

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação

Avaliação imunoistoquímica de neutrófilos e linfócitos no fronte invasivo do carcinoma espinocelular de lábio inferior.

Karine Duarte da Silva

Pelotas, 2015

Karine Duarte da Silva

Avaliação imunoistoquímica de neutrófilos e linfócitos no fronte invasivo do carcinoma espinocelular de lábio inferior.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração: Diagnóstico Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio
Coorientadoras: Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar
Profa. Dra. Ana Paula Neutzling Gomes

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586a Silva, Karine Duarte da

Avaliação imunoistoquímica de neutrófilos e linfócitos no fronte invasivo do carcinoma espinocelular de lábio inferior / Karine Duarte da Silva ; Sandra Beatriz Chaves Tarquinio, orientadora ; Maria Cássia Ferreira de Aguiar, Ana Paula Neutzling Gomes, coorientadores. — Pelotas, 2015.

60 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Inflamação. 3. Neutrófilos. 4. Linfócitos. I. Tarquinio, Sandra Beatriz Chaves, orient. II. Aguiar, Maria Cássia Ferreira de, coorient. III. Gomes, Ana Paula Neutzling, coorient. IV. Título.

Black : D6

Karine Duarte da Silva

Avaliação imunoistoquímica de neutrófilos e linfócitos no fronte invasivo do carcinoma espinocelular de lábio inferior.

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Diagnóstico Bucal, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 10 de dezembro de 2015

Banca examinadora:

.....
Profª. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio (Orientadora)

Doutora em Odontologia (Área de Patologia Bucal) pela Universidade de São Paulo

.....
Profª. Dra. Patrícia Carlos Caldeira

Doutora em Odontologia (Área de Patologia Bucal) pela Universidade Federal de Minas Gerais

.....
Profª. Dra. Ana Carolina Uchoa Vasconcelos

Doutora em Odontologia (Área de Estomatologia) pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul

.....
Profª. Dra. Adriana Etges (Suplente)

Doutora em Odontologia (Área de Patologia Bucal) pela Universidade de São Paulo

Dedico este trabalho aos meus pais Luiz Carlos e Terezinha pelo amor e apoio incondicionais

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora **Profa. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio**, pelos valiosos conhecimentos repassados, amizade, confiança e oportunidades que tem me proporcionado ao longo desses 5 anos de trabalho conjunto.

Dentre tais oportunidades, destaco o desenvolvimento do presente estudo sob orientação da **Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar**, com a qual pude expandir meus conhecimentos e ter um convívio diário muito agradável durante os 6 meses que estive na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG/MG).

Agradeço também à minha coorientadora **Profa. Dra. Ana Paula Neutzling Gomes**, que, além da participação ativa neste estudo, sempre esteve disposta a me ajudar fora e dentro do ambiente de trabalho.

À **banca examinadora** por aceitar o convite.

Às professoras **Dra. Ana Paula Neutzling Gomes** e **Dra. Isadora Luana Flores**, pela grande contribuição na avaliação do exame de qualificação deste trabalho.

As demais professoras do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca da Faculdade de Odontologia desta Universidade (CDDB/FO-UFPe/RS), **Profa. Dra. Ana Carolina Uchoa Vasconcelos**, a qual tenho como exemplo de conduta profissional, e **Profa. Dra. Adriana Etges** pelos ensinamentos e amizade.

Ao **CDDB**, pelas amostras disponibilizadas para a execução desta pesquisa e a seus funcionários e bolsistas, em especial à **Ivana Neves**, pelo auxílio na execução da parte laboratorial deste estudo e pelos valiosos conselhos advindos de longas conversas.

Da mesma forma, agradeço às pessoas com as quais trabalhei na FO-UFMG/MG além da minha coorientadora, são elas: **Profa. Dra. Maria Auxiliadora do Carmo**, **Prof. Dr. Ricardo Mesquita**, técnicos de laboratório **Domenico Romani** e **Maria Inês Ferreira**, e colegas de pós-graduação **Camila Leite**, **Mariana Israel** e **Andrea Lopez**, com as quais dividi momentos de trabalho e descontração. Um

agradecimento particular à **Profa. Dra. Patrícia Caldeira**, por ter contribuído imensamente no meu aprendizado e ter me acolhido de forma especial durante o estágio.

