



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

**ARLEY DE SOUSA LEITÃO**

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

**Campina Grande-PB**

**2015**

**ARLEY DE SOUSA LEITÃO**

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

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

**Orientador:** Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy

**Co-Orientadora:** Profa. Dra. Pollianna Alves Muniz

**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.

L533a Leitão, Arley de Sousa.

Análise imunoistoquímica das subpopulações M1 e M2 de Macrófagos associados a tumores (Mats) em carcinomas de células escamosas de língua [manuscrito] / Arley de Sousa Leitão. - 2015. 71 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

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

"Co-Orientação: Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves, Departamento de Odontologia".

1. Carcinoma de células escamosas oral. 2. Ativação de macrófagos. 3. Tumores. 4. Saúde bucal. I. Título.

21. ed. CDD 617.63

ARLEY DE SOUSA LEITÃO

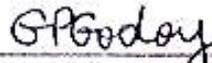
**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DAS SUBPOPULAÇÕES M1 E M2 DE  
MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES (MATs) EM CARCINOMAS DE  
CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA**

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

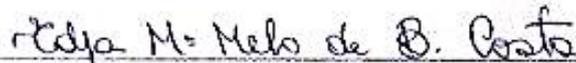
Área de concentração: Clínicas  
Odontológicas

Aprovado em: 30/07/2015.

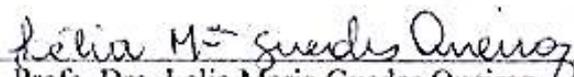
**BANCA EXAMINADORA**



Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy (Orientador)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Edja Maria Melo de Brito Costa  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Lélia Maria Guedes Queiroz  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

A minha mãe **Masileide** pelo apoio incondicional e por sempre acreditar que sou capaz de conquistar meus sonhos

Aos **pacientes** que participaram desta pesquisa, foco principal de todo nosso trabalho. Espero que possamos colaborar para saúde e bem-estar destes pacientes que lutam/lutaram diariamente pela vida

DEDICO.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por abençoar a mim e minha família, possibilitando vitórias e me mostrando, sempre, o melhor caminho para a felicidade.

À UEPB por possibilitar minha qualificação profissional como Cirurgião-Dentista e Mestre em Odontologia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

À minha querida mãe, por representar meu maior exemplo, realizando sua vontade estarei realizando a minha.

À minha família que, estando próximos ou distantes, tem por mim um amor incondicional, obrigado por me apoiarem e acreditarem sempre no meu potencial, ela será a razão pela qual luto na vida.

Aos meus amigos e colegas de turma que se tornaram minha segunda família por 2 anos, e assim serão por muitos mais.

Aos amigos, colegas de mestrado e técnicas do Laboratório de Anatomopatologia da UEPB, sem vocês jamais teria concluído este estudo adequadamente.

Ao meu orientador Gustavo Pina Godoy, pela paciência, calma e dedicação, com ele aprendi os valores da ética e responsabilidade, pelo seu apoio serei sempre grato.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB, em nome da coordenadora profa. Dra Patrícia Meira Bento por participarem diretamente na minha formação como docente.

Aos professores Dra. Pollianna Muniz Alves, Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka e Dra Daliana Queiroga pelas orientações e pelo apoio, os senhores foram os principais agentes para o desenvolvimento deste estudo.

Aos queridos amigos Ericka Ponchet, Rayanne Maciel e Pedro Sette, por estarem sempre presentes e me ajudarem a passar pelos momentos difíceis da melhor forma possível.

Aos profissionais do Hospital Napoleão Laureano pelo apoio que foi imprescindível para a realização deste e de outros trabalhos.

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais  
voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

## RESUMO

Carcinoma de células escamosas oral (CCEO) representa mais de 90% dos tumores malignos da mucosa oral, apresentando característica infiltrativa, curso clínico agressivo e prognóstico desfavorável. Um fator que pode interferir no prognóstico do CCEO consiste nos componentes do microambiente tumoral. Os macrófagos associados a tumores (MATs) representam uma parcela desta população celular e são divididos de acordo com seu estado de polarização: subtipo M1 que exerce propriedades anti-tumorais e o subtipo M2 que apresenta atividade anti-inflamatória. A relação dos MATs com o CCEO em pacientes jovens ainda não é conhecida. O presente estudo teve por objetivo analisar, por meio de técnica imunoistoquímica, a presença das subpopulações M1 e M2 de MATs em uma série de casos de carcinoma de células escamosas de língua (CCEL). Cortes histológicos obtidos de 44 casos de CCEL divididos em dois grupos (11 casos de pacientes jovens  $\leq 45$  anos e 33 casos de pacientes idosos  $\geq 60$  anos) foram avaliados, sendo assim determinadas as gradações histopatológicas de malignidade. O material foi submetido à técnica de dupla coloração para os anticorpos monoclonais anti-CD68, anti-CD163 e anti-HLA-DR, obtendo a distinção entre os MATs M1 (CD68/HLA-DR) e M2 (CD68/CD163). Os MATs M1 e M2, quando comparados, apresentaram contagens semelhantes no que diz respeito ao tamanho do tumor, presença de metástase linfonodal, presença de metástase à distância e gradação histopatológica de malignidade, no entanto observou-se uma maior contagem de MATs M1 em pacientes diagnosticados com T1 (6,85), e uma maior contagem de M2 em casos T4 (4,55), sugerindo que a maior presença de M1 pode estar relacionada com lesões de tamanho reduzido enquanto que uma maior presença de M2 pode estar relacionada com lesões mais expansivas. Observou-se, também, que em lesões pobremente diferenciadas a contagem de M2 (6,85) foi mais expressiva que a de M1 (4,55), sugerindo que a maior presença de M2 pode estar relacionada com lesões de morfologia mais indiferenciada.

**Palavras-chave:** língua, carcinoma de células escamosas, ativação de macrófagos, imuno-histoquímica.

## ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is more than 90% of malignant tumors of the oral mucosa, with infiltrative feature, aggressive clinical course and poor prognosis. A factor that can interfere in the OSCC prediction consists of the components of the tumor microenvironment. Tumor associated macrophages (TAMs) represent a portion of this cell population and are divided according to their state of polarization: M1 subtype that exerts anti-tumor properties and the M2 subtype that has anti-inflammatory activity. The list of TAMs with OSCC in young patients still unknown. The present study analyzed, through immunohistochemistry, the presence of subpopulations M1 and M2 of TAMs in a number of cases of squamous cell carcinoma of tongue (SCCT). Histological sections obtained from 44 cases of SCCT divided into two groups (11 cases of young patients  $\leq 45$ , and 33 cases of elderly patients  $\geq 60$  years) were evaluated, thus being certain histopathological grades of malignancy. The material was subjected to double staining technique for the anti-CD68 monoclonal antibody, anti-CD163 and anti-HLA-DR, obtaining the distinction between TAMs M1 (CD68 / HLA-DR) and M2 (CD68 / CD163). Cases of SCCT analyzed in this study, compared to age 11 (25.0%) patients were young while 33 (75.0%) were elderly. For histopathological grading of malignancy proposed by WHO, the assessment of TAMs M1 showed medians of 12.3 in well-differentiated tumors; 5.8 in the moderately differentiated tumors and 5.8 in poorly differentiated lesions. For TAMs M2, lesions classified as well differentiated revealed a median of 10.7; moderately differentiated lesions exhibited a median of 2.7 and poorly differentiated tumors showed a median of 6.85. Regarding the histological grade of malignancy proposed by Bryne, the evaluation of TAMs M1 showed medians of 11.3 in tumors classified as low-grade and 5.55 in the highly malignant tumors. For TAMs M2, low-grade malignant lesions revealed a median of 8.7 and high-grade lesions exhibited a median of 4.00. This study suggests that the tumor microenvironment has a direct participation in the progression of the disease.

**Keywords:** Tongue, Squamous Cell Carcinoma, Macrophage Activation, Immunohistochemistry.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCE	Carcinoma de células escamosas
CCEL	Carcinoma de células escamosas de língua
CCEO	Carcinoma de células escamosas oral
TNM	Sistema de estadiamento clínico
MATs	Macrófagos associados a tumores
CMATs	Células mielóides associadas a tumores
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
IFN- $\gamma$	Interferon gama
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento
CNS	Conselho Nacional de Saúde
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IUAC	International Union Against Cancer
PAP	Peroxidase anti-peroxidase
CXCR4	C-X-C quimiocina receptor tipo 4
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
VEGF	Fator de crescimento vascular endotelial
OMS	Organização Mundial da Saúde
APAAP	Fosfatase alcalina anti-fosfatase alcalina

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. A-H	Aspectos morfológicos dos CCEL.....	51
Figura 2. A-H	Marcação imunoistoquímica anti-CD68; anti-HLA-DR e anti-CD163....	52

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

**Quadro 1.** Sistema de estadiamento clínico TNM, preconizado por Sobin, Wittekind (2002).

**Quadro 2.** Categorias de estadiamento clínico TNM, preconizado por Sobin, Wittekind (2002).

**Quadro 3.** Sistema de gradação histopatológica de malignidade proposta por Bryne (1998)

**Quadro 4.** Sistema de gradação histopatológica de malignidade proposta pela OMS (CARDESA et al, 2005)

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

**Quadro 6.** Variáveis dependentes e independentes do estudo.

**Tabela 1.** Distribuição absoluta e relativa dos casos de CCEL de acordo com os parâmetros clínico-patológicos.

**Tabela 2.** Distribuição absoluta dos casos de CCEL de acordo com a faixa etária e parâmetros clínico-patológicos (TNM)

**Tabela 3.** Distribuição absoluta dos casos de CCEL de acordo com a faixa etária e parâmetros clínico-patológicos (estadiamento clínico e gradações histopatológicas de malignidade)

**Tabela 4.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75 para a quantidade de MATs M1 em relação aos parâmetros clínico-patológicos.

**Tabela 5.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75 para a quantidade de MATs M2 em relação aos parâmetros clínico-patológicos.

## SUMÁRIO

<b>1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> .....	14
1.1 INFILTRADO INFLAMATÓRIO .....	16
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	19
2.1 OBJETIVO GERAL .....	19
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	19
<b>3 METODOLOGIA</b> .....	20
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	20
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	20
3.3 LOCAL DO ESTUDO.....	20
3.4 POPULAÇÃO.....	20
3.5 AMOSTRA .....	21
<b>3.5.1 Critérios de Inclusão</b> .....	21
<b>3.5.1 Critérios de Exclusão</b> .....	21
3.6 ESTUDO CLÍNICO.....	21
3.7 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO .....	25
<b>3.7.1 Método imunoistoquímica</b> .....	25
<b>3.7.2 Análise imunoistoquímica</b> .....	28
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	29
3.9 VARIÁVEIS .....	30
<b>4 ARTIGO</b> .....	31
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.</b> .....	53
<b>REFERÊNCIAS.</b> .....	54
<b>APÊNDICES</b> .....	60
<b>ANEXO</b> .....	71

## 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O câncer é causado por alterações no material genético de células transformadas. Estas anomalias podem ser resultado dos efeitos de agentes carcinogênicos como o tabagismo, radiação, substâncias químicas ou agentes infecciosos. As interações complexas entre agentes carcinogênicos e o genoma do hospedeiro podem explicar porque somente alguns indivíduos desenvolvem câncer após a exposição a um carcinógeno conhecido. Tal doença é considerada um problema de saúde pública, cuja prevenção e o diagnóstico precoce ainda constituem as melhores formas de reverter essa situação (INCA, 2014).

O carcinoma de células escamosas (CCE) corresponde à neoplasia mais frequente da cavidade oral, sendo considerada uma doença multifatorial e de alta incidência no mundo (DAHER et al., 2008; HASSON, 2008; ORTHOLAN et al., 2009; RIBEIRO et al., 2009; ZINI; CZERNINSKI; SGAN-COHEN, 2010; FELLER; LEMMER, 2012; SHENOI et al., 2015). O CCE representa mais de 90% dos tumores malignos da mucosa oral, havendo evidências clínicas que os CCE têm um pior prognóstico quando acometem a língua. Geralmente, o CCE em língua (CCEL) mostra invasão de forma mais infiltrativa e, por conseguinte, predispõem à formação de metástases (FREITAS et al, 2010).

O CCE oral em pacientes jovens talvez seja uma doença distinta daquela que ocorre em pacientes mais velhos, uma vez que apresentam etiologia e progressão clínica particulares. Em conjunto com o aumento da incidência, existem de poucos estudos que avaliem a taxa de sobrevivência dos pacientes acometidos. Fatores de risco tradicionais talvez não sejam os responsáveis pela incidência dos casos de CCE em pacientes jovens, o que demonstra a necessidade de um melhor entendimento da epidemiologia do câncer oral, em especial na faixa etária anteriormente citada (VENTURI et al, 2004; RAHAMAN; MUJIB ,2014).

