para bloqueio da peroxidase endógena tecidual. Em sequência, os cortes teciduais foram lavados em tampão fosfato-salino (PBS) e submetidos à recuperação antigênica com solução de citrato, pH 6,0, em *steamer*. Posteriormente, os cortes teciduais foram incubados com o anticorpo primário anti-FoxP3 (Ref. Ab22510, Abcam, Cambridge, UK; diluição 1:150) em câmara úmida, por 60 minutos. Após dupla lavagem com PBS, os cortes teciduais foram tratados com complexo à base de polímero (*ADVANCETM HRP*, Dako, Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente. A atividade da peroxidase foi visualizada através da imersão dos cortes teciduais em diaminobenzidina (*Liquid DAB+*, Dako, Carpinteria, CA), resultando em um produto de reação de coloração acastanhada. Finalmente, os cortes teciduais foram contracorados com hematoxilina de Mayer e montados com lamínula.

Como controle positivo, foram utilizados cortes histológicos de tonsila. Para o controle negativo, no protocolo descrito anteriormente, o anticorpo primário foi substituído por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão.

Análise imunoistoquímica

A análise imunoistoquímica foi realizada por dois examinadores previamente treinados, sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), sem que os mesmos tivessem conhecimento dos dados clínico-patológicos relacionados aos casos.

A análise das células Tregs foi realizada de forma quantitativa, com base em uma adaptação da metodologia utilizada por Schwarz et al. (21). Primeiramente, ao longo do *front* de invasão tumoral, sob aumento de 100×, foram selecionadas 10 áreas de maior imunorreatividade ao anticorpo anti-FoxP3. Sob aumento de 400×, cada uma dessas áreas foi fotomicrografada (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) e as imagens obtidas foram transferidas para o programa *ImageJ*® (*Image Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA). Em sequência, foi realizada a contagem, em cada um dos campos fotomicrografados, dos linfócitos exibindo imunomarcção nuclear para o FoxP3. Os valores obtidos em cada um desses campos foram somados, estabelecendo-se o número total de linfócitos FoxP3+. Com esse último dado, foi calculada a média de células Tregs para cada caso.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa

Statistical Package for the Social Sciences (versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os dados obtidos com a contagem dos linfócitos FoxP3+ foram submetidos à análise de distribuição, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, as comparações das medianas das células Tregs de acordo com os diversos parâmetros clínico-patológicos foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Possíveis associações do grau histopatológico de malignidade das lesões com os parâmetros clínicos foram avaliadas por meio do teste exato de Fisher. Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Análises clínicas e morfológicas

Dos 50 casos de CCE de lábio inferior estudados, 38 (76,0%) foram diagnosticados em indivíduos do sexo masculino, com uma proporção homem/ mulher de 3.2:1. A idade dos pacientes variou de 26 a 86 anos, com uma média de $62,1 \pm 18,3$ anos. Em relação ao tamanho/ extensão do tumor e à metástase nodal regional, foi observada maior frequência de casos classificados como T2 (n = 28; 56,0%) e N0 (n = 25; 50,0%). Metástase à distância não foi identificada em nenhum dos 50 casos avaliados. A análise do estadiamento clínico, por sua vez, demonstrou maior frequência de casos nos estádios III (n = 19; 38,0%) e II (n = 15; 30,0%) (Tabela 1).

Em relação ao grau histopatológico, a amostra estudada revelou um predomínio de lesões com alto grau de malignidade (n = 29; 58,0%) (Tabela 1). A maioria dos casos de CCE de lábio inferior sem metástase nodal regional (n = 17; 81,0%) foram classificados como de baixo grau de malignidade ($p < 0,001$). Por sua vez, a maioria dos pacientes nos estádios III e IV (n = 22; 84,6%) apresentaram tumores de alto grau de malignidade ($p < 0,001$).

Análise imunoistoquímica

Em todos os CCEs de lábio inferior avaliados, foram observados linfócitos FoxP3+ ao longo do *front* de invasão tumoral (Figs. 1A e 1B), com médias que variaram de 0,60 a 53,20 (mediana: 12,45). Em relação ao tamanho/ extensão do tumor, a mediana de linfócitos FoxP3+ foi de 14,70 (variação: 2,10 – 53,20) nas lesões classificadas como T1 e de 10,80 (variação: 0,60 – 37,90) nas lesões classificadas como T2 – T4 (Fig. 2), sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ($p = 0,244$). Em relação à metástase nodal regional, a mediana de

linfócitos FoxP3+ foi de 7,40 (variação: 0,60 – 30,80) nos CCEs de lábio inferior com metástase e de 15,20 (variação: 0,80 – 53,20) nos tumores sem metástase (Fig. 2). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,079$).

A análise dos linfócitos FoxP3+, de acordo com o estadiamento clínico, revelou mediana de 15,05 (variação: 0,80 – 53,20) nos CCEs de lábio inferior em estádios iniciais (I/II) e de 7,90 (variação: 0,60 – 37,90) nos tumores em estádios avançados (III/IV) (Fig. 2). O teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,187$). Com relação ao grau histopatológico de malignidade, a mediana de linfócitos FoxP3+ foi de 16,00 (variação: 0,60 – 53,20) nos CCEs de lábio inferior de baixo grau de malignidade e de 6,60 (variação: 0,80 – 37,90) nos tumores de alto grau de malignidade (Fig. 2), com diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,019$).

A distribuição dos dados obtidos com a avaliação dos linfócitos FoxP3+, de acordo com os parâmetros isolados da gradação histopatológica de malignidade, é apresentada na Figura 3. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas nas medianas de linfócitos FoxP3+ em relação ao grau de ceratinização ($p = 0,525$) e ao grau de pleomorfismo nuclear ($p = 0,343$) das lesões. Em relação ao padrão de invasão, CCEs de lábio inferior com bordas infiltrativas bem delimitadas ou arranjos em cordões, bandas e/ou trabéculas sólidas revelaram maior mediana de linfócitos FoxP3+ em comparação com tumores arranjos em pequenos grupos celulares ($p = 0,003$). Por sua vez, CCEs de lábio inferior com intenso infiltrado inflamatório exibiram maior mediana de linfócitos FoxP3+ quando comparados aos tumores com infiltrado inflamatório moderado a ausente ($p = 0,035$).

DISCUSSÃO

As interações entre células tumorais e células do sistema imune são capazes de influenciar a progressão neoplásica (12). Neste sentido, dependendo do perfil das células imunes e dos mediadores químicos secretados, o infiltrado inflamatório associado às neoplasias pode exercer ora um papel antitumoral, ora um efeito pró-tumoral (14,16). Portanto, nos últimos anos, intensificou-se a investigação acerca das características celulares e moleculares da resposta imune às neoplasias com o objetivo de compreender melhor o processo de progressão tumoral, identificar fatores prognósticos mais confiáveis e, eventualmente, definir alvos potenciais para estratégias imunoterapêuticas (6,12,14,22).