Aos colegas de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO-UFPeI/RS), **Camila Perelló Ferrúa** e **Felipe Martins** pela companhia e amizade. Também ao **Celaniro Junior**, secretário desse Programa, pela colaboração nos trâmites burocráticos necessários para a realização do curso.

À acadêmica de Odontologia **Lauren Schuch**, pela amizade e auxílio na execução não só desse, como de outros trabalhos.

Às minhas **amigas**, não citarei nomes porque felizmente são muitas, que compartilham comigo os bons e maus momentos e reforçam o valor das amizades.

Aos meus colegas cirurgiões-dentistas, **Patrícia Menine**, **Roberta Escher** e **Wellington Rosa**, pela amizade fraterna que perdura além da graduação. Em especial ao meu hoje colega de pós-graduação Wellington, pela caminhada conjunta nessa área, por ser meu “braço-direito”.

À “**Pensão da Lú**” e seus 18 moradores, que fizeram meus últimos dois meses em Belo Horizonte serem especiais. Vou sentir saudades e levar comigo lembranças dos momentos que vivi com cada um de vocês.

Aos meus pais **Luiz Carlos** e **Terezinha**, meu porto-seguro. Como sempre digo, vocês são TUDO na minha vida. Igualmente, ao meu irmão, **Claiton Luis**, cunhada **Liliane** e sobrinha **Isabel**.

Ao **PPGO-UFPeI/RS** e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (**FAPERGS/RS**), pela formação acadêmica e bolsa de mestrado.

Ao **CNPq**, que por meio do Casadinho-Procad, proporcionou-me realizar parte deste trabalho na UFMG/MG.

À **UFPeI/RS** e à **UFMG/MG**, pelo ensino de excelência concedido.

Resumo

SILVA, Karine Duarte da. **Avaliação imunoistoquímica de neutrófilos e linfócitos no fronte invasivo do carcinoma espinocelular de lábio inferior**. 2015. 61f. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Bucal) - Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) de lábio apresentam prognóstico favorável em comparação aos pacientes com a lesão intraoral. O estadiamento clínico da lesão é a principal forma de avaliação do prognóstico do CEC oral, além dos sistemas de gradação histológica dos tumores. A análise do *budding* tumoral (BT) e do infiltrado inflamatório na região do fronte invasivo tumoral (FIT) podem configurar-se como fatores prognósticos complementares, já que para alguns tipos de câncer, entre eles o CEC intraoral, BT positivo, contagem elevada de neutrófilos no tumor, sangue ou ambos e razão neutrófilos/linfócitos (RNL) aumentada representam um pior prognóstico para os pacientes. O objetivo deste estudo foi avaliar a presença e a RNL no FIT, bem como a associação desses achados com o grau histológico de malignidade (GHM) dos tumores e o BT em uma amostra de CEC de lábio. Revisou-se os arquivos do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, buscando-se lesões submetidas a biópsias excisionais de CEC em lábio inferior e classificando-as segundo um sistema de classificação do GHM. Realizou-se técnica imunoistoquímica com os anticorpos CD66b e CD3 para avaliação de neutrófilos e linfócitos, respectivamente. O anticorpo AE1/AE3 foi empregado para a classificação do BT. Neutrófilos CD66b⁺ e linfócitos CD3⁺ foram analisados semi-quantitativamente no FIT. De um total de 43 casos, 36 (83,7%) eram tumores bem diferenciados e 32 (74,4%) não apresentavam BT. Observou-se baixa infiltração de neutrófilos e alta de linfócitos (índices 0,8 e 2,0, respectivamente) na região do FIT, acarretando baixa RNL na mesma região. Portanto, a alta diferenciação tumoral, os poucos casos exibindo BT positivo e a baixa RNL no FIT podem estar associadas ao melhor prognóstico do CEC labial.

Palavras-chave: carcinoma de células escamosas; inflamação; neutrófilos; linfócitos.