Neste contexto, tem-se estudado o papel pró-tumoral das células inflamatórias do microambiente tumoral, resultando na capacidade de estas expressarem distintos programas funcionais em resposta a diferentes sinais e/ou condições microambientais (VAUPEL; MAYER, 2007; MANTOVANI, 2010; COSTA et al, 2013). Os macrófagos, principais representantes de defesa no microambiente tumoral, são fenotipicamente reconhecidos sob duas polarizações: M1 e M2. O fenótipo M1, por ser uma ativação macrofágica clássica, possui propriedades pró-inflamatórias, mantendo níveis constantes e elevados de citocinas como interleucina-12, -23 e IFN- $\gamma$ . Além disso, são capazes de destruir células neoplásicas por meio de espécies reativas de oxigênio. Por sua vez, o subtipo M2, correspondendo a uma

ativação macrofágica alternativa, tem condições moleculares que viabilizam o escape de células neoplásicas da vigilância imunológica. Essa capacidade de imunossupressão desenvolvida pelo tumor é reflexo da produção de citocinas anti-inflamatórias e imunossupressoras (Interleucina-10 e TGF- $\beta$ ), inibição das funções inflamatórias e citotóxicas do subtipo M1, indução da angiogênese, remodelação e reparo tecidual, condições estas que contribuem para o crescimento e disseminação tumoral (GORDON, 2007; MARTINEZ et al., 2009; MA et al., 2010; SICA, 2010; BAAY et al., 2011; CASSETTA et al., 2011; SHAPIRO et al., 2011; FUJII et al., 2012; MERRY et al., 2012; SICA et al., 2012; COSTA et al., 2013).

Um sistema de estadiamento clínico foi desenvolvido segundo a classificação da *International Union Against Cancer- IUAC*. Este sistema, conhecido como TNM, tem como base a avaliação da dimensão do tumor (T), a extensão da disseminação em linfonodos regionais (N) e a presença ou não de metástase à distância (M). A combinação das diversas variantes de T, N e M determinam os estádios que variam de I a IV. A divisão de casos de câncer em grupos, de acordo com os estádios, deveu-se ao fato das taxas de sobrevivência serem maiores nos casos em que a doença estava localizada, e menores quando havia se estendido além do órgão de origem (BRASIL, 2004).

Na maioria dos casos os portadores do CCEL são homens idosos, que em geral percebem alguma alteração por 4 a 8 meses antes de buscar atendimento, no entanto há um aumento na incidência de CCEL em pacientes abaixo dos 40 anos de idade. Estudos sugerem que a doença segue um curso mais agressivo em pacientes jovens, levando a uma taxa de mortalidade de 40% no período de 2 anos. CCEL em pacientes com menos de 40 anos de idade parece apresentar um comportamento biológico distinto, mas a etiopatogenia nestes casos permanece desconhecida. (POPOVTZER et al., 2004; GARAVELLO, SPREAFICO, GAINI, 2006; HILLY et al., 2013). Existe uma dor mínima na fase inicial da doença, o que pode explicar a demora na procura por atendimento.

Clinicamente pode se apresentar como um aumento de volume com crescimento exofítico (vegetante, papilar ou verruciforme) ou ainda como um crescimento endofítico (invasivo, escavado ou ulcerado); leucoplásico; eritroplásico ou leucoeritroplásico.

Histopatologicamente nota-se a presença de lençóis, ninhos, cordões ou pequenos grupos de células epiteliais tumorais invadindo a lâmina própria. Essas células invasoras apresentam alterações morfológicas (nucléolos proeminentes, pleomorfismo celular e nuclear, hiperchromatismo nuclear, multinucleação, eosinofilia citoplasmática, diskeratose, elevado número de mitoses e mitoses atípicas). Dependendo do grau de diferenciação celular é possível encontrar acúmulos de ceratina (pérolas de ceratina) em meio à região de invasão,

além de poder observar no estroma tumoral a presença de infiltrado inflamatório (REGEZI, SCIUBBA, JORDAN, 2008; NEVILLE et al., 2009). A diferenciação histopatológica e o padrão de invasão têm sido ultimamente correlacionados ao comportamento biológico do CCEO, podendo ser auxiliar na identificação de pacientes com maior risco de apresentar metástases linfonodais (BRYNE, 1991; BRYNE, 1998).

Até o presente momento, não são encontrados na literatura estudos que avaliem a participação de MATs em CCEL comparando pacientes jovens e idosos. Sendo assim, com esta pesquisa, pretende-se avaliar o papel dos MATs M1 e M2 na patogênese do CCEL, em especial nos pacientes jovens, com intuito de contribuir com informações úteis na determinação do prognóstico e individualização dos tratamentos.

### 1.1 INFILTRADO INFLAMATÓRIO

Por meio da inflamação os organismos vivos são capazes de restabelecer seus tecidos danificados. Esse mecanismo é de grande importância na manutenção da integridade dos tecidos submetidos a agressões. Quando adequadamente regulado, esse mecanismo é harmonioso e autolimitado, ou seja, cessa assim que o reparo tecidual tenha sido efetuado (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; BRASILEIRO-FILHO, 2011).

Diante de uma lesão provocada por agentes físicos, químicos, biológicos ou genéticos teremos uma reação sob forma de inflamação, esta é reconhecida pelas células de defesa do organismo que, estando ativadas, irão liberar mediadores químicos como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. Estes orientarão o processo de reparo, onde os tecidos adjacentes à lesão aumentam sua permeabilidade e assim possibilitam a atividade de células fagocitárias, além de permitir a angiogênese e favorecer um maior aporte de oxigênio e nutrientes ao local (SHERWOOD, TOLIVER-KINSKY, 2004; BARRETO et al., 2011).

As células neoplásicas aproveitam deficiências imunológicas em favor do crescimento e invasão tumoral. Rudolf Virchow, em 1863, foi o primeiro a identificar a presença de leucócitos em tecidos circunjacentes às neoplasias, sugerindo que estas células estariam envolvidas na carcinogênese. Por muito tempo as hipóteses levantadas por Virchow serviram de base para o entendimento do microambiente inflamatório em tecidos neoplásicos. (BALKWILL, MANTOVANI, 2001; BARRETO et al., 2011).

Algumas das células inflamatórias residentes teciduais são os macrófagos, estes são provenientes de um precursor circulante no sangue, o monócito. O monócito tem de 10 a 15 µm de diâmetro, possui núcleo em “forma de rim” e um citoplasma granular, contendo

lisossomos, vacúolos fagocitários e filamentos do citoesqueleto. Uma vez estabelecidos nos tecidos, essas células amadurecem, tornando-se macrófagos que recebem nomes especiais para designar localizações específicas (ABBAS, LICHTMAN, 2005).

Os macrófagos podem exibir morfologia variada e um expressivo repertório de funções, estando presentes em todos os órgãos e tecido conjuntivo. Alguns desenvolvem um citoplasma abundante, semelhante à célula epitelial, por isso são denominados de células epitelióides. Outros se fundem, formando células gigantes multinucleadas (ABBAS, LICHTMAN, 2005).

Dentre algumas funções naturais dos macrófagos destaca-se: apresentação de antígenos, fagocitose de restos celulares e recrutamento de outras células imunes como reforço no combate aos corpos estranhos e células neoplásicas (SHAPIRO, LUTATY, ARIEL, 2011).

Todavia os macrófagos apresentam uma plasticidade fenotípica que favorece a produção de uma variedade de citocinas, as quais poderão promover a progressão tumoral. O interferon- $\gamma$  e lipopolissacarídeos são substâncias produzidas por uma classe de macrófagos, M1, e corresponde a “ativação clássica” dessas células em respostas imunológicas. Os macrófagos M1 compreendem a primeira linha de defesa contra patógenos intracelulares, além de ativar os linfócitos T- CD4+ (MA et al., 2010; SHAPIRO, LUTATY, ARIEL, 2011; FUJII et al., 2012).

Já interleucina-4, -10 e -13, são mediadores químicos produzidos por outra linhagem de macrófago, M2, correspondendo a uma “ativação alternativa” destas células (MA et al., 2010; FUJII et al., 2012).

Coffelt, Hughes e Lewis (2009) mostraram que a maior quantidade fenotípica de MATs corresponde ao tipo M2. Embora sua presença em demasia tenha sido associada a piores prognósticos em diversos estudos (ÁLVARO et al., 2006; LEE et al., 2008; RYDER et al., 2008; KURAHARA et al., 2009; KAWAHARA et al., 2010). Tal fato pode ser resultado de diferenças no comportamento biológico entre diversas neoplasias e/ou do uso incorreto dos marcadores nas análises imunoistoquímicas (BAAY et al., 2011).

Nas análises imunoistoquímicas de subpopulações de macrófagos costumam-se utilizar os anticorpos anti-CD68 e anti-CD163. No entanto o anticorpo anti-CD68 reconhece tanto macrófagos M1 quanto M2. Portanto seu uso único não deve servir de parâmetro para associar características clínico-patológicas da lesão com uma maior quantidade de macrófago M2 ou M1. Por outro lado, o anticorpo anti-CD163 é específico para macrófagos M2. Embora o aumento da expressão de M2 em câncer de pulmão e carcinoma de células renais tenha sido correlacionado a um pobre prognóstico, seu papel em carcinoma de células escamosas oral

ainda gera dúvidas devido à escassez de estudos em tal lesão (OHRI et al., 2009; Le Xu et al., 2014).

Os anticorpos CD68, HLA-DR e CD163 são largamente utilizados para identificar macrófagos, no entanto, essas moléculas também são expressas por outras células dentre elas: células dendríticas imaturas CD1a-positivas (sensíveis ao CD68), linfócitos periféricos (reativos ao HLA-DR) e algumas células dendríticas (identificadas pelo CD163). Desta forma, postula-se que a dupla-coloração com os marcadores macrofágicos CD68/HLA-DR (MATs M1) ou CD68/CD163 (MATs M2) pode identificar mais especificamente os MATs. (BAAY et al., 2011; FUJII et al., 2012; WADA et al., 2012).

Os MATs desempenham um importante papel no crescimento de tumores e metástase. Isso implica que interações entre as células tumorais e MATs fornecem uma oportunidade para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas. O papel pró-tumoral das células mielóides associadas a tumores (CMATs) revela-se na capacidade de estas expressarem distintos programas funcionais em resposta a diferentes sinais e/ou condições microambientais (VAUPEL; MAYER, 2007; MANTOVANI; SICA, 2010).

Devido à escassez de estudos que permitam um melhor entendimento entre a interação do microambiente tumoral de CCEL em pacientes jovens com a progressão do tumor, a presente pesquisa se propôs a analisar, por meio de técnica imunoistoquímica, a presença das subpopulações M1 e M2 de MATs em uma série de casos de CCEL e verificar um possível envolvimento destes subtipos celulares no prognóstico de pacientes jovens acometidos por esta lesão.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar, através da técnica imunoistoquímica, a presença das subpopulações M1 e M2 de MATs pela utilização de anticorpos para as proteínas CD68, HLA-DR e CD163 em CCEL, e verificar um possível envolvimento destes subtipos celulares com o prognóstico desses tumores em pacientes jovens e idosos.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a gradação histopatológica de malignidade dos CCEL de pacientes jovens e idosos;

Verificar se existe diferença na expressão das subpopulações M1 (CD68/HLA-DR) e M2 (CD68/CD163) entre os CCEL de pacientes jovens e idosos;

Analisar a expressão imunoistoquímica em dupla-marcação para as proteínas CD68/HLA-DR e CD68/CD163 em diferentes gradações histopatológicas de malignidade;

Avaliar a expressão imunoistoquímica das subpopulações M1 e M2 de MATs em CCEL, considerando os dados clínicos dos pacientes: sexo, TNM e estadiamento clínico.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho foi cadastrado na Base de Registros de Pesquisa envolvendo seres humanos (Plataforma Brasil) e submetido à apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba – UEPB, de acordo com a resolução 466/12 do CNS, obtendo parecer favorável sob número 25017513.9.0000.5187 (ANEXO 1)

Os pesquisadores assinaram um termo de compromisso (APÊNDICE A) e foram encaminhados ao Hospital Napoleão Laureano pela Coordenação da Pós-graduação em Odontologia (APÊNDICE B) para submissão da pesquisa ao Comitê de Ética em Pesquisa do hospital, recebendo parecer favorável (APÊNDICE C).

#### 3.2. CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

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

#### 3.3. LOCAL DO ESTUDO

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

A análise da gradação histopatológica de malignidade dos tumores foi realizada no Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande – PB, onde também foram realizados os estudos imunoistoquímicos.

#### 3.4. POPULAÇÃO

A população do presente estudo foi constituída por todos os casos de CCEL, diagnosticados e registrados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/João Pessoa – PB, no período de janeiro de 2002 a maio de 2015 que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão.

### 3.5. AMOSTRA

A técnica de amostragem empregada no estudo foi do tipo não-probabilista por conveniência. A amostra foi dividida em dois grupos: um com 11 casos de CCEL em pacientes com idade igual ou inferior a 45 anos (os quais foram considerados como CCEL em pacientes jovens) e outro com 33 casos de CCEL em paciente com idade igual ou superior a 60 anos (os quais foram considerados como CCEL em pacientes idosos), verificando os critérios de inclusão e exclusão listados abaixo.