No contexto das respostas imunes aos tumores, estudos têm destacado a participação das células Tregs, as quais podem suprimir as funções de diversos tipos celulares do sistema

imune, incluindo linfócitos B, células *Natural Killer* (NK), células T CD4⁺ e T CD8⁺, bem como monócitos e células dendríticas (5,9). Neste sentido, o aumento na quantidade de células Tregs no microambiente tumoral tem sido relacionado a piores prognósticos em carcinomas de cabeça e pescoço, incluindo os CCEs de cavidade oral (8,11,14). Por outro lado, outras pesquisas em CCEs de cavidade oral reportaram um melhor prognóstico para os casos com maiores quantidades de células Tregs (15,16). Em CCEs de lábio inferior, os trabalhos existentes (17,18) são escassos e não permitem estabelecer, de forma conclusiva, o papel destas células na progressão destas neoplasias.

No presente estudo, foram observados linfócitos FoxP3⁺ em todos os CCEs de lábio inferior avaliados. Tais achados, em concordância com estudos prévios sobre células Tregs nestas lesões (17,18), corroboram a presença desta subpopulação de células T no infiltrado inflamatório do microambiente dos CCEs de lábio inferior. Na presente pesquisa, apesar da ausência de significância estatística, foi constatada uma tendência a uma maior quantidade de linfócitos FoxP3⁺ em lesões de menor tamanho, sem metástase nodal regional e em estádios clínicos iniciais ($p > 0,05$). Em consonância com estes achados, estudos com CCEs de cavidade oral evidenciaram uma maior quantidade de células Tregs em lesões de menor tamanho/extensão (16) e em estádios clínicos iniciais (15). Por outro lado, Gaur et al. (13) constataram uma maior quantidade de células Tregs em CCEs orais com metástase nodal regional e em estádios clínicos avançados.

Em relação aos aspectos morfológicos, na presente pesquisa, foi constatada uma maior quantidade de linfócitos FoxP3⁺ em CCEs de lábio inferior de baixo grau de malignidade ($p = 0,019$). Considerando os parâmetros isolados, merece destaque a identificação de uma maior quantidade de linfócitos FoxP3⁺ nas lesões com intenso infiltrado inflamatório ($p = 0,035$). Embora tenham utilizado o sistema de gradação histopatológica da Organização Mundial da Saúde em seu estudo com CCEs de cavidade oral, Al-Qahtani et al. (12) também constataram uma correlação positiva entre a intensidade do infiltrado inflamatório e o número de células Tregs no microambiente dessas lesões.

Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo sugerem uma participação importante das células Tregs nos CCEs de lábio inferior. A ação imunossupressora desta subpopulação de células T pode ser particularmente necessária em estágios iniciais da carcinogênese labial, nos quais as células neoplásicas possivelmente apresentam maior imunogenicidade e, dessa forma, recrutam uma maior quantidade de células Tregs para o microambiente para escapar da resposta imune antitumoral. Em estágios mais avançados da carcinogênese labial, as células neoplásicas exibiriam menor capacidade de estimular respostas

imunes e, com isso, haveria uma consequente redução na quantidade de células Tregs no microambiente tumoral. Apesar desta sugestão, não se pode desconsiderar a possibilidade de que outros tipos celulares, como macrófagos M2 e células supressoras derivadas da linhagem mieloide (5), sejam os principais responsáveis pela supressão da resposta imune no microambiente dos CCEs de lábio inferior em estágios avançados. Informações a respeito das interações celulares e dos mediadores químicos envolvidos na supressão da resposta imune em CCEs de lábio inferior ainda são escassas (17,18) e, dessa forma, investigações posteriores são necessárias para confirmar essa sugestão.

Em CCEs de cavidade oral, uma maior quantidade de células Tregs tem sido associada a piores prognósticos, caracterizados por baixas taxas de sobrevida geral (14) e de sobrevida livre de doença (8). Em contraposição a estes achados, Lim et al. (15) e Wolf et al. (16) observaram que maiores quantidades de células Tregs podem estar relacionadas a melhores prognósticos em CCEs de cavidade oral. De forma similar, estudos com adenocarcinomas gástricos (23), linfomas (24) e carcinomas de cabeça e pescoço (7,25) demonstraram uma relação entre a maior quantidade de células Tregs e maiores taxas de sobrevida dos pacientes. Para explicar tais achados aparentemente contraditórios, estudos têm sugerido que as células Tregs poderiam reduzir os efeitos pró-tumorais da inflamação crônica, como a liberação de fatores angiogênicos, mitógenos e proteases (5), os quais são capazes de estimular a progressão tumoral (15).

Com base na sugestão apresentada anteriormente, o recrutamento das células Tregs para o microambiente tumoral, possivelmente, não seria um evento coordenado pelas células neoplásicas. Apesar disso, baseados nos resultados obtidos no presente estudo, outros cenários no contexto da resposta imune antitumoral nos CCEs orais poderiam ser considerados. Neste sentido, a maior quantidade de células Tregs em CCEs orais em estágios clínicos iniciais e em pacientes com maiores períodos de sobrevida (15, 16) poderiam ser o reflexo de uma forte resposta imune antitumoral. Assim, as células neoplásicas malignas recrutariam um maior número de células Tregs na tentativa de suprimir respostas imunes antitumorais mais eficientes, observadas particularmente em estágios iniciais das neoplasias malignas. Em estágios avançados, com a existência de uma fraca resposta imune antitumoral, a quantidade de células Tregs diminuiria. Para avaliar este possível cenário nos CCEs de lábio inferior, é de suma importância analisar os diversos tipos celulares do sistema imune presentes nestas lesões, bem como o perfil de mediadores químicos secretados. Em concordância com esta sugestão, pesquisas revelam que, para modular a imunidade antitumoral, alterações no equilíbrio de subpopulações celulares do sistema imune são mais importantes do que modificações

quantitativas em um único tipo celular (13,14).

Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem a participação das células Tregs na modulação das respostas imunes e inflamatórias no microambiente dos CCEs de lábio inferior. O papel desempenhado por estas células pode ser mais importante em estágios iniciais do que em estágios avançados da carcinogênese labial.

RESUMO

Este estudo objetivou avaliar, por meio de imunoistoquímica, a quantidade de células T regulatórias (Tregs) FoxP3+ no microambiente de carcinomas de células escamosas (CCE) de lábio inferior e relacioná-la com parâmetros clínico-patológicos (tamanho/extensão do tumor, metástases em linfonodos regionais, metástases a distância, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade). Foram selecionados 50 casos de CCEs de lábio inferior. Os linfócitos exibindo imunomarcagem nuclear para o FoxP3+ foram quantificados em 10 campos microscópicos do *front* de invasão tumoral e, em seguida, determinada a média de células Tregs para cada caso. Foram observados linfócitos FoxP3+ em todos os casos avaliados, com uma tendência a uma maior quantidade destes tipos celulares, sem diferenças estatisticamente significativas, em lesões de menor tamanho, sem metástase nodal regional e em estágios clínicos iniciais ($p > 0,05$). Lesões de baixo grau de malignidade revelaram maior quantidade de linfócitos FoxP3+ em comparação com as de alto grau ($p = 0,019$). Tumores com intenso infiltrado inflamatório exibiram maior mediana de linfócitos FoxP3+ ($p = 0,035$). Por sua vez, lesões arrançadas sob a forma de pequenos grupos celulares exibiram menor mediana de linfócitos FoxP3+ ($p = 0,003$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na quantidade de linfócitos FoxP3+ em relação aos graus de ceratinização ($p = 0,525$) e pleomorfismo nuclear ($p = 0,343$) nas lesões. Os resultados do presente estudo sugerem a participação das células Tregs na modulação das respostas imunes e inflamatórias no microambiente dos CCEs de lábio inferior. O papel desempenhado por estas células pode ser mais importante em estágios iniciais do que em estágios avançados da carcinogênese labial.