Abstract

SILVA, Karine Duarte da **Immunohistochemical evaluation of neutrophils and lymphocytes in the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma**. 2015. 61f. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Bucal) - Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

Patients with lip squamous cell carcinoma (LSCC) present favorable prognosis compared to those with intraoral lesion. Clinical staging of lesion is the main way of assessing the prognosis of oral squamous cell carcinoma (OSCC), followed by the histological grading systems. Analysis of tumor budding (TB) and the inflammatory infiltrate in the tumoral invasive front (TIF) can be configured as additional prognostic factors, since for some types of cancers, including intraoral SCC, findings as TB positive, high counting of neutrophils in tumor, blood or both and increased neutrophils/lymphocytes ratio (NLR) represent a worse prognosis for the patients. The aim of this study was to evaluate the presence and the NLR in the TIF, and the association of these findings with the histological malignancy grading (HMG) of tumors and the TB in a LSCC sample. The files from the Center of Diagnosis of Oral Diseases, Dental School, Federal University of Pelotas were reviewed searching specimens from excisional biopsies of lower LSCC (LLSCC) and classifying them according to a HMG system. Immunohistochemistry was performed with CD3 and CD66b antibodies for evaluation of neutrophils and lymphocytes, respectively. The antibody AE1/AE3 was used for the identification of TB. CD66b⁺ neutrophils and CD3⁺ lymphocytes were analyzed semi-quantitatively in the TIF. From a total of 43 cases, 36 (83.7%) represented well differentiated tumors, 32 (74.4%) showed none TB. There were low neutrophil and high lymphocyte infiltrations (indexes 0.8 and 2.0, respectively) in the TIF, leading to a low NLR in the same region. Therefore, the high differentiation grading, the few BT positive cases and the low NLR in the TIF may be associated with better prognosis in LSCC.

Keywords: squamous cell carcinoma; inflammation; neutrophils; lymphocytes.

Lista de Abreviaturas e Siglas

BT	<i>Budding</i> tumoral
CDDB/FO-UFPe/RS	Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas/RS
CEC	Carcinoma espinocelular
FIT	Fronte de invasão tumoral
GHM	Grau histológico de malignidade
H&E	Hematoxilina & Eosina
HMG	<i>Histological malignancy grading</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LLSCC	<i>Lower lip squamous cell carcinoma</i>
LSCC	<i>Lip squamous cell carcinoma</i>
NLR	<i>Neutrophil/lymphocyte ratio</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSCC	<i>Oral squamous cell carcinoma</i>
RNL	Razão neutrófilo/linfócito
SCC	<i>Squamous cell carcinoma</i>
TAM	<i>Tumor-associated macrophage</i>
TAN	<i>Tumor-associated neutrophil</i>
TB	<i>Tumor budding</i>
TIF	<i>Tumoral invasive front</i>

Sumário

1 Introdução.....	10
2 Projeto de Pesquisa.....	13
2.1 Introdução (Revisão de Literatura).....	13
2.2 Justificativa.....	21
2.3 Objetivos.....	22
2.4 Hipótese.....	23
2.5 Materiais e Métodos.....	24
2.6 Orçamento.....	28
2.7 Cronograma.....	29
3 Relatório do Trabalho de Campo.....	30
4 Artigo.....	32
5 Considerações Finais.....	50
Referências.....	51
Apêndice.....	57
Anexo.....	59

1 Introdução

Segundo “*The global burden of cancer 2013*” publicado em 2015 no JAMA Oncology, as taxas de incidência e morte por câncer da cavidade oral e lábios, para ambos os sexos em 2013, foram maiores nos países em desenvolvimento em comparação aos desenvolvidos. O Instituto Nacional do Câncer (INCA) previu para 2014 no Brasil uma incidência de 11.280 novos casos desse tipo de câncer em homens e 4.010 em mulheres para cada 100.000 habitantes, figurando, dessa forma, em 5º lugar entre os tipos de câncer mais incidentes em homens (INCA, 2014).