#### 3.5.1. Critérios de Inclusão

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

#### 3.5.2. Critérios de Exclusão

Foram excluídos os casos provenientes de biópsia incisional ou excisional que não apresentaram quantidade suficiente de material biológico para avaliação histomorfológica e imunoistoquímica. Também foram desconsiderados os casos de pacientes que houvessem se submetido previamente a tratamento quimioterápico e/ou radioterápico previamente.

### 3.6 ESTUDO CLÍNICO

Inicialmente foram registrados os números originais tanto do prontuário quanto da peça parafinada, tal qual estão registrados no serviço de origem. Em seguida foram coletadas informações com relação ao sexo do paciente, idade, raça, tamanho/extensão do tumor, presença de metástases linfonodais regionais, metástases à distância, estadiamento clínico, ocupação profissional e hábitos deletérios conforme ficha específica (APÊNDICE D).

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

O estadiamento dos pacientes foi registrado mediante o descrito no prontuário, adotando-se a classificação TNM do INCA (Instituto Nacional do Câncer). Em seguida, o

estadiamento foi categorizado em estágio I-II para ausência de metástases (N0) e estágio III-IV para presença de metástases (N>0).

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 1 e 2.

**Quadro 1.** Sistema de estadiamento clínico TNM, preconizado por Sobin, Wittekind (2002).

<b>T – TUMOR PRIMÁRIO</b>	
<b>TX</b>	Tumor primário não pode ser avaliado
<b>T0</b>	Não há evidência de tumor primário
<b>Tis</b>	Carcinoma <i>in situ</i>
<b>T1</b>	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
<b>T2</b>	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em seu diâmetro maior
<b>T3</b>	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
<b>T4a</b>	Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, assoalho da boca ou pele da face
<b>T4b</b>	Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigóides, base do crânio ou artéria carótida interna
<b>N – LINFONODOS REGIONAIS</b>	
<b>NX</b>	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
<b>N0</b>	Ausência de metástase em linfonodos regionais
<b>N1</b>	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão
<b>N2</b>	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
<b>N3</b>	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão
<b>M – METÁSTASE À DISTÂNCIA</b>	
<b>MX</b>	Metástase à distância não pode ser avaliada
<b>M0</b>	Ausência de metástase à distância
<b>M1</b>	Presença de metástase à distância

**Quadro 2.** Categorias de estadiamento clínico TNM, preconizado por Sobin, Wittekind (2002).

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

#### *Análise histopatológica*

A amostra selecionada foi submetida a cortes de 5µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro limpas e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), os espécimes de CCEL foram examinados com aumentos de 100x e 400x. Ao longo do “*front*” de invasão tumoral foi realizada análise da gradação histopatológica de malignidade dos espécimes, de acordo com o sistema proposto por Bryne (1998) (Quadro 3). Para este sistema são atribuídos escores de 1 a 4 para os parâmetros analisados. Em seguida, os escores foram somados a fim de se obter o escore final de malignidade do caso, adotando a metodologia proposta por Silveira et al. (2010). As lesões que apresentaram escores finais entre 4 e 8 foram classificadas como de baixo grau de malignidade. Por sua vez, os tumores com escore final igual ou superior a 9 foram classificados como de alto grau de malignidade.

Para gradação histopatológica de malignidade proposta pela OMS toda a extensão do tumor foi avaliada, baseado no grau de diferenciação de células neoplásicas. Os casos de CCEL foram classificados em bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pobremente diferenciados. Foram denominados bem diferenciados os casos que possuíam arquitetura tecidual semelhante a um padrão normal de epitélio escamoso. Os moderadamente diferenciados apresentaram certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e menor

ceratinização. Por sua vez, os pobremente diferenciados caracterizam-se pela presença de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas e mínima ceratinização (Quadro 4) (CARDESA et al., 2005).

Ressalta-se que a gradação histopatológica de malignidade foi realizada por dois examinadores, um patologista oral experiente na área e um pesquisador previamente calibrado, sem que os mesmos tivessem conhecimento sobre os dados clínicos da lesão. Os casos que se apresentaram discordantes foram resolvidos por consenso.

**Quadro 3.** Sistema de gradação histopatológica de malignidade proposta por Bryne (1998)

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

**Quadro 4.** Sistema de gradação histopatológica de malignidade proposta pela OMS (CARDESA et al, 2005)

<b>Aspectos Morfológicos</b>	<b>Características</b>
<b>Pouco diferenciado</b>	Predomínio de células imaturas Numerosas mitoses típicas e atípicas Mínima ceratinização
<b>Moderadamente diferenciado</b>	Certo grau de pleomorfismo e atividade mitótica Pouca ceratinização
<b>Bem diferenciado</b>	Arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso

### 3.7 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

#### 3.7.1 Método imunoistoquímico (Doublestain)

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro devidamente preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*EnVision™ G/2 Doublestain System*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), utilizando anticorpos monoclonais anti-CD68, anti-CD163 e anti-HLA-DR (Quadro 4).

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

A técnica a ser utilizada seguiu o protocolo descrito abaixo:

- ⇒ Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (15 minutos cada);
- ⇒ Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:

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

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

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos)

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

⇒ Recuperação antigênica (Quadro 4);

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

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

⇒ Lavagem em água corrente (10 minutos);

⇒ Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

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

⇒ Incubação dos cortes com solução bloqueadora de enzima endógena (*Dual endogenous enzyme block*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (10 minutos);

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

⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário (CD68), 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 polimerizado à peroxidase (*Polymer/HRP*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (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);

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

- ⇒ Incubação com solução bloqueadora (*Doublestain block*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (30 minutos);
- ⇒ Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- ⇒ Incubação dos cortes com anticorpo primário (CD163 ou HLA-DR), 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 conjugado com polímero de dextrano (*Rabbit/Mouse Link*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (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 fosfatase alcalina (*Polymer/AP*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (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 vermelho permanente (*Permanent Red Substrate-Chromogen*, 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 de etanóis:
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- ⇒ Passagens rápidas em xilol (3 trocas);
- ⇒ Montagem em resina *Permout*® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

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

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
CD68	PG-M1	Dako	1:1500	Citrato, pH 6,0 Steamer, 90°C, 30 min	60 minutos
CD163	10D6	Novocastra	1:200	Citrato, pH 6,0 Steamer, 90°C, 30 min	60 minutos
HLA-DR	TAL.1B5	Dako	1:800	Citrato, pH 6,0 Steamer, 90°C, 30 min	60 minutos

### **i. 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 um examinador previamente calibrado.

A análise das subpopulações de MATs foi realizada de forma quantitativa, adaptando-se a metodologia utilizada no estudo Ma et al. (2010). Primeiramente, ao longo das regiões de “*córion*” e “*front*” de invasão tumoral, sob aumento de 100×, foram selecionados 10 campos de maior imunorreatividade (05 para cada região) aos anticorpos anti-CD68/anti-HLA-DR (MATs M1) e anti-CD68/anti-CD163 (MATs M2). Sob aumento de 400×, cada um destes campos foi fotomicrografado (*Leica ICC 50HD*, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador de uso pessoal. Com o auxílio do programa *ImageJ*® (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), em cada um destes campos, foi realizada a contagem das células exibindo dupla marcação CD68/HLA-DR e CD68/CD163. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se o número total de células apresentando dupla marcação CD68/HLA-DR e CD68/CD163. Finalmente, com este último dado, foi calculada a média de MATs M1 e M2 por campo, para cada caso.

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após análise das informações clínicas, do estudo histomorfológico e imunoistoquímico, os resultados obtidos foram organizados em uma planilha com o auxílio do programa *Microsoft Excel*, versão 2013 e em seguida exportada para o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), no qual foram realizadas as análises estatísticas pertinentes.

Estatísticas descritivas foram utilizadas para caracterizar a casuística. Os dados obtidos com as quantificações dos MATs M1 (CD68/HLA-DR-positivos) e M2 (CD68/CD163-positivos) foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, onde não foi identificada distribuição normal da amostra.

## 4.9 VARIÁVEIS

**Quadro 6.** Variáveis dependentes e independentes do estudo

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

## **5. ARTIGO**

### **5.1 APRESENTAÇÃO**

A presente pesquisa foi previamente apresentada e aprovada no exame de qualificação desenvolvido pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB.

Como resultado de sua execução, um artigo é apresentado nessa dissertação: Análise imunoistoquímica das subpopulações M1 e M2 de macrófagos associados a tumores (MATs) em carcinomas de células escamosas de língua.

O referido artigo será submetido ao periódico *Experimental and Molecular Pathology*, que possui fator de impacto 2.706 e qualis A2 de acordo com a classificação da CAPES.

## 5.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

### **ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DAS SUBPOPULAÇÕES M1 E M2 DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES (MATS) EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA.**

Arley de Sousa LEITÃO<sup>1</sup>; Pollianna Muniz ALVES<sup>2</sup>; Cassiano Francisco Weege NONAKA<sup>3</sup>; Gustavo Pina GODOY<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, PB, Brasil.

<sup>2-4</sup> Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina grande, PB, Brasil.

#### **Autor correspondente:**

Gustavo Pina Godoy

Universidade Estadual da Paraíba

Departamento de Odontologia

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

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

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

E-mail: [gruiga@hotmail.com](mailto:gruiga@hotmail.com)

Abreviações: CCE, carcinoma de células escamosas; CCEO, carcinoma de células escamosas oral; CCEL, carcinoma de células escamosas de língua; MATs, macrófagos associados a tumores.

## RESUMO

Carcinoma de células escamosas oral (CCEO) representa mais de 90% dos tumores malignos da mucosa oral, apresentando característica infiltrativa, curso clínico agressivo e prognóstico desfavorável. Um fator que pode interferir no prognóstico do CCEO consiste nos componentes do microambiente tumoral. Os macrófagos associados a tumores (MATs) representam uma parcela desta população celular e são divididos de acordo com seu estado de polarização: subtipo M1 que exerce propriedades anti-tumorais e o subtipo M2 que apresenta atividade anti-inflamatória. A relação dos MATs com o CCEO em pacientes jovens ainda não é conhecida. O presente estudo teve por objetivo analisar, por meio de técnica imunoistoquímica, a presença das subpopulações M1 e M2 de MATs em uma série de casos de carcinoma de células escamosas de língua (CCEL). Cortes histológicos obtidos de 44 casos de CCEL divididos em dois grupos (11 casos de pacientes jovens  $\leq 45$  anos e 33 casos de pacientes idosos  $\geq 60$  anos) foram avaliados, sendo assim determinadas as gradações histopatológicas de malignidade. O material foi submetido à técnica de dupla coloração para os anticorpos monoclonais anti-CD68, anti-CD163 e anti-HLA-DR, obtendo a distinção entre os MATs M1 (CD68/HLA-DR) e M2 (CD68/CD163). Os MATs M1 e M2, quando comparados, apresentaram contagens semelhantes no que diz respeito ao tamanho do tumor, presença de metástase linfonodal, presença de metástase à distância e gradação histopatológica de malignidade, no entanto observou-se uma maior contagem de MATs M1 em pacientes diagnosticados com T1 (6,85), e uma maior contagem de M2 em casos T4 (4,55), sugerindo que a maior presença de M1 pode estar relacionada com lesões de tamanho reduzido enquanto que uma maior presença de M2 pode estar relacionada com lesões mais expansivas. Observou-se, também, que em lesões pobremente diferenciadas a contagem de M2 (6,85) foi mais expressiva que a de M1 (4,55), sugerindo que a maior presença de M2 pode estar relacionada com lesões de morfologia mais indiferenciada.

**Palavras-chave:** língua, carcinoma de células escamosas, ativação de macrófagos, imuno-histoquímica.

## ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is more than 90% of malignant tumors of the oral mucosa, with infiltrative feature, aggressive clinical course and poor prognosis. A factor that can interfere in the OSCC prediction consists of the components of the tumor microenvironment. Tumor associated macrophages (TAMs) represent a portion of this cell population and are divided according to their state of polarization: M1 subtype that exerts anti-tumor properties and the M2 subtype that has anti-inflammatory activity. The list of TAMs with OSCC in young patients still unknown. The present study analyzed, through immunohistochemistry, the presence of subpopulations M1 and M2 of TAMs in a number of cases of squamous cell carcinoma of tongue (SCCT). Histological sections obtained from 44 cases of SCCT divided into two groups (11 cases of young patients  $\leq 45$ , and 33 cases of elderly patients  $\geq 60$  years) were evaluated, thus being certain histopathological grades of malignancy. The material was subjected to double staining technique for the anti-CD68 monoclonal antibody, anti-CD163 and anti-HLA-DR, obtaining the distinction between TAMs M1 (CD68 / HLA-DR) and M2 (CD68 / CD163). Cases of SCCT analyzed in this study, compared to age 11 (25.0%) patients were young while 33 (75.0%) were elderly. For histopathological grading of malignancy proposed by WHO, the assessment of TAMs M1 showed medians of 12.3 in well-differentiated tumors; 5.8 in the moderately differentiated tumors and 5.8 in poorly differentiated lesions. For TAMs M2, lesions classified as well differentiated revealed a median of 10.7; moderately differentiated lesions exhibited a median of 2.7 and poorly differentiated tumors showed a median of 6.85. Regarding the histological grade of malignancy proposed by Bryne, the evaluation of TAMs M1 showed medians of 11.3 in tumors classified as low-grade and 5.55 in the highly malignant tumors. For TAMs M2, low-grade malignant lesions revealed a median of 8.7 and high-grade lesions exhibited a median of 4.00. This study suggests that the tumor microenvironment has a direct participation in the progression of the disease.