REFERÊNCIAS

1. Czerninski R, Zini A, Sgan-Cohen HG. Lip cancer: incidence, trends, histology and survival: 1970-2006. *Br J Dermatol* 2010;162:1103-09.
2. Luna-Ortiz K, Güemes-Meza A, Villavicencio-Valencia V, Mosqueda-Taylor A. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. *Oral Oncol* 2004;40:992-999.
3. Sargeran K, Murtomaa H, Safavi SM, Vehkalahti MM, Teronen O. Survival after lip cancer

diagnosis. *J Craniofac Surg* 2009; 20:248-52.

4. Gutiérrez-Pascual M, Vicente-Martín FJ, Fernández-Álvarez JG, Martín-López R, Pinedo-Moraleda F, López-Estebanz JL. Squamous cell carcinoma of the lip: a retrospective study of 146 patients. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2012;26:1116-21.

5. Duray A, Demoulin S, Hubert P, Delvenne P, Saussez S. Immune suppression in head and neck cancers: a review. *Clin Dev Immunol* 2010;10:701657.

6. Simonson WTN, Allison KH. Tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: implications for the diagnostic pathologist. *Diagnostic Histopathol* 2011;17:80-90.

7. Badoual C, Hans S, Rodriguez J, Peyrard S, Klein C, Agueznay NEL et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4⁺ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Cancer Res* 2006;12:465-72.

8. Hanakawa H, Orita Y, Sato Y, Takeuchi M, Ohno K, Gion Y et al. Regulatory T-cell infiltration in tongue squamous cell carcinoma. *Acta Otolaryngol* 2014;138:859-64.

9. Schmidt A, Oberle N, Krammer PH. Molecular mechanism of Treg-mediated T cell suppression. *Front Immunol* 2012;21:51.

10. Workman CJ, Szymczak-Workman AL, Collison LW, Pillai MR, Vignali DA. The development and function of regulatory T cells. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:2603-22.

11. Strauss L, Bergmann C, Szczepanski M, Gooding W, Johnson JT, Whiteside TL. A unique subset of CD4⁺CD25⁺highFoxP3⁺ T cell secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res* 2007;13:4345-54.

12. Al-Qahtani D, Anil S, Rajendran R. Tumor infiltrating CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells (Tregs) relate to tumor grade and stromal inflammation in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2011;40:636-42.

13. Gaur P, Qadir GA, Upadhyay S, Singh AK, Shukla NK, Das SN. Skewed immunological balance between Th17 (DE4+IL17A+) and Treg (CD4+CD25+FOXP3+) cells in human oral squamous cell carcinoma. *Cell Oncol* 2012;35:335-43.

14. Watanabe Y, Katou F, Ohtani H, Nakayama T, Yoshie O, Hashimoto K. Tumor-infiltrating lymphocytes, particularly the balance between CD8⁺ T cells and CCR4⁺ regulatory T cells, affect the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:744-52.

15. Lim KP, Chun NA, Ismail SM, Abraham MT, Yusoff MN, Zain RB et al. CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} regulatory T cells are increased in oral squamous cell carcinoma patients. *PLoS One* 2014;9:e103975.

16. Wolf GT, Chepeha DB, Bellile E, Nguyen A, Thomas D, McHugh J et al. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous cell carcinoma: a preliminary study. *Oral Oncol* 2015;51:90-5.

17. Moreira G, Fulgêncio LB, De Mendonça EF, Leles CR, Batista AC, Da Silva TA. T regulatory cell markers in oral squamous cell carcinoma: relationship with survival and tumor aggressiveness. *Oncol Lett* 2010;1:127-32.
18. Kualess MA, Wenzel J, Schmid-Wendter MH, Bieber T, Von Bubnoff D. Myeloid CD11c+S100+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase at the inflammatory border to invasive lower lip squamous cell carcinoma. *Histol Histopathol* 2011;26:997-1006.
19. 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.
20. Silveira EJ, Godoy GP, Lins RD, Arruda ML, Ramos CC, Freitas RA et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of the squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol* 2007;15:376-83.
21. Schwarz S, Butz M, Morscheck C, Reichert TE, Driemel O. Increased number of CD25+ PoxP3+ regulatory T cells in oral squamous cell carcinomas detected by chromogenic immunohistochemical double staining. *J Oral Pathol Med* 2008;37:485-9.
22. Zhang YL, LI J, Mo HY, Qiu F, Zheng LM, Qian CN et al. Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways. *Mol Cancer* 2010;9:4.
23. Haas M, Dimmler A, Hohenberger W, Grabenbauer GG, Niedobitek G, Distel LV. Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia. *BMC Gastroenterol* 2009;9:65–75.
24. Lee JJ, Chang YL, Lai WL, Ko JY, et al. Increased prevalence of interleukin-17-producing CD4+ tumor infiltrating lymphocytes in human oral squamous cell carcinoma. *Head Neck* 2011;33:1301–89.
25. Bron L, Jandus C, Andrejevic-Blant S, Speiser DE, Monnier P, Romero P et al. Prognostic value of arginase-II expression and regulatory T-cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2013;132:e85-93.

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>	38 (76,0)
<i>Feminino</i>	12 (24,0)
Tumor	
<i>T1</i>	15 (30,0)
<i>T2</i>	28 (56,0)
<i>T3</i>	4 (8,0)
<i>T4</i>	3 (6,0)
Nodo	
<i>N0</i>	25 (50,0)
<i>N1</i>	20 (40,0)
<i>N2</i>	5 (10,0)
<i>N3</i>	0 (0,0)
Metástase	
<i>M0</i>	50 (100,0)
<i>M1</i>	0 (0,0)
Estádio clínico	
<i>Estádio I</i>	9 (18,0)
<i>Estádio II</i>	15 (30,0)
<i>Estádio III</i>	19 (38,0)
<i>Estádio IV</i>	7 (14,0)
Grau histopatológico de malignidade	
<i>Baixo grau</i>	21 (42,0)
<i>Alto grau</i>	29 (58,0)