O carcinoma espinocelular (CEC) é a variante responsável por cerca de 90% das malignidades da cavidade oral e lábios (SILVEIRA et al., 2010; ZINI, CZERNINSKI, SGAN-COHEN, 2010), sendo que o CEC de lábios, em especial lábio inferior, possui notável prevalência em regiões da Austrália, Europa, EUA e Brasil, principalmente entre homens acima dos 40 anos, de pele clara e com ocupação ligada à exposição solar crônica (ABREU, KRUGER, TENNANT, 2009; DOMÍNGUEZ-GORDILLO et al., 2015; KOUTROS et al., 2010; OSTERNE et al. 2011). Em particular no Brasil, por ser um país tropical onde há grande incidência de radiação ultravioleta, o câncer labial assume significativa importância (SCULY, BAGAN, 2009; SENA et al., 2010).

Ainda que na maioria dos estudos o câncer de lábio esteja agrupado com o câncer intraoral, as lesões naquele sítio apresentam características distintas, em especial relacionadas ao prognóstico, com maior sobrevida livre de doença em 5 anos que para os casos intraorais (BHANDARI et al., 2014; XIE et al., 2015). Os índices de metástase regional são baixos para o CEC de lábio, não alcançado 10% em alguns estudos e sendo ainda menores para metástase à distância, apesar do fato que a região possui rica vascularização linfática (DOMINGUEZ-GORDILLO et al., 2015; RENA et al., 2014; SOLLAMO et al., 2015). O diagnóstico precoce e o tratamento cirúrgico amplo, favorecidos nessa localização, também podem influenciar no perfil menos preocupante das lesões nesse sítio (RENA et al., 2014; SENA et al., 2010).

Atualmente, o principal fator prognóstico para o CEC oral é o estadiamento clínico da lesão (UICC, 2002). Entretanto, fatores prognósticos complementares

mostram-se necessários na melhor determinação do prognóstico dos pacientes (CHATZISTAMOU et al., 2010; LARSEN et al., 2009).

Nesse contexto, a literatura sugere que células malignas localizadas não só na região do fronte invasivo tumoral (FIT), área mais invasiva da neoplasia, como também intratumorais ou dispersas pelo tecido conjuntivo podem formar *buds*, ou seja, agrupamentos de até 4 células tumorais, o que se conhece por *budding* tumoral (BT) quando no mínimo 5 *buds* são observados (LUGLI et al., 2011; MARANGON JUNIOR et al., 2014; WANG et al., 2011). Essa característica histomorfológica há tempos figura como um fator prognóstico desfavorável independente em cânceres de diferentes localizações, apresentando maior potencial de disseminação e metástase (KARAMITOPOULOU et al., 2013; LIANG et al., 2013; MARANGON JUNIOR et al., 2014; MORODOMI et al., 1989).

É também na área do FIT que Bryne et al. (1992) propuseram o sistema de classificação do grau histológico de malignidade (GHM) do CEC oral, método relevante na análise do prognóstico dos pacientes. Neste sistema de gradação, a maior intensidade do infiltrado inflamatório é considerada favorável ao paciente, entretanto, estudos mais recentes mostram que o infiltrado inflamatório pode apresentar características antitumorigênicas e pró-tumorigênicas, contrariando a visão clássica de que as células inflamatórias participariam tão somente da defesa do hospedeiro contra neoplasias (GALDIERO et al., 2013; SOUTO 2011; TECCHIO et al., 2013).

Os TANs (do inglês *tumor-associated neutrophils*) podem apresentar um fenótipo antitumorigênico (N1) ou pró-tumorigênico (N2) (FRIDLENDER et al., 2009; GALDIERO et al., 2013). Foi demonstrado que moléculas produzidas por essas células participariam em processos de degradação da matriz extracelular, angiogênese, linfangiogênese e metástase (DONSKOV, 2013; FRIDLENDER et al., 2009).

Nesse sentido, diversos estudos têm demonstrado associação da contagem elevada de neutrófilos no tumor, sangue ou ambos de pacientes portadores de alguns tipos de câncer, entre eles o de cabeça e pescoço, com desfecho clínico pobre, resultados insatisfatórios no tratamento e menor sobrevida (DONSKOV, 2013; MILRUD et al., 2012; TRELLAKIS et al. 2011). Similarmente, a razão neutrófilos/linfócitos (RNL) elevada teria papel nesse prognóstico desfavorável (HE et

al., 2012; ILIE et al., 2012; PERISANIDIS et al., 2013), demonstrando a relevância da investigação dessas células inflamatórias na carcinogênese oral.