**Keywords:** Tongue, Squamous Cell Carcinoma, Macrophage Activation, Immunohistochemistry.

## INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) representa mais de 90% dos tumores malignos da mucosa oral, havendo evidências clínicas que os CCE têm um pior prognóstico quando acometem a língua. Geralmente, o CCE em língua (CCEL) mostra invasão mais infiltrativa e, por conseguinte, predispõem à formação de metástases (Freitas et al, 2010).

O CCE oral em pacientes jovens talvez seja uma doença distinta daquela que ocorre em pacientes mais velhos, uma vez que apresentam etiologia e progressão clínica particulares. Em conjunto com o aumento da incidência, poucos são os estudos sobre a taxa de sobrevivência dos pacientes acometidos. Fatores de risco tradicionais talvez não sejam os responsáveis pela incidência dos casos de CCE em pacientes jovens, o que demonstra a necessidade de um melhor entendimento da epidemiologia do câncer oral, em especial na faixa etária anteriormente citada (Venturi et al, 2004; Rahaman; Mujib, 2014).

Os macrófagos, principais representantes de defesa no microambiente tumoral, são fenotipicamente reconhecidos sob duas polarizações: M1 e M2. O fenótipo M1, por ser uma ativação macrofágica clássica, possui propriedades pró-inflamatórias, mantendo níveis constantes e elevados de citocinas como interleucina-12, -23 e IFN- $\gamma$ . Além disso, são capazes de destruir células neoplásicas por meio de espécies reativas de oxigênio. Por sua vez, o subtipo M2, correspondendo a uma ativação macrofágica alternativa, tem condições moleculares que viabilizam o escape de células neoplásicas da vigilância imunológica (Gordon, 2007; Martinez et al., 2009; Ma et al., 2010; Sica, 2010; Baay et al., 2011; Cassetta et al., 2011; Shapiro et al., 2011; Fujii et al., 2012; Merry et al., 2012; Sica et al., 2012; Costa et al., 2013).

Devido à escassez de estudos que permitam um melhor entendimento entre a interação do microambiente tumoral de CCEL em pacientes jovens com a progressão do tumor, a presente pesquisa se propôs a analisar, por meio de técnica imunohistoquímica, a presença das subpopulações M1 e M2 de MATs em uma série de casos de CCEL e verificar um possível envolvimento destes subtipos celulares no prognóstico de pacientes jovens acometidos por esta lesão.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo retrospectivo foi conduzido entre os anos de 2002 a 2015 e foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba, Brasil (protocolo nº25017513.9.0000.5187).

### *Espécimes*

A população do presente estudo foi constituída por todos os casos de CCEL, diagnosticados e registrados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/João Pessoa – PB. Foram selecionados 44 casos de CCEL os quais foram identificados e registrados pelo serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano, João Pessoa-PB, Brasil. A amostra foi então dividida em 11 casos de paciente jovens (idade  $\leq 45$  anos) e 33 casos de pacientes idosos (idade  $\geq 60$  anos). Foram incluídos na amostra apenas os casos de CCEL provenientes de ressecções cirúrgicas, cujos blocos parafinados apresentavam quantidade e qualidade de material biológico suficiente para desenvolver as análises histopatológicas e imunoistoquímicas. Foram excluídos os casos de tumores recidivados e provenientes de pacientes submetidos previamente a tratamento quimioterápico e/ou radioterápico, bem como aqueles casos cujas informações clínicas (sexo, tamanho/extensão do tumor, presença de metástases linfonodais regionais, metástases à distância e estágio clínico) estivessem incompletas. Para o estadiamento clínico foram utilizados os parâmetros elencados na sétima edição da Classificação TNM dos Tumores Malignos (Sobin et al., 2011).

### *Análise histopatológica*

A amostra selecionada foi submetida a cortes de 5 $\mu$ m de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro limpas e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (*Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE*), os espécimes de CCEL foram examinados com aumentos de 100x e 400x. Ao longo do “*front*” de invasão tumoral foi realizada análise da gradação histopatológica de malignidade dos espécimes, de acordo com o sistema proposto por Bryne (1998) (Quadro 3). Para este sistema são atribuídos escores de 1 a 4 para os parâmetros analisados. Em seguida, os escores foram somados a fim de se obter o escore final de malignidade do caso, adotando a metodologia proposta por Silveira et al. (2010). As lesões que apresentaram escores finais entre 4 e 8 foram classificadas como de baixo grau de malignidade. Por sua vez, os tumores com escore final igual ou superior a 9 foram classificados como de alto grau de malignidade.

Para gradação histopatológica de malignidade proposta pela OMS toda a extensão do tumor foi avaliada, baseado no grau de diferenciação de células neoplásicas. Os casos de CCEL foram classificados em bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pobremente diferenciados. Foram denominados bem diferenciados os casos que possuíam

arquitetura tecidual semelhante a um padrão normal de epitélio escamoso. Os moderadamente diferenciados apresentaram certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e menor ceratinização. Por sua vez, os pobremente diferenciados caracterizam-se pela presença de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas e mínima ceratinização (CARDESA et al., 2005).

Ressalta-se que a gradação histopatológica de malignidade foi realizada por dois examinadores, um patologista oral experiente na área e um pesquisador previamente calibrado, sem que os mesmos tivessem conhecimento sobre os dados clínicos da lesão. Os casos que se apresentaram discordantes foram resolvidos por consenso.

#### *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 um examinador previamente treinados.

A análise das subpopulações de MATs foi realizada de forma quantitativa, adaptando-se a metodologia utilizada no estudo Ma et al. (2010). Primeiramente, ao longo das regiões de “*córior*” e “*front*” de invasão tumoral, sob aumento de 100×, foram selecionados 10 campos de maior imunorreatividade (05 para cada região) aos anticorpos anti-CD68/anti-HLA-DR (MATs M1) e anti-CD68/anti-CD163 (MATs M2). Sob aumento de 400×, cada um destes campos foi fotomicrografado (*Leica ICC 50HD*, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador de uso pessoal. Com o auxílio do programa *ImageJ*® (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), em cada um destes campos, foi realizada a contagem das células exibindo dupla marcação CD68/HLA-DR e CD68/CD163. Os valores obtidos em cada um destes campos foram somados, estabelecendo-se o número total de células apresentando dupla marcação CD68/HLA-DR e CD68/CD163. Finalmente, com este último dado, foi calculada a média de MATs M1 e M2 por campo, para cada caso.

Após análise das informações clínicas, do estudo histomorfológico e imunoistoquímico, os resultados obtidos foram organizados em uma planilha com o auxílio do programa *Microsoft Excel*, versão 2013 e em seguida exportada para o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), no qual foram realizadas as análises estatísticas pertinentes.

Estatísticas descritivas foram utilizadas para caracterizar a casuística. Os dados obtidos com as quantificações dos MATs M1 (CD68/HLA-DR-positivos) e M2 (CD68/CD163-positivos) foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, onde não foi identificada distribuição normal da amostra.

## RESULTADOS

### *Análise clínica e morfológica*

Dos casos de CCEL analisados no presente estudo, 27 (61,4%) foram diagnosticados em pacientes do sexo masculino e 17 (38,6%) em pacientes do sexo feminino. No que diz respeito à etnia, 12 (27,3%) dos pacientes eram brancos, 32 (72,7%) eram pacientes não brancos. Com relação ao tamanho/ extensão do tumor foi observada maior frequência de casos com classificação T1 (38,6%) seguido da classificação T2 (36,4%), T3 (15,9%) e T4 (9,1%); com relação à metástase linfonodal regional foram encontrados 30 (68,2%) pacientes com N0, 5 (11,4%) com classificação N1, 5 (11,4%) com N2 e 4 (9,1%) dos pacientes com N3; a metástase à distância foi identificada em apenas 2 (4,5%) casos durante a consulta para a classificação TNM. No tocante ao estadiamento clínico, constatou-se maior frequência dos estádios I (56,8%) e IV (22,7%), seguidos dos estádios III (11,4%) e II (9,1%). A presença de metástase à distância diagnosticada durante tratamento oncológico somou 13 (29,5%) casos (Tabela 1). Em relação à gradação histopatológica de malignidade, a análise no *front* de invasão tumoral revelou 38 casos (86,4%) com alto grau de malignidade e 6 casos (13,6%) com baixo grau de malignidade. No tocante à classificação de malignidade proposta pela OMS a maioria dos casos (65,9%) foram de lesões moderadamente diferenciadas, 18,2% pobremente diferenciadas e 15,9% bem diferenciadas (Fig. 1 A-H)

As tabelas 2 e 3 mostram a distribuição da amostra segundo a faixa etária, levando em consideração as características clínico-patológicas.

### *Análise imunoistoquímica*

A análise dos MATs M1 no *front* de invasão e *córion* tumoral revelou a presença destes tipos celulares em todos os casos de CCEL avaliados, com valor de mediana de 5,3 em pacientes idosos e 16,3 em pacientes jovens. De forma similar, todos os casos de CCEL analisados revelaram MATs M2, com valor de mediana de 4 na contagem em pacientes idosos e 8,2 em pacientes jovens (Fig. 2 A-H)

Em relação ao tamanho dos tumores, para os MATs M1 foram constatadas medianas de 12,3 para as lesões T1; de 11,85 para as lesões T2; de 4,0 para lesões T3 e 3,95 para lesões T4. Por sua vez, para os MATs M2, tumores classificados como T1 revelaram mediana de 4,0; lesões classificadas como T2 tiveram mediana de 3,25; os casos T3 exibiram mediana de 5,1 e T4 de 6,25.

Já na metástase linfonodal regional, a análise dos MATs M1 revelou medianas de 11,3 para os tumores N0, 5,2 para os tumores N1 e 13,2 para N2. Para os MATs M2, lesões classificadas como N0 revelaram mediana de 3,75, lesões classificadas como N1 exibiram mediana de 4,3 e N2 exibiram mediana de 8,2.

Com relação a metástase à distância, os MATs M1 apresentaram mediana de 6,05 para pacientes com metástase e contagem M2 com mediana de 3,9 para pacientes com metástase

Considerando o estadiamento clínico, a análise dos MATs M1 revelou medianas de 12,3 para lesões em estadiamento I; 18,55 para lesões em estadiamento II; de 4,00 para lesões em estadiamento III e 7,55 em estadiamento IV. Para os MATs M2, casos classificados como estadiamento I exibiram mediana de 3,8; casos classificados como estadiamento II com mediana de 13,45; os classificados como III apresentaram mediana de 1,9 e os estadiamentos classificados como IV com mediana de 5,75.

Para a gradação histopatológica de malignidade proposta por OMS, a avaliação dos MATs M1 demonstrou medianas de 12,3 nos tumores bem diferenciados; de 5,8 nos tumores moderadamente diferenciados e 4,55 nas lesões pobremente diferenciadas. Para os MATs M2, lesões classificadas como bem diferenciadas revelaram mediana de 10,7; lesões moderadamente diferenciadas exibiram mediana de 2,7 e tumores pobremente diferenciados apresentaram mediana de 6,85.

Em relação ao grau histopatológico de malignidade proposto por Bryne, a avaliação dos MATs M1 demonstrou medianas de 11,3 nos tumores classificados como de baixo grau e de 5,55 nos tumores de alto grau de malignidade. Para os MATs M2, lesões de baixo grau de malignidade revelaram mediana de 8,7 e lesões de alto grau exibiram mediana de 4,00 (Tabelas 4 e 5).

Os dados obtidos com as quantificações dos MATs M1 e M2 foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, possíveis diferenças entre as medianas para esses tipos celulares em relação à faixa etária dos pacientes foram avaliadas por meio do teste não-paramétrico de Mann-Whitney, que revelou diferença estatisticamente significativa na contagem de células do tipo M1 entre pacientes jovens e idosos ( $p = 0,013$ ), tendo maior contagem nos pacientes idosos. Deve-se levar em

consideração que, em decorrência do tamanho da amostra da presente pesquisa, os resultados do teste estatístico podem não ser representativos.