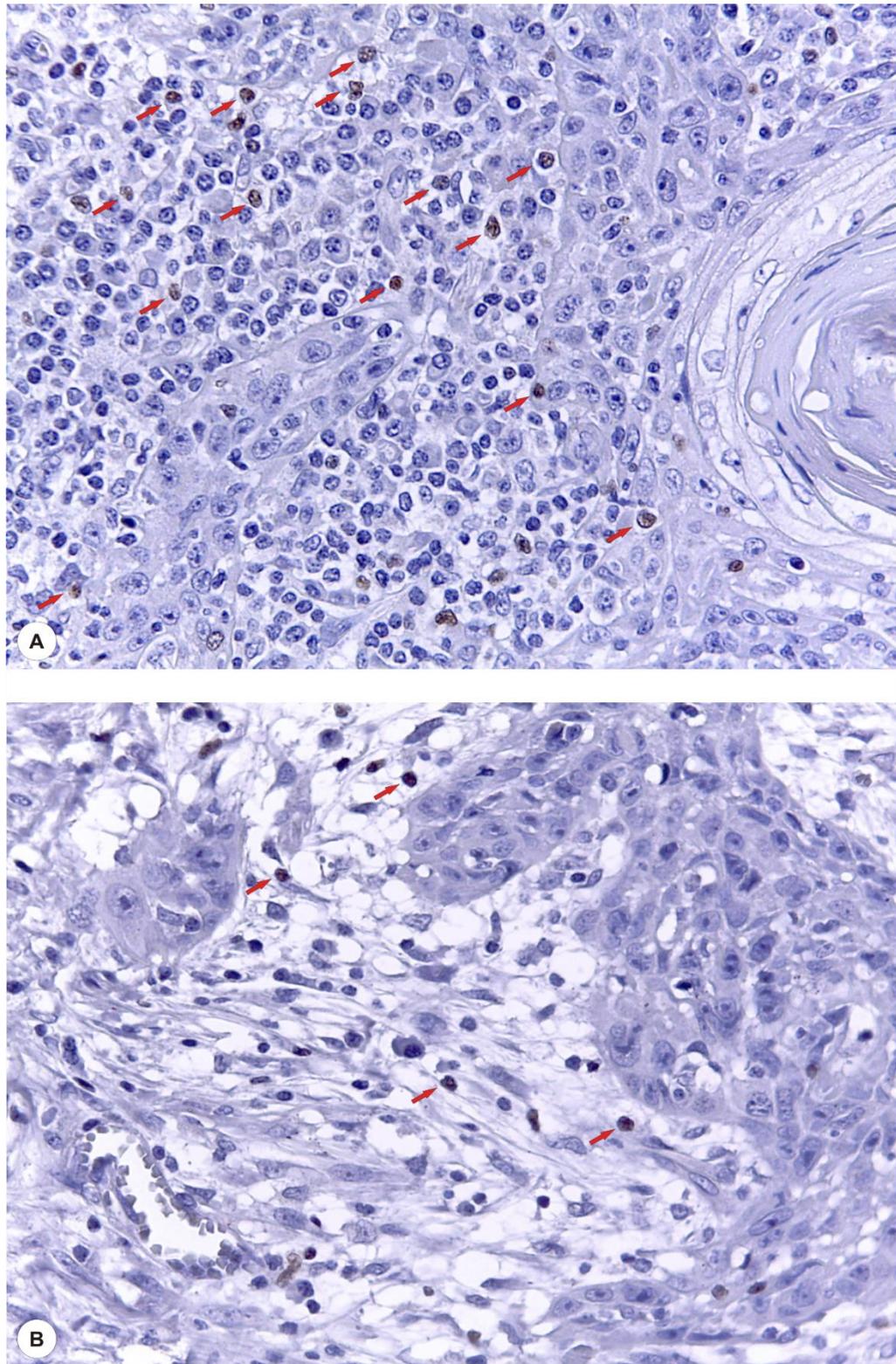


Figura 1. (A) Linfócitos FoxP3+ (setas) no *front* de invasão de CCE de lábio inferior de baixo grau de malignidade com intenso infiltrado inflamatório (Advance, $\times 400$). (B) Linfócitos FoxP3+ (setas) no *front* de invasão de CCE de lábio inferior de alto grau de malignidade com escasso infiltrado inflamatório (Advance, $\times 400$).

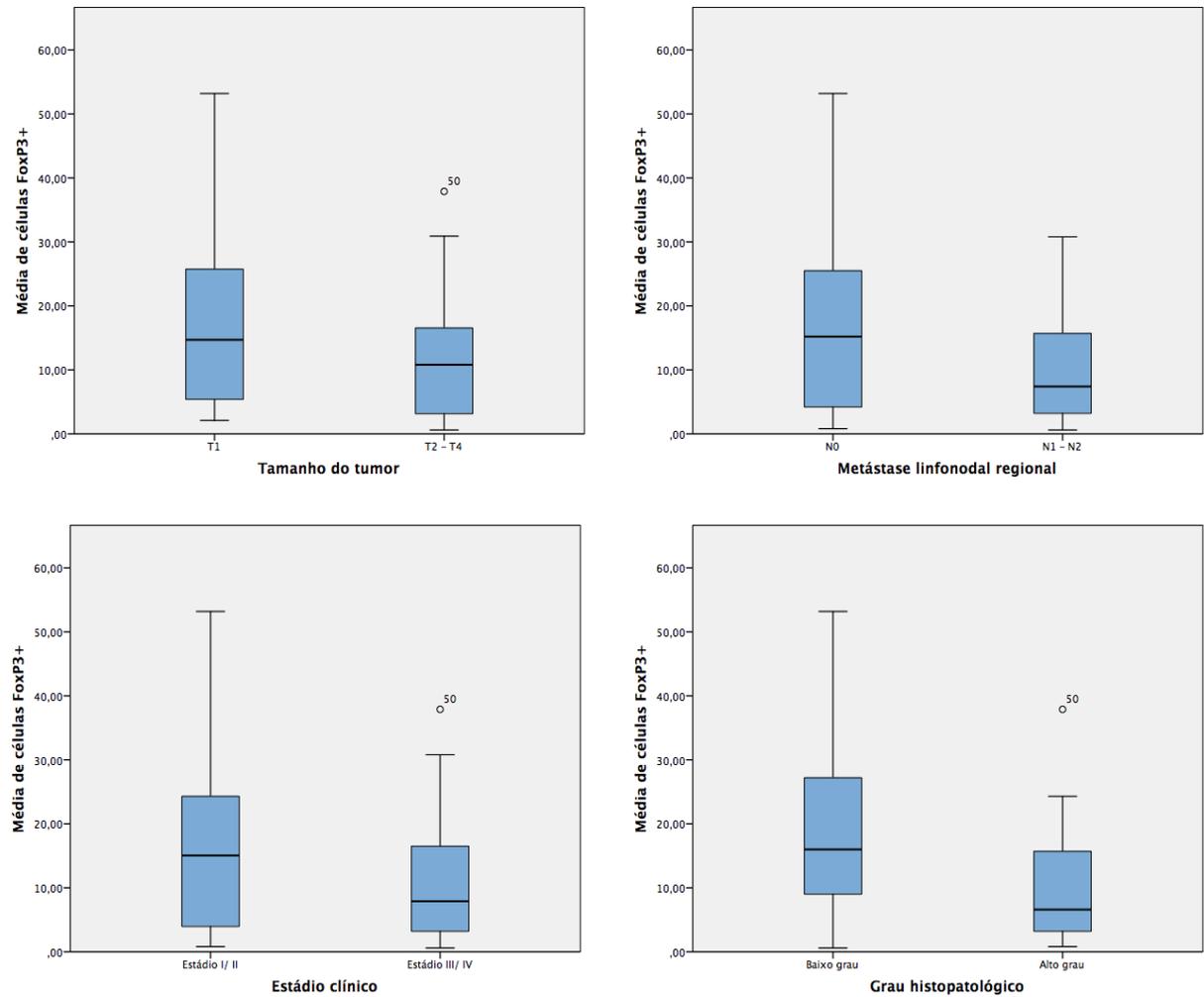


Figura 2. Gráficos box-plot da quantidade dos linfócitos FoxP3+ nos carcinomas de células escamosas de lábio inferior de acordo com o tamanho do tumor, a metástase linfonodal regional, o estágio clínico e o grau histopatológico de malignidade.