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença e a RNL, bem como sua associação com o GHM e o BT em uma amostra de CEC de lábio. A hipótese levantada é que CECs nesse sítio apresentam RNL menor que a encontrada em CECs intraorais, estando associada com baixo GHM e ausência de BT.

2 Projeto de Pesquisa

2.1 Introdução (Revisão de Literatura)

Carcinoma espinocelular bucal: aspectos epidemiológicos, clínicos e etiologia

O câncer foi responsável por 7,5 milhões de mortes ocorridas em 2008, 8,2 milhões em 2012 e, segundo estimativas, será responsável por 13,2 milhões dos casos de morte no mundo em 2030. Projeta-se que nesse mesmo ano, 22,2 milhões de pessoas receberão diagnóstico de câncer, um aumento de 75% em relação a 2008 (IARC, 2012).

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima para 2014 no Brasil a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo o câncer de pele não-melanoma. Mais de 100 tipos diferentes de doenças podem ser qualificados como câncer, apresentando em comum o crescimento desordenado de células anormais, com potencial metastático e origem devida a condições multifatoriais (INCA, 2014).

O câncer da cavidade oral e lábios revelou uma incidência mundial de 300.373 casos em 2012, com aproximadamente metade deles levando a óbito (IARC, 2012). O INCA prevê para 2014 no Brasil uma incidência de 11.280 novos casos desse tipo de câncer em homens e 4.010 em mulheres para cada 100.000 habitantes, figurando, dessa forma, em 5º lugar entre tipos de câncer mais incidentes em homens (INCA, 2014).

O carcinoma espinocelular (CEC) é a variante que representa mais de 90% das malignidades da cavidade bucal, afetando principalmente homens com idade superior a 45 anos (JEMAL et al., 2009; ZINI, CZERNINSKI, SGAN-COHEN, 2010). Tal variante inclui o câncer de lábio, principalmente de lábio inferior, que representa a maioria dos CECs bucais e mostra forte associação com a cor da pele e a exposição solar crônica frequentemente observada em trabalhadores rurais, da construção civil, pescadores, dentre outras atividades ao ar livre. Também inclui o câncer intraoral, que afeta principalmente as bordas laterais de língua, assoalho bucal e gengiva (SCULLY, BAGAN, 2009) e está intimamente relacionado ao consumo de tabaco, o qual ainda pode apresentar sinergismo de efeito com o álcool (MAASLAND et al., 2014).

Apesar dos avanços na terapêutica, a sobrevida de cinco anos para os pacientes com CEC intraoral permanece praticamente inalterada ao longo dos anos, ficando em torno de 50%, o que revela um prognóstico desfavorável (SCULLY, BAGAN, 2009). Tal panorama decorre do atraso no diagnóstico da doença, o que pode ser notado nas populações de baixo nível socioeconômico, menor grau de escolaridade e que, geralmente, consomem álcool e tabaco em excesso (PUIGPNÓS et al., 2009; WÜNSCH FILHO et al., 2010).

Carcinoma espinocelular de lábio

Sabe-se que o CEC de lábio apresenta epidemiologia, diagnóstico e prognóstico distintos quando comparados com casos de CEC em outras regiões bucais (SOBIN, GOSPODAROWICZ, WITTEKIND, 2009). Ele corresponde a aproximadamente 15% de todas as neoplasias de cabeça e pescoço, 25–30% de todos os tumores da cavidade bucal e 20% dos tumores malignos do trato respiratório e digestivo superior (BANDYOPADHYAY, NAG, BANDYOPADHYAY, 2010; SOUZA et al., 2011), sendo que em algumas regiões da Austrália, França e EUA mostra elevada prevalência, principalmente entre homens de meia-idade, pele clara e com ocupação ligada à exposição solar (ABREU, KRUGER, TENNANT, 2009; KOUTROS et al., 2010; WARNAKULASURIYA, 2009). No Brasil, por ser um país tropical onde há grande incidência de radiação ultravioleta, o câncer labial assume significativa importância (SCULLY, BAGAN, 2009; SENA et al., 2010).