## **DISCUSSÃO**

Estudos epidemiológicos mostram que o CCEL é mais prevalente em pacientes do sexo masculino com idade superior a 40 anos (Li et al., 2013; Costa et al., 2012). Estas características também foram encontradas na presente pesquisa onde mais da metade da amostra foi composta por indivíduos do sexo masculino, isso pode ser explicado pelo fato de que, historicamente, pacientes do sexo masculino estão mais expostos aos fatores de risco para o desenvolvimento da doença, como o tabaco e o álcool. O estudo de Patel et al (2011) realizado com 32.776 pacientes diagnosticados com CCEL entre os anos de 1975 e 2007, mostrou que existe uma crescente incidência de casos que acometem indivíduos jovens (18 a 44 anos) e do sexo feminino, sugerindo que o CCEL nestes casos específicos pode se tratar de uma lesão com comportamento biológico distinto dos casos de pacientes idosos, já que não parecem estar associadas aos fatores de risco comumente relacionados.

Com relação ao tamanho do tumor, segundo classificação TNM, os resultados da presente pesquisa mostraram uma maior contagem de MATs do subtipo M1 em paciente classificados como T1 (mediana de 6,85), enquanto a maior contagem de M2 foram em pacientes classificados como T4 (mediana de 4,55). Tais resultados sugerem que MATs M2 podem estar associados às lesões maiores e mais invasivas. Observa-se, também, que a mediana da contagem de MATs M2 (6,85) foi maior que a contagem M1 (4,55) em pacientes diagnosticados com lesões pobremente diferenciadas, sugerindo que pacientes com maior contagem de M2 podem apresentar piores prognósticos.

Em estudo realizado por Costa et al. (2013) com 45 pacientes que apresentavam CCE oral, destes 40 % localizados em língua, os autores encontraram que a maioria dos pacientes eram do sexo masculino (71,1%) e brancos (60%), concordando com a presente pesquisa quanto ao sexo (54,5% da amostra composta com homens) e discordando quanto à etnia (apenas 27,3% dos pacientes eram brancos). Ainda no estudo de Costa et al. (2013) 24,4% dos casos apresentavam estadiamento clínico I e II, além de 55,5% dos pacientes apresentarem metástase à distância, resultados que divergem do presente estudo, onde os casos com estadiamento I e II somaram mais da metade dos casos (65,9%) e apenas 29,5% dos pacientes foram diagnosticados com metástase à distância. Já o estudo de Wang et al. (2014) avaliou 240 pacientes com mediana de 53 anos de idade, onde a maioria da amostra era composta por casos de CCEL (34,6%). Os autores encontraram que metade dos casos foram classificados

como estágio I-II e 64,2% dos casos foram diagnosticados com metástase linfonodal, neste mesmo estudo apenas 36,2% dos casos foram classificados como moderadamente diferenciados na avaliação morfológica baseada na OMS. Resultado inferior ao encontrado no presente estudo, onde lesões moderadamente diferenciadas consistiram na maior parte dos casos (65,9%). Estas divergências nos resultados das variáveis clínico-patológicas podem ser explicadas pela diferença no tamanho da amostra entre as pesquisas.

Muitos são os estudos imunoistoquímicos para identificação de macrófagos no microambiente tumoral, para tanto são utilizados diferentes marcadores. A presente pesquisa utilizou a técnica de Ma et al (2010) modificada, onde foi utilizada a dupla-coloração com marcadores para macrófagos CD68/HLA-DR (M1) e CD68/CD163 (M2) por identificar de forma mais específica os diferentes subtipos de MATs (Inge et al., 2011; Wada et al., 2012; Tang et al., 2013; Helm et al., 2014; Le Xu et al., 2014; Lizzote et al., 2014).

Outros estudos se propõem a estudar o comportamento genético e molecular dos MATs para melhor compreender sua participação na proliferação, disseminação e poder metastático dos tumores, características que interferem diretamente no prognóstico dos pacientes (Sica et al., 2012; Schmieder et al., 2012; Lee et al., 2013; Pirila et al., 2015); assim como estudos *in vitro*, sob forma de cultura de células, têm sido desenvolvidos para identificar possíveis inibidores de polarização de MATs (Chiu et al., 2014; Ning et al., 2015).

Os MATs presentes no microambiente tumoral são estudados em diversas neoplasias, como no câncer de pulmão, adenocarcinoma pancreático, melanoma, câncer de mama, linfomas, carcinoma de células renais e carcinoma de ovário. Os autores observaram que a marcante presença de MATs do subtipo M2 está associada à piores prognósticos, menor tempo de sobrevida, carcinogênese precoce e atividade pró-angiogênica, contribuindo para uma maior agressividade do tumor (Ohri et al., 2009; Inge et al., 2011; Wada et al., 2012; Tang et al., 2013; Helm et al 2014;; Le Xu et al., 2014; Lizzote et al., 2014). Wei Wang et al. (2015) realizaram um estudo *in vivo*, com pesquisa em animais, utilizando técnicas como a imunoistoquímica e citometria de fluxo, e constataram que os casos com maior contagem de MATs do subtipo M2 progrediam mais facilmente de colites ulcerativas para carcinomas colorretais. Os autores concluíram que a presença de MATs M2 aumentou a expressão de fatores como CXCR4, VEGF e TGF- $\beta$ , conhecidos por promover a angiogênese e metástase tumoral, contribuindo para um pior prognóstico.

Atualmente tem-se estudado a presença dos MATs em lesões orais, como no estudo de Chiu et al. (2014) que através da cultura de células, imunoistoquímica e método de amplificação de DNA identificaram a existência de uma inter-relação entre MATs (marcador

anti-CD68) e células do carcinoma mucoepidermóide, onde os macrófagos atuaram inibindo ou promovendo a progressão do tumor.

O estudo de Fujii et al. (2012) utilizou marcadores para CD68 e CD163 na identificação de MATs em microambiente tumoral de CCEO, contando com a participação de 108 pacientes, nesta pesquisa os autores concluíram que o marcador CD163 é um possível fator prognóstico para CCEO. Conclusão semelhante à encontrada por Mori et al. (2011) que avaliaram 50 pacientes com CCEO (58% dos casos com CCEL). Os autores mostraram um aumento na contagem de MATs do subtipo M2 à medida que aumentava o grau histopatológico de malignidade das lesões. Deve-se levar em consideração que grande parte dos autores utilizam marcadores anti-CD68 sob técnica de marcação simples para identificar MATs do subtipo M1, pelo fato desta coloração não ser específica (marcando também células mielóides, células dendríticas e alguns fibroblastos) seus resultados podem não retratar a realidade.

Em decorrência da limitação no tamanho da amostra no presente estudo, sugere-se o desenvolvimento de novas pesquisas que possam determinar a participação de MATs na progressão de CCEL e sua possível interferência no prognóstico da doença em pacientes jovens e idosos.

### **CONFLITOS DE INTERESSE**

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem ao Hospital Napoleão Laureano e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB pela colaboração na coleta dos dados e espécimes utilizados no estudo, além do fomento oferecido pela CAPES através do Programa de Demanda Social.

## REFERÊNCIAS

- Baay, M.; Brouwer, A.; Pauwels, P. et al., 2011. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. *Clin. Dev. Immunol.* 565187, 1-12.
- Bryne, M. 1998. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Dis.* 4, 70-77.
- Cardesa, A. et al. 2005. Squamous cell carcinoma. In: BARNES, L. et al. *World Health Organization classification of tumor: pathology and genetics of head and neck tumors.* Lyon: IARC Press, 118-121.
- Cassetta, L., et al., 2011. Macrophage polarization in health and disease. *Sci. World. J.* 11, 2391-2402.
- Chiu, K., et al., 2014. Protumoral effect of macrophage through Axl activation on mucoepidermoid carcinoma. *J. Oral. Pathol. Med.* 43, 538–544.
- Coons, A.H.; Creech, H.J.; Jones, R.N., 1941. Immunological properties of an antibody containing a fluorescence group. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 47, 200-202.
- Costa, N. L. et al., 2013. Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 49,216-23.
- Costa, F.W.G. et al.,2012. Tongue Lesions. *J. Craniofac. Surg.* 23, 548-550.
- Freitas, R. A. et al., 2010. Correlation of  $\beta$ -catenin expression and metastasis in tongue squamous cell carcinoma. *Acta. Cir. Bras.* 25, 513.
- Fujii, N. et al., 2012. Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. *J Oral Pathol. Med.* 41, 444-51.
- Gordon, S., 2007. The macrophage: past, present and future. *Eur. J. Immunol.* 37, 9–17.
- Helm, O. et al., 2014. Tumor-associated macrophages exhibit pro-and anti-inflammatory properties by which they impact on pancreatic tumorigenesis. *Int. J. Cancer.* 135, 843–861.
- Inge, H.G.B. et al.,2011. Detection of M2-Macrophages in Uveal Melanoma and Relation with Survival. *IOVS.* 52, 643-650.
- Le Xu, at al.,2014. Prognostic Value of Diametrically Polarized Tumor-Associated Macrophages in Renal Cell Carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 21,3142–3150.
- Lee, H, et al.,2013. Recruitment of monocytes/macrophages in different tumor microenvironments. *BBA.*1835, 170-179.

- Li, R. et al., 2013. Distinct Epidemiologic Characteristics of Oral Tongue Cancer Patients. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 48, 792–796.
- Lizzote P.H. et al., 2014. Attenuated *Listeria monocytogenes* reprograms M2-polarized tumor-associated macrophages in ovarian cancer leading to iNOS-mediated tumor cell lysis. *OncoImmunology.* 3, 28926.
- Ma, J. et al., 2010. The M1 form of tumor-associated macrophages in non-small cell lung cancer is positively associated with survival time. *BMC Cancer.* 10, 112.
- Mantovani, A.; Sica, Allavena, P., 2010. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. *Curr. Opin. Immunol.* 22, 231-7.
- Marrack J., 1934. Nature of antibodies. *Nature.* 133, 292-293.
- Martinez, F. O.; Helming, L.; Gordon, S., 2009. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 451-83.
- Mason, D.Y.; Sammons, R., 1978. Rapid preparation of peroxidase: anti-peroxidase complexes for immunocytochemical use. *J. Immunol. Methods.* 20, 317-324.
- Matos, L.L. et al., 2010. Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. *Biomark Insights.* 5, 9-20.
- Merry, R. et al., 2012. Oral health and pathology: a macrophage account. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.* 50, 2-7.
- Mori, K. et al., 2011. Infiltration of M2 Tumor-Associated Macrophages in Oral Squamous Cell Carcinoma Correlates with Tumor Malignancy. *Cancers.* 3, 3726-3739.
- Ohri, C.M. et al., 2009. Macrophages within NSCLC tumour islets are predominantly of a cytotoxic M1 phenotype associated with extended survival. *Eur. Respir. J.* 33, 118–126.
- Patel, S.C. et al., 2011. Increasing Incidence of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma in Young White Women, Age 18 to 44 Years. *J. Clin. Oncol.* 29, 148-1494.
- Pirila, E. et al., 2015. Macrophages Modulate Migration and Invasion of Human Tongue Squamous Cell Carcinoma. *PLoS one.* 10, 1-34.
- Schmieder, A. et al., 2012. Differentiation and gene expression profile of tumor-associated macrophages. *Sem. Cancer. Biol.* 22, 289-297.
- Li, N. et al., 2015. PTEN inhibits macrophage polarization from M1 to M2 through CCL2 and VEGF-A reduction and NHERF-1 synergism. *Cancer Biol Ther.* 16, 297-306.
- Tang, X., 2013. Tumor-associated macrophages as potential diagnostic and prognostic biomarkers in breast cancer. *Cancer Lett.* 332, 3-10.
- Vaupel, P.; Mayer, A., 2007. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. *Cancer Metast. Rev.* 26, 225-39.

- Venturi R. M. et al., 2004. Carcinoma de células escamosas da cavidade oral em pacientes jovens e sua crescente incidência: revisão de literatura. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* 70, 679-86.
- Rahaman, S.U.; Mujib B.A., 2014. Histopathological correlation of oral squamous cell carcinoma among younger and older patients. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 18, 183.
- Shapiro, H.; Lutaty, A.; Ariel, A., 2011. Macrophages, meta-inflammation, and immunometabolism. *Sci. World. J.* 11, 2509-29.
- Sica, A. 2010. Role of tumour-associated macrophages in cancer-related inflammation. *Exp Oncol.* 32, 153-8.
- Sica, A.; Mantovani, A., 2012. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J. Clin. Invest.* 122, 787-795.
- Sternberger, L.A., 1967. Electron microscopic immunocytochemistry: a review. *J Histochem Cytochem.* 15, 139-159.
- Wada, N. et al., 2012. Tumour-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. *Histopathology.* 60, 313–319.
- Wang, S. et al., 2014. Expression of CD163, interleukin-10, and interferon-gamma in oral squamous cell carcinoma: mutual relationships and prognostic implications. *Eur J Oral Sci.* 122, 202-209.
- Wang, W. et al., 2015. Dynamic changes and functions of macrophages and M1/M2 subpopulations during ulcerative colitis-associated carcinogenesis in an AOM/DSS mouse model. *Mol Med Rep.* 11, 2397-2406.