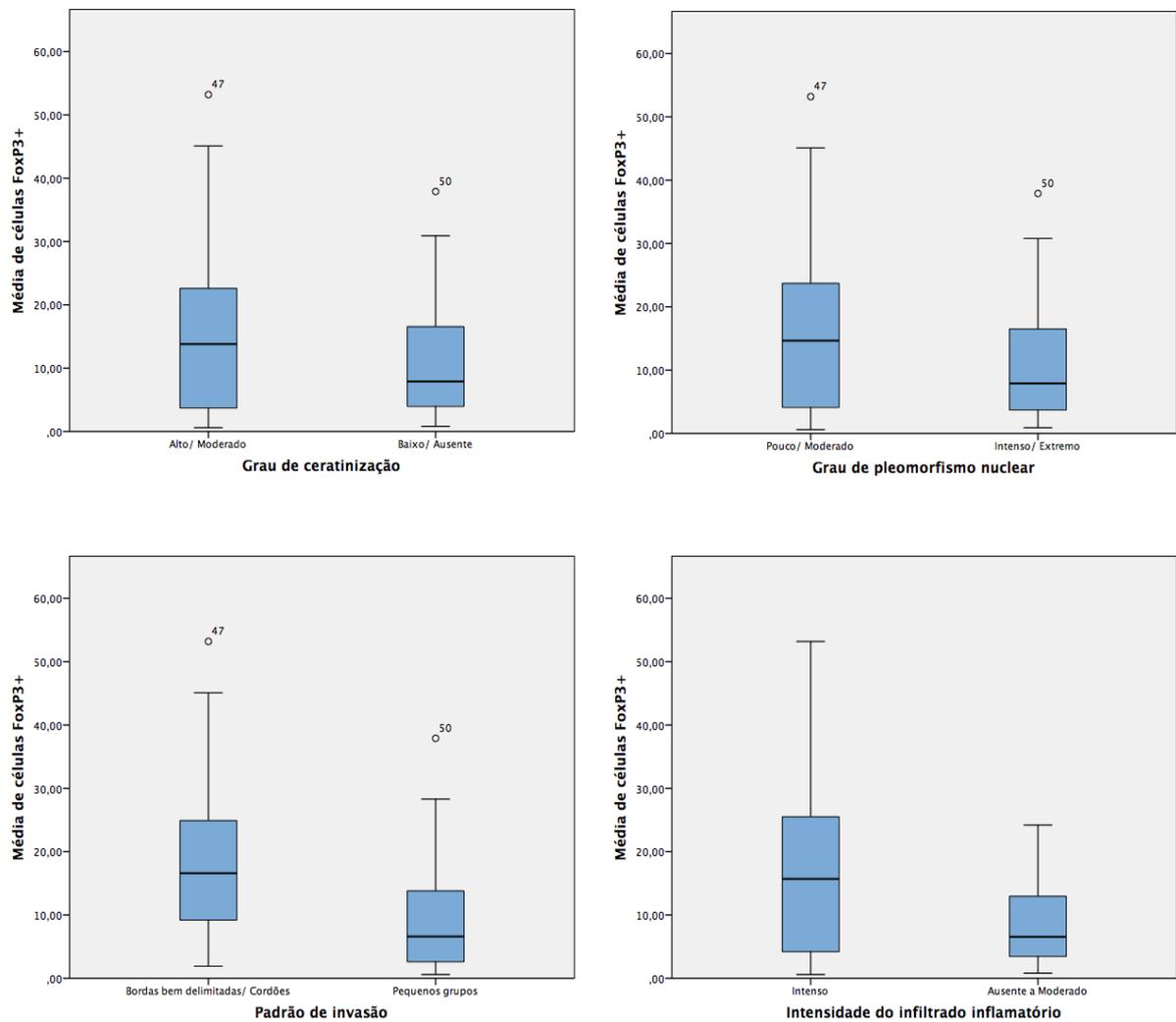


Figura 3. Gráficos box-plot da quantidade de linfócitos FoxP3+ nos carcinomas de células escamosas de lábio inferior de acordo com o grau de ceratinização, o grau de pleomorfismo nuclear, o padrão de invasão e a intensidade do infiltrado inflamatório.

Considerações Finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos sobre células Tregs em CCEs de lábio inferior são escassos e demonstram limitações que não permitem estabelecer, de forma categórica, o papel destes tipos celulares na progressão destas neoplasias. Neste sentido, os achados da presente pesquisa corroboram a presença das células Tregs no microambiente dos CCEs de lábio inferior e sugerem, ainda, que a modulação das respostas imunes e inflamatórias, por esta subpopulação de células T, pode ser mais importante em estágios iniciais do que em estágios avançados da carcinogênese labial. Estas observações alicerçam a realização de novas investigações para avaliar uma possível aplicação das células Tregs como indicadores prognósticos e, no futuro, como alvos para estratégias imunoterapêuticas nos CCEs de lábio inferior.

Referências

REFERÊNCIAS

- ALMANGUSH, A. *et al.* A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 44, p. 143-50, 2015.
- AL-QAHTANI, D.; ANIL, S.; RAJENDRAN, R. Tumor infiltrating CD25+ Foxp3+ regulatory T cells (Tregs) relate to tumor grade and stromal inflammation in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 40, p. 636-42, 2011.
- ANNEROOTH, G.; BATSAKIS, J.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 95, p. 229-49, 1987.
- ANTUNES, A. A.; ANTUNES, A. P. Estudo retrospectivo e revisão de literatura dos tumores dos lábios: experiência de 28 anos. **Rev. Bras. Cancer.**, v. 50, p. 295-300, 2004.
- BADOUAL, C. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. **Cancer Res.**, v. 12, p. 465-72, 2006.
- BATES, G. J. *et al.* Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, p. 5373-80, 2006.
- 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, p. 43-50, 2003.
- 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, p. 167-78, 2005.
- BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 1501p.
- BRODERS, A. C. Squamous-cell epithelioma of the lip: a study of five hundred and thirty-seven cases. **JAMA.**, v. 74, p. 656-64, 1920.
- BRON, L. *et al.* Prognostic value of arginase-II expression and regulatory T-cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma. **Int. J. Cancer**, v. 132, p. e85-93, 2013.
- BRYNE, M. *et al.* Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J. Pathol.**, v. 166, p. 375-81, 1992.
- BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Dis.**, v. 4, p. 70-7, 1998.
- CHIKAMATSU, K. *et al.* Relationships between regulatory T cells and CD8+ effector populations in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head Neck**, v. 29, p. 120-7, 2007.

CRISSMAN, J. D. *et al.* Prognostic value of histopathologic parameters in squamous cell carcinoma of the oropharynx. **Cancer**, v. 54, p. 2995-3001, 1984.

CZERNINSKI, R.; ZINI, A.; SGAN-COHEN, H. D. Lip cancer: incidence, trends, histology and survival: 1970-2006. **Br. J. Dermatol.**, v. 162, p. 1103-9, 2010.

DURAY, A. *et al.* Immune suppression in head and neck cancers: a review. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2010, p. 701657, 2010.

FIGUERO RUIZ, E. *et al.* Effects of the consumption of alcohol in the oral cavity: relationship with oral cancer. **Med. Oral**, v. 9, p. 14-23, 2004.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 4, p. 330-6, 2003.

GAUR, P. *et al.* Skewed immunological balance between Th17 (DE4+IL17A+) and Treg (CD4+CD25+FOXP3+) cells in human oral squamous cell carcinoma. **Cell. Oncol.**, v. 35, p. 335-43, 2012.

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

HAAS, M *et al.* Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia. **BMC Gastroenterol.**, v. 9, p. 65-75, 2009.

HANAKAWA, H. *et al.* Regulatory T-cell infiltration in tongue squamous cell carcinoma. **Acta Otolaryngol.**, v. 138, p. 859-64, 2014.

HERMANS, C. *et al.* Analysis of FoxP3+ T-regulatory cells and CD8+T-cells in ovarian carcinoma: location and tumor infiltration patterns are key prognostic markers. **PLoS One**, v. 9, p. e111757, 2014.

HO, W. L.; MURPHY, G. M. Update on the pathogenesis of post-transplant skin cancer in renal transplant recipients. **Br. J. Dermatol.**, v. 158, p. 217-24, 2008.

HORI, S.; NOMURA, T.; SAKAGUCHI, S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. **Science**, v. 299, p. 1057-61, 2003.

JAKOBSSON, P. A. *et al.* Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. **Acta Radiol. Ther. Phys. Biol.**, v. 12, p. 1-8, 1973.

JAMADAR, S. *et al.* Comparative study of various grading systems in oral squamous cell carcinoma and their predicting lymph node metastasis. **Indian J. Dent. Res.**, v. 25, p. 357-63, 2014.

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

KUALES, M. A. *et al.* Myeloid CD11c+ S100+ dendritic cells express indoleamine 2,3-dioxygenase at the inflammatory border to invasive lower lip squamous cell carcinoma. **Histol.**

Histopathol., v. 26, p. 997-1006, 2011.

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, p. 329-33, 2005.

LEE, J. J. *et al.* Increased prevalence of interleukin-17-producing CD4⁺ tumor infiltrating lymphocytes in human oral squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v. 33, p. 1301-89.

LIM, K. P. *et al.* CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low} regulatory T cells are increased in oral squamous cell carcinoma patients. **PLoS One**, v. 9, p. e103975, 2014.

LINDENBLATT, R. C. *et al.* Oral squamous cell carcinoma grading systems – analysis of the best survival predictor. **J. Oral. Pathol. Med.**, v. 41, 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, p. 325-33, 2007.

LUNA-ORTIZ, K. *et al.* Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. **Oral Oncol.**, v. 40, p. 992-9, 2004.

LUO, C. T.; LI, M. O. Transcriptional control of regulatory T cell development and function. **Trends Immunol.**, v. 34, p. 531-9, 2013.

MARABELLE, A. *et al.* Intratumoral immunization: a new paradigm for cancer therapy. **Clin. Cancer Res.**, v. 20, p. 1747-56, 2014.

MORALES-KASTRESANA, A. *et al.* Combined immunostimulatory monoclonal antibodies extend survival in an aggressive transgenic hepatocellular carcinoma mouse model. **Clin. Cancer Res.**, v. 19, p. 6151-62, 2013.

MOREIRA, G. *et al.* T regulatory cell markers in oral squamous cell carcinoma: relationship with survival and tumor aggressiveness. **Oncol. Lett.**, v. 1, p. 127-32, 2010.

MORSELLI, P. *et al.* Clinical parameters in T1N0M0 lower lip squamous cell carcinoma. **J. Craniofac. Surg.**, v. 18, p. 1079-82, 2007.

PIVA, M. R. *et al.* Role inflammation in oral carcinogenesis (Part I): Histological grading of malignancy using a binary system. **Oncol. Lett.**, v. 2, p. 1225-31, 2011.

PIVA, M. R. *et al.* Role inflammation in oral carcinogenesis (Part II): CD8, FOXP3, TNF- α , TGF- β and NF- κ B expression. **Oncol. Lett.**, v. 5, p. 1909-14, 2013.

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, p. 539-45, 2014.

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

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, p. 1-9, 2003.

SAWAZAKI-CALONE, I. *et al.* The prognostic value of histopathological grading systems in oral squamous cell carcinomas. **Oral Dis.**, 2015. No prelo.

SCHMIDT, A.; OBERLE, N.; KRAMMER, P. H. Molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression. **Front. Immunol.**, v. 3, p. 51, 2012.

SCHWARZ, S. *et al.* Increased number of CD25+ FoxP3+ regulatory T cells in oral squamous cell carcinomas detected by chromogenic immunohistochemical double staining. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 37, p. 485-9, 2008.

SILVEIRA, E. J. *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, p. 376-83, 2007.

SIMONSON, W. T. N.; ALLISON, K. H. Tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: implications for the diagnostic pathologist. **Diagnostic Histopathol.**, v. 17, p. 80-90, 2011.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumors**. 6th ed., New Jersey: John Wiley & Sons, 2002. 264p.

SOJKA, D. K.; HUANG, Y. H.; FOWELL, D. J. Mechanisms of regulatory T-cell suppression – a diverse arsenal for a moving target. **Immunology**, v. 124, p. 13-22, 2008.

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, p. e757-62, 2011.

STRAUSS, L. A. *et al.* unique subset of CD4+CD25+highFoxP3+ T cell secreting interleukin-10 and transforming growth factor-beta1 mediates suppression in the tumor microenvironment. **Clin. Cancer Res.**, v. 13, p. 4345-54, 2007.

SZCZEPANSKI, M. J. *et al.* Increased frequency and suppression by regulatory T cells in patients with acute myelogenous leukemia. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, p. 3325-32, 2009.

TANG, Q.; BLUESTONE, J. A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. **Nat. Immunol.**, v. 9, p. 239-44, 2008.

VAN LEEUWEN, M. T. *et al.* Immunosuppression and other risk factors for lip cancer after kidney transplantation. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 18, p. 561-9, 2009.

VIGNALI, D. A.; COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J. How regulatory T cells work. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 523-32, 2008.

VUKADINOVIC, M. *et al.* Surgical management of squamous cell carcinoma of the lip:

analysis of a 10-years experience in 223 patients. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 65, p. 675-9, 2007.

WADA, D. A. *et al.* Paucity of intraepidermal FoxP3-positive T cells in cutaneous T-cell lymphoma in contrast with spongiotic and lichenoid dermatitis. **J. Cutan. Pathol.**, v. 37, p. 535-41, 2010.

WAHI, P. M. **Tipos histológicos de tumores orales y orofaríngeos.** Giebra: Organización Mundial de la Salud, 1971.

WATANABE, Y. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes, particularly the balance between CD8+ T cells and CCR4+ regulatory T cells, affect the survival of patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 109, p. 744-52, 2010.

WOLF, G. T. *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous cell carcinoma: a preliminar study. **Oral Oncol.**, v. 51, p. 90-5, 2015.

WORKMAN, C. J. *et al.* The development and function of regulatory T cells. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 2603-22, 2009.