**Tabela 1.** Distribuição absoluta e relativa dos casos de CCEL de acordo com os parâmetros clínico-patológicos

<b>Parâmetros clínico-patológicos</b>	<b>n (%)</b>
<b>Sexo</b>	
Masculino	27 (61,4)
Feminino	17 (38,6)
<b>Tumor</b>	
T1	17 (38,6)
T2	16 (36,4)
T3	7 (15,9)
T4	4 (9,1)
<b>Nodo</b>	
N0	30 (68,2)
N1	5 (11,4)
N2	5 (11,4)
N3	4 (9,1)
<b>Metástase</b>	
M0	42 (95,5)
M1	2 (4,5)
<b>Estádio clínico</b>	
Estádio I	25 (56,8)
Estádio II	4 (9,1)
Estádio III	5 (11,4)
Estádio IV	10 (22,7)
<b>Grau histopatológico de malignidade – Bryne</b>	
Baixo grau	6 (13,6)
Alto grau	38 (86,4)
<b>Grau histopatológico de malignidade – OMS</b>	
Bem diferenciado	7 (15,9)
Moderadamente diferenciado	29 (65,9)
Pobremente diferenciado	8 (18,2)

**Tabela 2.** Distribuição absoluta dos casos de CCEL de acordo com a faixa etária e parâmetros clínico-patológicos (TNM)

Parâmetros clínico-patológicos	Faixa etária		
	Jovem	Idoso	Total
<b>T1</b>	6	11	17
<b>T2</b>	2	14	16
<b>T3</b>	1	6	7
<b>T4</b>	2	2	4
<b>Total</b>	11	33	44
<b>N0</b>	7	23	30
<b>N1</b>	1	4	5
<b>N2</b>	1	4	5
<b>N3</b>	2	2	4
<b>Total</b>	11	33	44
<b>M0</b>	10	32	42
<b>M1</b>	1	1	2
<b>Total</b>	11	33	44

**Tabela 3.** Distribuição absoluta dos casos de CCEL de acordo com a faixa etária e parâmetros clínico-patológicos (estadiamento clínico e gradações histopatológicas de malignidade)

Parâmetros clínico-patológicos		Faixa_etária		
		Jovens	Idosos	Total
<b>Estadiamento</b>	<b>I</b>	7	18	25
	<b>II</b>	0	4	4
	<b>III</b>	1	4	5
	<b>IV</b>	3	7	10
<b>Total</b>		11	33	44
<b>Metástase</b>	<b>Sim</b>	4	9	13
	<b>Não</b>	7	24	31
<b>Total</b>		11	33	44
<b>OMS</b>	<b>Bem diferenciado</b>	2	5	7
	<b>Moderadamente diferenciado</b>	7	22	29
	<b>Pobremente diferenciado</b>	2	6	8
<b>Total</b>		11	33	44
<b>Bryne</b>	<b>Baixo grau</b>	2	4	6
	<b>Alto grau</b>	9	29	38
<b>Total</b>		11	33	44

**Tabela 4.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75 para a quantidade de MATs M1 em relação aos parâmetros clínico-patológicos.

<b>Parâmetros clínico-patológicos</b>		<b>n</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub></b>
<b>T1</b>		17	12,3	2,35-34,10
<b>T2</b>		16	11,85	3,45-28,30
<b>T3</b>		7	4,00	1,60-5,80
<b>T4</b>		4	3,95	1,17-34,40
<b>N0</b>		30	11,3	2,70-29,82
<b>N1</b>		5	5,2	2,50-5,55
<b>N2</b>		5	13,2	5,25-34,55
<b>N3</b>		4	3,55	2,75-23,02
<b>M0</b>		42	6,05	3,12-28,27
<b>M1</b>		2	13,80	2,60-25,00
<b>Estadiamento</b>	<b>I</b>	25	12,30	3,20-28,40
	<b>II</b>	4	18,55	1,20-35,45
	<b>III</b>	5	4,00	1,35-5,50
	<b>IV</b>	10	7,55	3,05-26,10
<b>OMS</b>	<b>Bem diferenciado</b>	7	12,30	5,5-15,10
	<b>Moderadamente diferenciado</b>	29	5,80	2,65-29,10
	<b>Pobrememente diferenciado</b>	8	4,55	2,75-14,85
<b>Bryne</b>	<b>Baixo grau</b>	6	11,30	4,17-24,30
	<b>Alto grau</b>	38	5,55	2,85-28,27

**Tabela 5.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75 para a quantidade de MATs M2 em relação aos parâmetros clínico-patológicos.

<b>Parâmetros clínico-patológicos</b>		<b>n</b>	<b>Mediana</b>	<b>Q<sub>25</sub>-Q<sub>75</sub></b>
<b>T1</b>		17	4,00	1,60-16,20
<b>T2</b>		16	3,25	1,2-7,72
<b>T3</b>		7	5,10	0,80-8,80
<b>T4</b>		4	6,25	2,27-59,12
<b>N0</b>		30	3,75	1,40-15,85
<b>N1</b>		5	4,3	1,35-6,95
<b>N2</b>		5	8,2	3,80-46,95
<b>N3</b>		4	2,9	0,15-7,52
<b>M0</b>		42	3,90	1,4-13,92
<b>M1</b>		2	8,2	-
<b>Estadiamento</b>	<b>I</b>	25	3,80	1,60-14,45
	<b>II</b>	4	13,45	1,57-44,9
	<b>III</b>	5	1,90	0,65-6,95
	<b>IV</b>	10	5,75	1,27-10,60
<b>OMS</b>	<b>Bem diferenciado</b>	7	10,70	4,00-23,20
	<b>Moderadamente diferenciado</b>	29	2,70	1,40-10,45
	<b>Pobrememente diferenciado</b>	8	6,85	0,6-15,55
<b>Bryne</b>	<b>Baixo grau</b>	6	8,70	3,15-31,00
	<b>Alto grau</b>	38	4,00	1,40-11,20

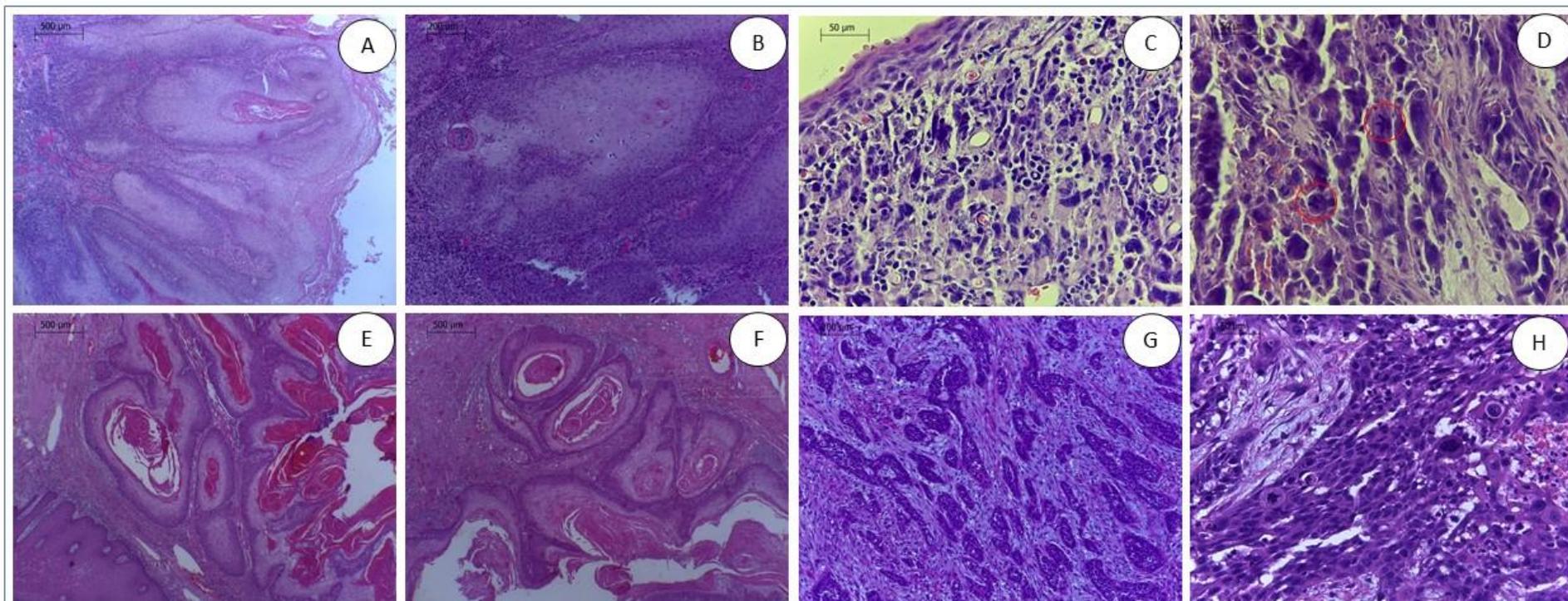


Fig.1 – A) CCE de língua de baixo grau de malignidade exibindo padrão de invasão em formato de cordões, pérolas de ceratina e intenso infiltrado inflamatório crônico (HE, 40X). B) CCE de língua de baixo grau de malignidade, em maior aumento, evidenciando longos cordões infiltrativos de células bem diferenciadas, com pérolas de ceratina, e em perneio numerosas células inflamatórias mononucleares (HE, 100X). C) CCE de língua de alto grau de malignidade exibindo padrão de invasão com células dissociadas, hiperchromatismo intenso, pleomorfismo nuclear e escasso infiltrado inflamatório (HE, 400X). D) CCE de língua de alto grau de malignidade, em maior aumento, evidenciando figuras de mitose atípicas (círculos vermelhos), pleomorfismo e hiperchromatismo nuclear (HE, 400X). E) e F) CCE de língua bem diferenciado exibindo células escamosas bem diferenciadas com numerosas pérolas de ceratina (HE, 40X). G) CCE de língua pobremente diferenciado exibindo células escamosas invadindo o estroma em pequenos ninhos neoplásicos (HE, 100X). H) CCE de língua pobremente diferenciado, em maior aumento, evidenciando, numerosas células com intenso pleomorfismo e hiperchromatismo nuclear, bem como núcleos volumosos (HE, 400X).

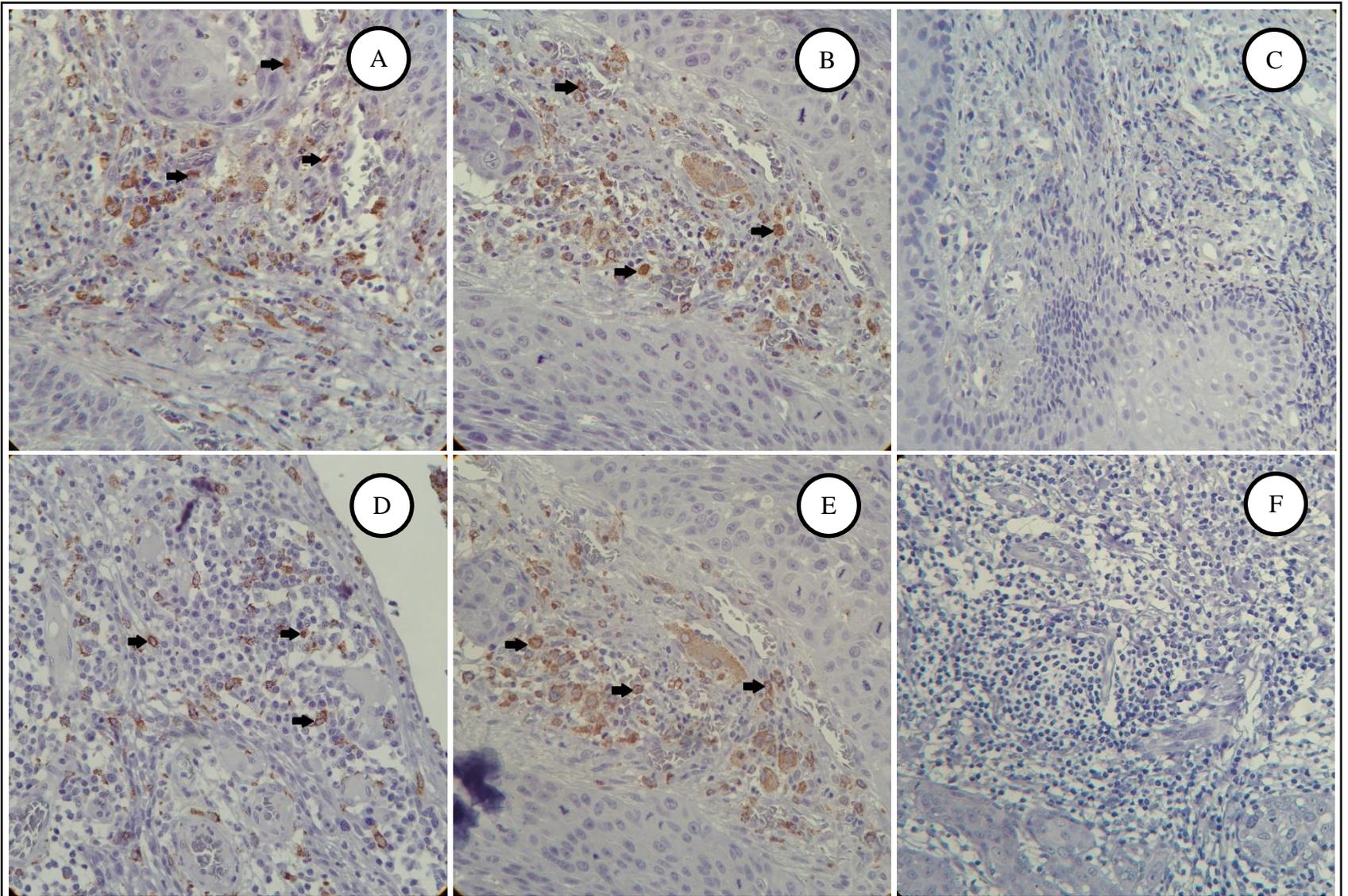


Fig. 2 – A e B) Imunomarcção dupla do CD68/HLA-DR para macrófagos do tipo M1 (setas) (ADVANCE, 400x). C) Ausência de imunomarcção do CD68/HLA-DR para macrófagos do tipo M1 (ADVANCE, 400x). D e E) Imunomarcção dupla do CD68/CD163 para macrófagos do tipo M2 (setas) (ADVANCE, 400x). F) Ausência de imunomarcção do CD68/CD163 para macrófagos do tipo M2 (ADVANCE, 400x).