XU, L. *et al.* Enrichment of CCR6+Foxp3+ regulatory T cells in the tumor mass correlates with impaired CD8+ T cell function and poor prognosis of breast cancer. **Clin. Immunol.**, v. 135, p. 466-75, 2010.

ZHANG, Y. L. *et al.* Different subsets of tumor infiltrating lymphocytes correlate with NPC progression in different ways. **Mol. Cancer**, v. 9, p. 4, 2010.

ZHAO, L. *et al.* Imbalance in the Th17/Treg and cytokine environment in peripheral blood of patients with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. **Med. Oncol.**, v. 30, p. 461, 2013.

Apêndices

Anexos

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

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - UEPB / PRÓ-
REITORIA DE PÓS-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DAS SUBPOPULAÇÕES DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES, DAS CÉLULAS T REGULATÓRIAS E DA EXPRESSÃO DAS QUIMIOCINAS CCL20 E CCL22 EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO INFERIOR

Pesquisador: Cassiano Francisco Weege Nonaka

Área Temática:

Versão:

CAAE: 30354714.9.0000.5187

Instituição Proponente: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB / Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: CNPQ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 631.357

Data da Relatoria: 16/04/2014

Apresentação do Projeto:

O presente estudo a ser desenvolvido consistirá em uma pesquisa de caráter observacional, com corte transversal, caracterizada pela observação, análise,

registro e quantificação das subpopulações M1 e M2 de MATs e das células Treg, bem como da expressão das quimiocinas CCL20 e CCL22, por

meio de imunistoquímica, em carcinomas de células escamosas de lábio inferior, estabelecendo-se relações com parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase em linfonodos regionais, metástase à distância, estágio clínico, recorrência local e desfecho) e grau histopatológico de malignidade dos tumores.

A amostra será constituída por 30 casos de carcinoma de células escamosas de lábio inferior com metástase linfonodal regional e 30 casos sem metástase, todos emblocados em parafina, obtidos nos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB. ESTUDO CLÍNICO Informações a respeito do sexo e idade dos pacientes, bem como em relação ao tamanho do tumor, presença de metástase em linfonodos regionais, presença de metástase à distância, estágio clínico, recidiva e desfecho serão coletadas nos prontuários médicos dos pacientes.

Endereço: Av. dos Barões, 351 - Campus Universitário
Bairro: Bodocongó **CEP:** 58.109-753
UF: PB **Município:** CAMPINA GRANDE
Telefone: (83)3315-3373 **Fax:** (83)3315-3373 **E-mail:** cep@uepb.edu.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - UEPB / PRÓ-
REITORIA DE PÓS-



Continuação do Parecer: 031.357

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar, por meio de imunohistoquímica, a presença das subpopulações M1 e M2 de MATs em carcinomas de células

escamosas de lábio inferior, relacionando a quantidade destes tipos celulares com parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase em linfonodos

regionais, metástase à distância, estágio clínico, recidiva local e desfecho) e com a gradação histopatológica de malignidade dos tumores.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Por se tratar de uma pesquisa que realizará a coleta de dados 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. Portanto, não há riscos previsíveis.

Benefícios: Ao permitir que os dados clínicos, histopatológicos e o material biológico das lesões sejam incluídos na pesquisa, os participantes contribuirão para a identificação de possíveis indicadores de agressividade tumoral em carcinomas de células escamosas de lábio inferior.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A proposta do projeto é relevante e apresenta 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:

Encontram-se em anexo.

Recomendações:

Sem recomendações.

Condições ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Endereço: Av. das Bananeiras, 351 - Campus Universitário
Bairro: Bodocongó CEP: 58.109-753
UF: PB Município: CAMPINA GRANDE
Telefone: (83)3315-3373 Fax: (83)3315-3373 E-mail: cep@uepb.edu.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - UEPB / PRÓ-
REITORIA DE PÓS-



Continuação do Parecer: 031.267

Este Colegiado acata o parecer do relator CEP da UEPB e mantém a referida aprovação.

CAMPINA GRANDE, 30 de Abril de 2014

Assinador por:
Doralúcia Pedrosa de Araújo
(Coordenador)

Endereço: Av. das Bananeiras, 351- Campus Universitário
Bairro: Bodocongó CEP: 58.109-753
UF: PB Município: CAMPINA GRANDE
Telefone: (83)3315-3373 Fax: (83)3315-3373 E-mail: cep@uepb.edu.br

ANEXO B – Normas para submissão de trabalhos no periódico *Brazilian Dental Journal*

ESCOPO E POLÍTICA

O **Brazilian Dental Journal** publica artigos completos, comunicações rápidas e relatos de casos relacionados a assuntos de Odontologia ou disciplinas correlatas. Serão considerados para publicação apenas artigos originais. Na submissão de um manuscrito, os autores devem informar em carta de encaminhamento que o material não foi publicado anteriormente e não está sendo considerado para publicação em outro periódico, quer seja no formato impresso ou eletrônico.

ENDEREÇO ELETRÔNICO PARA SUBMISSÃO:

<http://mc04.manuscriptcentral.com/bdj-scielo>

SERÃO CONSIDERADOS APENAS TRABALHOS REDIGIDOS EM INGLÊS. Autores cuja língua nativa não seja o Inglês, devem ter seus manuscritos revisados por profissionais proficientes na Língua Inglesa. **Os trabalhos aceitos para publicação serão submetidos à Revisão Técnica, que compreende revisão linguística, revisão das normas técnicas e adequação ao padrão de publicação do periódico. O custo da Revisão Técnica será repassado aos autores. A submissão de um manuscrito ao BDJ implica na aceitação prévia desta condição.** A decisão de aceitação para publicação é de responsabilidade dos Editores e baseia-se nas recomendações do corpo editorial e/ou revisores "ad hoc". Os manuscritos que não forem considerados aptos para publicação receberão um e-mail justificando a decisão. Os conceitos emitidos nos trabalhos publicados no BDJ são de responsabilidade exclusiva dos autores, não refletindo obrigatoriamente a opinião do corpo editorial.

FORMAS E PREPARAÇÃO DE MANUSCRITOS

AS NORMAS DESCRITAS A SEGUIR DEVERÃO SER CRITERIOSAMENTE SEGUIDAS.

GERAL

- Submeter o manuscrito em Word e em PDF, composto pela página de rosto, texto, tabelas, legendas das figuras e figuras (fotografias, micrografias, desenhos esquemáticos, gráficos e imagens geradas em computador, etc).
- O manuscrito deve ser digitado usando fonte Times New Roman 12, espaço entrelinhas de 1,5 e margens de 2,5 cm em todos os lados. **NÃO UTILIZAR** negrito, marcas d'água ou outros recursos para tornar o texto visualmente atrativo.
- As páginas devem ser numeradas sequencialmente, começando no *Summary*.
- Trabalhos completos devem estar divididos sequencialmente conforme os itens abaixo:

1. Página de Rosto
2. Summary e Key Words
3. Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão
4. Resumo em Português (obrigatório apenas para os autores nacionais)
5. Agradecimentos (se houver)
6. Referências
7. Tabelas
8. Legendas das figuras
9. Figuras

- Todos os títulos dos capítulos (Introdução, Material e Métodos, etc) em letras maiúsculas e sem negrito.
- Resultados e Discussão **NÃO** podem ser apresentados conjuntamente.
- Comunicações rápidas e relatos de casos devem ser divididos em itens apropriados.
- Produtos, equipamentos e materiais: na primeira citação mencionar o nome do fabricante e o local de fabricação completo (cidade, estado e país). Nas demais citações, incluir apenas o nome do fabricante.
- Todas as abreviações devem ter sua descrição por extenso, entre parênteses, na primeira vez em que são mencionadas.