## **5. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os MATs M1 e M2, quando comparados, apresentaram contagens semelhantes no que diz respeito ao tamanho do tumor, presença de metástase linfonodal, presença de metástase à distância e gradação histopatológica de malignidade (tanto na classificação proposta pela OMS, quanto na proposta por Bryne), mostrando a necessidade do aumento no número de casos para um resultado mais representativo.

Pacientes idosos apresentaram maior mediana durante a contagem de MATs M1 quando comparados aos pacientes jovens. A presente pesquisa será continuada, de forma que se aumente o número da amostra, a fim de subsidiar a análise estatística dos dados, respaldando de forma mais precisa os resultados encontrados.

Com o aumento no número de casos diagnosticados de CCEL em pacientes jovens ao longo dos anos, a presente pesquisa desbrava este tema ressaltando a importância deste campo na odontologia, encorajando novos estudos que possam entender melhor o comportamento clínico e biológico destas lesões, visando o aprimoramento do diagnóstico e individualizando o tratamento dos pacientes portadores desta doença.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. 5ª ed. Rio de Janeiro:
- AJURA, A.J.; SUMAIRI, I.; LAU, S.H. The use of immunohistochemistry in an oral pathology laboratory. **Malaysian J Pathol**, v.2, n.29, p. 101-105, 2007
- ÁLVARO, T.; LEJEUNE, M.; CAMACHO, F. I. et al. The presence of STAT1-positive tumor-associated macrophages and their relation to outcome in patients with follicular lymphoma. **Haematologica**, v.91, n.12, p. 1605-1612, 2006.
- BAAY, M.; BROUWER, A.; PAUWELS, P. et al. Tumor cells and tumor-associated macrophages: secreted proteins as potential targets for therapy. **Clin Dev Immunol**, v. 2011, n.565187, p. 1-12, 2011.
- BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow. **The Lancet**, v.357, p.539-545, 2001.
- BARRETO, R.C; PEREIRA, G.A.S; COSTA, L.J. et al. Duplo papel da inflamação no surgimento das lesões cancerígenas. **RBCS**, v.14, n.4, p.107-114, 2011.
- BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Dis**, v. 4, n. 2, p. 70-77, 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM. **Classificação de Tumores Malignos**. Traduzido por Ana Lúcia Amaral Eisenberg. 6ª ed. Rio de Janeiro; 2004.
- BRASILEIRO-FILHO, G.B. **Patologia**. 8ª ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 2011. 1524 p
- CARDESA, A. et al. Squamous cell carcinoma. In: BARNES, L. et al. **World Health Organization classification of tumor: pathology and genetics of head and neck tumors**. Lyon: IARC Press, p. 118-121, 2005.
- CASSETTA, L.; CASSOL, E.; POLI, G. Macrophage polarization in health and disease. **ScientificWorldJournal**, v. 11, p. 2391-2402, 2011.

CHIU, K., et al. Protumoral effect of macrophage through Axl activation on mucoepidermoid carcinoma. **J. Oral. Pathol. Med.** v.43, p. 538–544, 2014.

COFFELT, S.B.; HUGHES, R.; LEWIS, C.E. Tumor-associated macrophages: effectors of angiogenesis and tumor progression. **Biochim Biophys Acta**, v. 1796, p.11–18, 2009.

COONS, A.H.; CREECH, H.J.; JONES, R.N. Immunological properties of an antibody containing a fluorescence group. **Proc Soc Exp Biol Med.** v. 47, p. 200-202, 1941

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

DAHER, G.C.A.; PEREIRA, G.A.; OLIVEIRA, A.C.A. Características epidemiológicas de casos de câncer de boca registrados em hospital de Uberaba no período 1999-2003: um alerta para a necessidade de diagnóstico precoce. **Rev Bras Epidemiol**, v. 11, n. 4, p. 584-96, 2008.

DURAIYAN, J. et al. Applications of immunohistochemistry. **J Pharm Bioallied Sciv**, v.4, n.2, p.307-09, 2012.

DVORAK, H.F. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. **New Engl J Med**, v.315, n.26, p.1650-9, 1986.

FELLER, L.; LEMMER, J. Oral Squamous Cell Carcinoma: Epidemiology, Clinical Presentation and Treatment. **J Cancer Ther**, v. 3, n. 4, p. 263-268, 2012.

FREITAS, R. A. et al. Correlation of  $\beta$ -catenin expression and metastasis in tongue squamous cell carcinoma. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 25, n. 6, p. 513, 2010.

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

GARAVELLO, W.; SPREAFICO R.; GAINI R. M. Oral tongue cancer in young patients: A matched analysis. **Oral Oncology**, v. 43, p. 894–897, 2007.

GORDON, S. The macrophage: past, present and future. **Eur J Immunol**, v. 37, n. 1, p. S9–S17, 2007.

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

HILLY, O. et al. Carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: Comparison with patients older than 60 years. **Oral Oncology**, v. 49, p. 987–990, 2013.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro : INCA, 2011.

JENSEN, T.O. et al. Macrophage markers in serum and tumor have prognostic impact in American Joint Committee on Cancer stage I/II melanoma. **J Clin Oncol**, v.27, n. 20, p.3330–37, 2009.

KAWAHARA, A. et al. Infiltration of thymidine phosphorylase-positive macrophages is closely associated with tumor angiogenesis and survival in intestinal type gastric cancer. **Oncol Rep**, v. 24, n. 2, p. 405-15, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p.1616

KURAHARA, H. et al. Significance of M2-polarized tumor-associated macrophage in pancreatic cancer. **J Surg Res**, v. 167, n. 2, p. e211-9, 2011.

LI, Y. W.; QIU, S. J.; FAN, J.; et al. Tumor-infiltrating macrophages can predict favorable prognosis in hepatocellular carcinoma after resection. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.135, n.3, p.439–49, 2009.

LISSBRANT, I.F. et al. Tumor associated macrophages in human prostate cancer: relation to clinicopathological variables and survival. **Int J Oncol**, v. 17, n.3, p.445–51, 2000.

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

MANTOVANI, A.; SICA, A.; ALLAVENA, P. Inflammation and cancer: from bench to bedside? **J Support Oncol**, v. 5, p. 164–65, 2007.

MANTOVANI, A.; SICA, ALLAVENA, P. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Curr Opin Immunol**, v. 22, n. 2, p. 231-7, 2010.

MARRACK J. Nature of antibodies. **Nature**. v. 133 p. 292-293

MARTINEZ, F. O.; HELMING, L.; GORDON, S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. **Annu Rev Immunol**, v. 27, p. 451-83, 2009.

MASON, D.Y.; SAMMONS, R. Rapid preparation of peroxidase: anti-peroxidase complexes for immunocytochemical use. **J Immunol Methods**, v. 20, p. 317-324, 1978.

MATOS, L.L. et al. Immunohistochemistry as an Important Tool in Biomarkers Detection and Clinical Practice. **Biomarkers Insight**, v. 5, p. 9-20, 2010.

MERRY, R. et al. Oral health and pathology: a macrophage account. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 50, n. 1, p. 2-7, 2012.

MUKHTAR, R.A.; NSEYO, O.; CAMPBELL, M.J. et al. Tumor-associated macrophages in breast cancer as potential biomarkers for new treatments and diagnostics. **Expert Rev Mol Diagn**, v.11, n.1, p. 91–100, 2011.

NEVILLE, B.W. et al. **Patologia Oral & Maxilofacial**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. 972p

ORTHOLAN, C. et al. Oral cavity squamous cell carcinoma in 260 patients aged 80 years or more. **Radiother Oncol**, v. 93, n. 3, p. 516-23, 2009.

POPOVTZER, A. et al. Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue in Young Patients. **Laryngoscope**, v. 114, p. 915-917, 2004.

RAHAMAN, S.U.; MUJIB B.A. Histopathological correlation of oral squamous cell carcinoma among younger and older patients. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 18, n. 2, p. 183, 2014

REGEZI, J.A.; SCIUBBA, J.J.; JORDAN, R.C.K. **Patologia Oral**, 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. 417p.

RIBEIRO, A.C.P. et al. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people – a descriptive study in Brazilians. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 47, n. 2, p. 95-8, 2009.

RYDER, M. et al. Increased density of tumor-associated macrophages is associated with decreased survival in advanced thyroid cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 15, n. 4, p. 1069-74, 2008.

SHAPIRO, H.; LUTATY, A.; ARIEL, A. Macrophages, meta-inflammation, and immuno-metabolism. **ScientificWorldJournal**, v. 11, p. 2509-29, 2011.

SHENOI, R. et al. Demographic and clinical profile of oral squamous cell carcinoma patients: A retrospective study. **Indian J Cancer**, v 49, p. 21-26, 2012.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract Res Clin Anesthesiol**, v. 18, n.3, p.385-405, 2004.

SOBIN, L.H.; WITTEKIND, C. TNM classification of malignant tumors. 6ª ed. **New York: John Wiley & Sons**; 2002. 239p.

SICA, A.; ALLAVENA, P. Inflammation and cancer: from bench to bedside? **J Support Oncol**, v. 5, n. 4, p. 164-5, 2007.

SICA, A. Role of tumour-associated macrophages in cancer-related inflammation. **Exp Oncol**, v. 32, n. 3, p. 153-8, 2010.

SICA, A.; MANTOVANI, A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. **J. Clin. Invest**, v. 122, n. 3, p. 787-795, 2012.

STERNBERGER, L.A. Electron microscopic immunocytochemistry: a review. **J Histochem Cytochem**. v. 15, n. 15, p. 139-159, 1967

VAUPEL, P.; MAYER, A. Hypoxia in cancer: significance and impact on clinical outcome. **Cancer Metastasis Rev**, v. 26, n. 2, p. 225-39, 2007.

VENTURI R. M. et al. Carcinoma de células escamosas da cavidade oral em pacientes jovens e sua crescente incidência: revisão de literatura. **Rev Bras Otorrinolaringol**. v.70, n.5, p. 679-86, 2004.

WADA, N. et al. Tumour-associated macrophages in diffuse large B-cell lymphoma: a study of the Osaka Lymphoma Study Group. **Histopathology**. v. 60, p. 313-9, 2012.

ZHANG, Q. W. et al. Prognostic significance of tumor-associated macrophages in solid tumor: a meta-analysis of the literature. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e50946, 2012.

ZINI, A.; CZERNINSKI, R.; SGAN-COHEN, H, D. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. **J Oral Pathol Med**, v. 39, p. 299-305, 2010

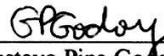
## APÊNDICE A

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

**Termo de Compromisso do Pesquisador**

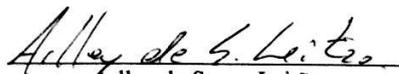
Nós, Gustavo Pina Godoy e Arley de Sousa Leitão, responsáveis pelo desenvolvimento do projeto intitulado **ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS SUBPOPULAÇÕES M1 E M2 DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES (MAT) EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA** que possui como objetivo avaliar através da técnica de imuno-histoquímica a presença das subpopulações M1 e M2 de macrófagos associados a tumores (MATs) em carcinoma de células escamosas de língua (CCEL) e verificar um possível envolvimento destes tipos celulares no desenvolvimento destas lesões em pacientes jovens. A análise utilizará peças cirúrgicas coletadas através de biópsia excisional, cujas preparações serão coradas com dois anticorpos monoclonais imunorreativos aos MATs (CD68 e CD163). Também serão coletados os dados clínicos dos pacientes, quais sejam: sexo, idade, ocupação/profissão e estadiamento clínico (TNM), bem como a gradação histológica de malignidade.

Declaramos conhecer o inteiro teor da resolução CNS 466/2012, comprometendo-nos, desde já, a cumpri-la integralmente nas atividades que desenvolveremos, bem como estar continuamente atualizados, inclusive quanto à legislação complementar relativa à matéria, sendo de nossa inteira responsabilidade qualquer penalidade imposta pelo descumprimento da mesma.



Gustavo Pina Godoy

Professor do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB  
Orientador/responsável pelo Projeto



Arley de Sousa Leitão

Aluno do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB  
Participante do Projeto

## APÊNDICE B



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

Campina Grande, 16 de dezembro de 2013.

## ENCAMINHAMENTO

Encaminho o aluno **ARLEY DE SOUSA LEITÃO**, matriculado sob o número 2013.0812.03, no Programa de Pós-Graduação em Odontologia *Strictu-senso* (Mestrado), no semestre letivo 2013.2, orientado pelo Professor Doutor **Gustavo Pina Godoy**, para realizar a coleta de dados da pesquisa "**Análise Imunolistoquímica das Subpopulações e Tumores (MATs) em Carcinoma de Células Escamosas de Língua**", no Hospital Napoleão Laureano. Informamos ainda que o referido projeto teve aprovação no Comitê de Ética e Pesquisa da UEPB, sob C.A.A.E. 25017513.9.0000.5187.

Desde já agradecemos a compreensão do vosso diretor para a realização desta pesquisa neste Hospital.

Prof.ª Dra. Patrícia Meira Bento  
Coordenadora do Mestrado em Odontologia  
MATRÍCULA – 122532-4



*Centro de Estudos Mário Kröeff*

APÊNDICE C

**PARECER DO DA COMISSÃO DE ÉTICA MÉDICA DO HNL**

Avaliamos o Projeto de Pesquisa “ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DAS SUBLOCAÇÕES M 1 E M2 DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES (MATs) EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA”, e, em nossa avaliação, o Hospital Napoleão Laureano poderá participar como instituição colaboradora do referido projeto; ressaltamos ainda que o projeto em questão não utilizará seres humanos e terá como orientador a Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy - UEPB.

Solicito parecer da direção geral do Hospital Napoleão Laureano quanto adequação do referido projeto às necessidades de rotina dessa instituição.

João Pessoa, 06 de janeiro de 2014.

Dr. Igor Lemos Duarte  
Pres. do CEMAK

Pres. da Comissão de Ética Médica do HNL

Hospital Napoleão Laureano  
Dr. Pêrides Vitorino  
Diretor Geral  
2014.

**APÊNDICE D**

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

**DADOS DO PACIENTE:**

## CONTROLE DE IDENTIFICAÇÃO

NºFICHA: \_\_\_\_\_ NºPRONTUARIO: \_\_\_\_\_ NºPEÇA: \_\_\_\_\_

## CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

1. Sexo: ( ) Masculino 1( ) Feminino
2. Idade: \_\_\_\_\_ anos
3. Raça: ( ) Branco 1( ) Amarelo 2( ) Pardo 3( ) Indígena 4( ) Preto/Negra  
(IBGE, 2010)
4. Ocupação/Profissão: \_\_\_\_\_
5. Hábitos: Tabagismo ( ) Alcoolismo ( ) Tabagismo e alcoolismo ( ) Não relatado

**DADOS DA LESÃO**

1. Localização:
2. TNM:
3. Estadiamento da lesão:
  - 0( ) Estágio 0
  - 1( ) Estágio I
  - 2( ) Estágio II
  - 3( ) Estágio III
  - 4( ) Estágio IV ( ) Estágio IVA ( ) Estágio IVB ( ) Estágio IVC (Sobin; Wittekind, 2002)
4. Metástase: ( ) Sim ( ) Não
5. Desfecho: ( ) Cura ( ) Recidiva ( ) Óbito ( ) Não relatado
6. Diagnóstico:
7. Biópsia: ( ) Incisional ( ) Excisional

## ASPECTO MORFOLÓGICO E GRADUAÇÃO DE MALIGNIDADE

LÂMINA HE: \_\_\_\_\_

### 1. Grau de ceratinização

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

### 2. Pleomorfismo nuclear

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

### 3. Padrão de invasão:

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

### 4. Infiltrado inflamatório

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

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

(BRYNE, 1998; SILVEIRA *et al.*, 2010)

## APÊNDICE E

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

CARTA DE ANUÊNCIA

Ao Hospital Napoleão Laureano.

Prezado Sr. Antônio Carneiro Arnaud.

Nós, Gustavo Pina Godoy e Arley de Sousa Leitão, viemos solicitar seu registro de autorização quanto à submissão ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba, do projeto **ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS SUBPOPULAÇÕES M1 E M2 DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES (MAT) EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA**, que possui como objetivo avaliar, através da técnica de imuno-histoquímica, a presença das subpopulações M1 e M2 de macrófagos associados a tumores (MATs) em carcinoma de células escamosas de língua (CCEL) e verificar um possível envolvimento destes tipos celulares no desenvolvimento desta lesão em pacientes jovens. A análise utilizará peças cirúrgicas coletadas através de biópsia excisional, cujas preparações serão coradas com dois anticorpos monoclonais imunorreativos aos MATs (CD68 e CD163). Também serão coletados os dados clínicos dos pacientes, quais sejam: sexo, idade, ocupação/profissão e estadiamento clínico (TNM), bem como a gradação histológica de malignidade. Contando com a possibilidade, de desenvolvimento da pesquisa com avaliação de prontuários e peças em blocos de parafina presentes nessa instituição, a depender da aprovação do Comitê de Ética.

Agradecemos a atenção e colaboração, uma vez que sem ela o desenvolvimento do projeto de pesquisa estaria prejudicado. Colocamo-nos à disposição para esclarecimentos que se façam necessários.

Atenciosamente,

---

Gustavo Pina Godoy

Professor do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB  
Orientador/responsável pelo Projeto

---

Arley de Sousa Leitão

Aluno do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB  
Participante do Projeto

PRONUNCIAMENTO DA INSTITUIÇÃO.

Ciente do exposto autorizo a realização da pesquisa intitulada, **ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS SUBPOPULAÇÕES M1 E M2 DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES (MAT) EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA**, na presente instituição mediante aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.

---

Antônio Carneiro Arnaud

Diretor-Geral do Hospital Napoleão Laureano

João Pessoa – Paraíba \_\_\_\_de\_\_\_\_\_de 2014

**APÊNDICE F**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**  
**TERMO DO CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO**

**TÍTULO:** ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS SUBPOPULAÇÕES M1 E M2 DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES (MAT) EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA.

**PESQUISADORES RESPONSÁVEIS:** Gustavo Pina Godoy e Arlley de Sousa Leitão.

**INTRODUÇÃO:**

As informações a seguir descreverão esta pesquisa e o papel que você terá como participante da mesma. O pesquisador responsável responderá a qualquer dúvida que possa existir sobre esse termo e sobre o estudo a ser realizado. Por favor, leia-o atentamente.

**PROPÓSITO DA PESQUISA:**

Avaliar através da técnica de imuno-histoquímica a presença das subpopulações M1 e M2 de macrófagos associados a tumores (MATs) em carcinoma de células escamosas de língua (CCEL) e verificar um possível envolvimento destes tipos celulares no desenvolvimento destas lesões em pacientes jovens.

**DESCRIÇÃO DO ESTUDO:**

- **Autonomia:** Sua participação neste estudo é voluntária e você poderá recusar-se a participar ou interromper sua participação a qualquer momento sem constrangimento.
- **Beneficência:** Este estudo trará como benefício o conhecimento sobre o desenvolvimento e progressão tumoral do carcinoma de células escamosas em língua, podendo servir como subsídio para decisão de tratamento e prognóstico.
- **Não maleficência:** Não existe a possibilidade de situação desagradável para o profissional ou entidade que participar deste estudo.
- **Justiça e equidade:** Esse trabalho mostrará a expressão das proteínas CD68 e CD163 em carcinomas de células escamosas de língua, possibilitando um maior conhecimento sobre esta neoplasia, podendo instituir novos protocolos de tratamento e otimizar o prognóstico para futuros casos que venham a existir.

## METODOLOGIA

Serão coletadas informações dos prontuários do período de 2002 a 2013 por um único pesquisador. Os dados serão incluídos num questionário previamente elaborado pelos participantes do estudo. Quanto às peças cirúrgicas que estão armazenadas em bloco de parafina, nestas serão realizado no mínimo dois e no máximo quatro cortes histológicos, sendo um corte com espessura de 5 $\mu$ m e outros cortes de 3 $\mu$ m de espessura. Devido ao tempo decorrido da cirurgia e não havendo a possibilidade de buscar todos os pacientes do período para a assinatura do TCLE este poderá ser realizada pelo responsável pela guarda dos documento.

## CONFIDENCIALIDADE DO REGISTRO:

Todas as informações obtidas através deste estudo permanecerão em sigilo, assegurando a proteção de sua imagem e respeitando valores morais, culturais, religiosos, sociais e éticos. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em congressos ou publicações científicas, porém a identidade dos envolvidos não será divulgada nem serão utilizadas quaisquer informações que permitam a sua identificação.

## CONTATO:

Se houver qualquer dúvida sobre o estudo você receberá maiores informações com Arlley de Sousa Leitão, através do telefone (83) 87187654, via email arlley\_sousa@hotmail.com, ou na secretaria do mestrado em odontologia da UEPB no fone 3315-3471.

---

Gustavo Pina Godoy

Professor do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB  
Orientador/responsável pelo Projeto

---

Arlley de Sousa Leitão

Aluno do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB  
Participante do Projeto

## TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO DA PESQUISA:

Eu, \_\_\_\_\_ RG n°: \_\_\_\_\_, li a descrição do estudo *ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS SUBPOPULAÇÕES MI E M2 DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES (MAT) EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA* e, concordo com a realização da pesquisa e utilização dos prontuários e blocos de parafina sob a minha guarda no Hospital Napoleão Laureano. Confirmando que recebi cópia do termo de esclarecimento para participação da pesquisa. Compreendo que minha participação é voluntária e que posso desistir da continuação do estudo. Autorizo a liberação dos dados obtidos para apresentação em eventos científicos e publicações, desde que não comprometa ou identifique qualquer participante.

João Pessoa \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2014

---

ANTÔNIO CARNEIRO ARNAUD  
Diretor-Geral do Hospital Napoleão Laureano

## APÊNDICE G

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

**Termo de Compromisso do Pesquisador**

Nós, Gustavo Pina Godoy e Arley de Sousa Leitão, responsáveis pelo desenvolvimento do projeto intitulado *ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS SUBPOPULAÇÕES M1 E M2 DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES (MAT) EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA* que possui como objetivo avaliar através da técnica de imuno-histoquímica a presença das subpopulações M1 e M2 de macrófagos associados a tumores (MATs) em carcinoma de células escamosas de língua (CCEL) e verificar um possível envolvimento destes tipos celulares no desenvolvimento destas lesões em pacientes jovens. A análise utilizará peças cirúrgicas coletadas através de biópsia excisional, cujas preparações serão coradas com dois anticorpos monoclonais imunorreativos aos MATs (CD68 e CD163). Também serão coletados os dados clínicos dos pacientes, quais sejam: sexo, idade, ocupação/profissão e estadiamento clínico (TNM), bem como a gradação histológica de malignidade.

Declaramos conhecer o inteiro teor da resolução CNS 466/2012, comprometendo-nos, desde já, a cumpri-la integralmente nas atividades que desenvolvermos, bem como estar continuamente atualizados, inclusive quanto à legislação complementar relativa à matéria, sendo de nossa inteira responsabilidade qualquer penalidade imposta pelo descumprimento da mesma.

---

Gustavo Pina Godoy

Professor do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB

Orientador/responsável pelo Projeto

---

Arley de Sousa Leitão

Aluno do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB.

## ANEXO 1

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



COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA.

**Relator:** 08.

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DAS SUBPOPULAÇÕES M1 E M2 DE MACRÓFAGOS ASSOCIADOS A TUMORES (MATs) EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA.

**Pesquisador:** Gustavo Pina Godoy

**CAAE:** 25017513.9.0000.5187

**Apresentação do Projeto:** O projeto apresenta-se dentro das normas e especificações exigidas.

**Objetivo da Pesquisa:** Avaliar, através da técnica de imunistoquímica, a presença das subpopulações M1 e M2 de MATs (CD68, HLA-DR e CD163) em CCEO de língua em pacientes jovens e verificar um possível envolvimento destes subtipos celulares com um pior ou melhor prognóstico.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:** A presente pesquisa não traz riscos relevantes aos participantes ou aos pesquisadores por se tratar de uma pesquisa laboratorial com coleta de dados por meio de prontuários clínicos. O estudo determinará a eficiência da técnica de imunistoquímica em dupla-marcação para as proteínas CD68/HLA-DR e CD68/CD163 no diagnóstico de CCEO de língua, possibilitando um tratamento mais adequado e portanto um melhor prognóstico aos pacientes que padecem desta enfermidade.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:** A pesquisa é inovadora e importante para elucidar o perfil comportamental dos macrófagos no desenvolvimento dos CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA .

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:** Os termos utilizados, bem como a formatação do projeto e a documentação anexada estão dentro do solicitado.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:** sem pendências

**Situação do Parecer:** Aprovado

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

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