PÁGINA DE ROSTO

- A primeira página deve conter: título do trabalho, título resumido (*short title*) com no máximo 40 caracteres, nome dos autores (máximo 6), Departamento, Faculdade e/ou Universidade/Instituição a que pertencem (incluindo cidade, estado e país). **NÃO INCLUIR** titulação (DDS, MSc, PhD etc) e/ou cargos dos autores (Professor, Aluno de Pós-Graduação, etc).
- Incluir o nome e endereço **completo** do autor para correspondência (**informar e-mail, telefone e fax**).
- A página de rosto deve ser incluída em arquivo separado do manuscrito.

MANUSCRITO

- **O manuscrito deve conter:**
- A primeira página do manuscrito deve conter: título do trabalho, título resumido (*short title*) com no máximo 40 caracteres, sem o nome dos autores.

SUMMARY

- A segunda página deve conter o *Summary* (resumo em Inglês; máximo 250 palavras), em redação contínua, descrevendo o objetivo, material e métodos, resultados e conclusões. Não dividir em tópicos e não citar referências.
- Abaixo do *Summary* deve ser incluída uma lista de Key Words (5 no máximo), em letras minúsculas, separadas por vírgulas.

INTRODUÇÃO

- Breve descrição dos objetivos do estudo, apresentando somente as referências pertinentes. Não deve ser feita uma extensa revisão da literatura existente. As hipóteses do trabalho devem ser claramente apresentadas.

MATERIAL E MÉTODOS

- A metodologia, bem como os materiais, técnicas e equipamentos utilizados devem ser apresentados de forma detalhada. **Indicar os testes estatísticos utilizados neste capítulo.**

RESULTADOS

- Apresentar os resultados em uma sequência lógica no texto, tabelas e figuras, enfatizando as informações importantes.
- Os dados das tabelas e figuras não devem ser repetidos no texto.
- Tabelas e figuras devem trazer informações distintas ou complementares entre si.
- Os dados estatísticos devem ser descritos neste capítulo.

DISCUSSÃO

- Resumir os fatos encontrados sem repetir em detalhes os dados fornecidos nos Resultados.
- Comparar as observações do trabalho com as de outros estudos relevantes, indicando as implicações dos achados e suas limitações. Citar outros estudos pertinentes.
- Apresentar as conclusões no final deste capítulo. Preferencialmente, as conclusões devem ser dispostas de forma corrida, isto é, evitar citá-las em tópicos.

RESUMO (em Português) - Somente para autores nacionais

O resumo em Português deve ser **IDÊNTICO** ao resumo em Inglês (Summary). OBS: **NÃO COLOCAR** título e palavras-chave em Português.

AGRADECIMENTOS

O Apoio financeiro de agências governamentais deve ser mencionado. Agradecimentos a auxílio técnico e assistência de colaboradores podem ser feitos neste capítulo.

REFERÊNCIAS

- As referências devem ser apresentadas de acordo com o estilo do **Brazilian Dental Journal**. É recomendado aos autores consultar números recentes do BDJ para se familiarizar com a forma de citação das referências.
- As referências devem ser numeradas por ordem de aparecimento no texto e citadas entre parênteses, sem espaço entre os números: (1), (3,5,8), (10-15). **NÃO USAR SOBRESCRITO.**
- Para artigos com dois autores deve-se citar os dois nomes sempre que o artigo for referido. Ex: "According to Santos **and** Silva (1)...". Para artigos com três ou mais autores, citar apenas o primeiro autor, seguido de "et al.". Ex: "Pécora et al. (2) reported that..."

- Na lista de referências, os nomes de TODOS OS AUTORES de cada artigo devem ser relacionados. Para trabalhos com 7 ou mais autores, os 6 primeiros autores devem ser listados seguido de "et al."
- A lista de referências deve ser digitada no final do manuscrito, em sequência numérica. Citar **NO MÁXIMO** 25 referências.
- A citação de abstracts e livros, bem como de artigos publicados em revistas não indexadas deve ser evitada, a menos que seja absolutamente necessário. **Não citar referências em Português.**
- Os títulos dos periódicos devem estar abreviados de acordo com o Dental Index. O estilo e pontuação das referências devem seguir o formato indicado abaixo:

Periódico

1. Lea SC, Landini G, Walmsley AD. A novel method for the evaluation of powered toothbrush oscillation characteristics. Am J Dent 2004;17:307-309.

Livro

2. Shafer WG, Hine MK, Levy BM. A textbook of oral pathology. 4th ed. Philadelphia: WB Saunders; 1983.

Capítulo de Livro

3. Walton RE, Rotstein I. Bleaching discolored teeth: internal and external. In: Principles and Practice of Endodontics. Walton RE (Editor). 2nd ed. Philadelphia: WB Saunders; 1996. p 385-400.

TABELAS

- As tabelas com seus respectivos títulos devem ser inseridas após o texto, numeradas com algarismos arábicos; **NÃO UTILIZAR** linhas verticais, negrito e letras maiúsculas (exceto as iniciais).
- O título de cada tabela deve ser colocado na parte superior.
- Cada tabela deve conter toda a informação necessária, de modo a ser compreendida independentemente do texto.

FIGURAS

- **NÃO SERÃO ACEITAS FIGURAS INSERIDAS EM ARQUIVOS ORIGINADOS EM EDITORES DE TEXTO COMO O WORD E NEM FIGURAS EM POWER POINT;**
- Os arquivos digitais das imagens devem ser gerados em Photoshop, Corel ou outro software similar, com extensão TIFF e resolução mínima de 300 dpi. Apenas figuras em **PRETO E BRANCO** são publicadas. Salvar as figuras no CD-ROM.
- Letras e marcas de identificação devem ser claras e definidas. Áreas críticas de radiografias e fotomicrografias devem estar isoladas e/ou demarcadas.
- Partes separadas de uma mesma figura devem ser legendadas com letras **maiúsculas** (A, B, C, etc). Figuras simples e pranchas de figuras devem ter largura mínima de 8 cm e 16 cm, respectivamente.
- As legendas das figuras devem ser numeradas com algarismos arábicos e apresentadas em uma página separada, após a lista de referências (ou após as tabelas, quando houver).

ENVIO DE MANUSCRITOS

- **CHECAR OS ITENS ABAIXO ANTES DE ENVIAR O MANUSCRITO À REVISTA**
- 1. Carta de submissão.
- 2. Página de rosto.
- 3. Manuscrito (incluindo tabelas e legendas).
- 4. No manuscrito, observar:
 - - identificação dos autores somente na página de rosto.
 - - texto digitado em fonte Times New Roman 12, espaço entrelinhas de 1,5 e margem de 2,5 cm em todos os lados.
 - - tabelas, legendas e figuras ao final do texto.
- 5. Os arquivos digitais as figuras em preto e branco, salvas em TIFF, com resolução mínima de 300 dpi.