Como lesão potencialmente maligna capaz de evoluir para o CEC de lábio, tem-se a queilite actínica (LUCENA et al., 2012; SGARBI et al., 2010), também causada principalmente pela exposição solar crônica, a qual pode causar danos teciduais e ao sistema de reparo do DNA (DA SILVA et al., 2012; SOUZA et al., 2011).

A análise da expressão de proteínas presentes na membrana basal e na superfície de células epiteliais em casos de queilite actínica e CEC de lábio inferior tem sido realizada em diversos estudos com o objetivo de otimizar o diagnóstico, avaliar o prognóstico e melhor entender a carcinogênese dessa condição (DA SILVA et al., 2012; PEREIRA et al. 2013; SALVADORI et al, 2014). Moléculas de adesão epitelial como as integrinas $\beta 1$, $\beta 4$ e $\alpha 3$ apresentaram-se com expressão reduzida em

casos de queilite actínica e não foram expressas nos casos de CEC em lábio inferior (DA SILVA et al., 2012).

O tempo necessário para que uma queilite actínica evolua para câncer labial varia de 20 a 30 anos, podendo ocorrer mais rapidamente em alguns indivíduos (SOUZA et al., 2011). O tumor de lábio é caracterizado por uma taxa de crescimento lenta (NEVILLE et al., 2009), fazendo com que o diagnóstico da lesão geralmente ocorra em uma fase precoce da doença, além do que o sítio é de fácil visualização pelo paciente e pelo profissional de saúde.

O prognóstico para os casos de CEC de lábio é mais favorável, com sobrevida em cinco anos alcançando 95% para os casos iniciais (SCULLY, MOLES, 2008). Sena et al. (2010) afirmaram que determinados fatores devem ser verificados para se avaliar o prognóstico do câncer labial como: estadiamento clínico, diâmetro do tumor, grau histológico, tipo de tratamento e margem cirúrgica. Em uma revisão sistemática, esses autores identificaram que a frequência de CECs de lábio bem diferenciados (grau I) e com grau intermediário de diferenciação (grau II) variou entre 60%-90%, segundo a classificação de 2005 da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2005), corroborando o indicativo de prognóstico mais favorável das referidas lesões nesse sítio.

Ainda, o CEC de lábio apresentou uma incidência menor que 2% de metástase em linfonodos regionais, a qual se dá principalmente na cadeia submentoniana (NEVILLE et al., 2009). Esses linfonodos podem ser removidos de forma eletiva, dependendo da conduta terapêutica do profissional e de sua equipe, mesmo que não exista comprometimento observado clinicamente por palpação ou exames imaginológicos (BHANDARI et al., 2014). Por meio de uma revisão sistemática e metanálise, Bhandari et al. (2014) observaram uma estimativa combinada de 0,17 (0,10-0,28; intervalo de confiança - 95%) para presença de metástase oculta em linfonodos removidos cirurgicamente e de 0,008 (0,01-0,18; intervalo de confiança - 95%) para metástase tardia em pacientes sem ressecção cirúrgica. Nesse mesmo estudo, a sobrevida média de pacientes sem envolvimento linfonodal, tratados com ressecção eletiva dos linfonodos regionais foi de 96.21%, enquanto para pacientes tratados sem nenhuma intervenção nos linfonodos a média de sobrevida foi 87.76%.

Rena et al. (2014), por meio de um estudo retrospectivo dos casos de CEC em lábio inferior diagnosticados e tratados em um centro de cirurgia oral e maxilofacial de uma universidade, observaram recorrência em 4,59% dos casos, metástase regional

em 2,75% e metástase à distância, a qual tem pulmões e ossos como sítios preferenciais, em 0,92%, verificando, portanto, perfil menos preocupante dos tumores no referido sítio.

Sistemas de classificação dos tumores e *budding* tumoral

Atualmente, o principal fator prognóstico para o CEC bucal é o estadiamento clínico da lesão, estabelecido de acordo com a classificação “TNM”. Neste sistema, “T” refere-se à dimensão do tumor primário, “N” à existência de metástases em linfonodos regionais e “M” à presença de metástase à distância para outros órgãos (UICC, 2002). Utiliza-se também o sistema de gradação microscópica proposto pela OMS em 2005, segundo o qual as lesões são classificadas em bem, moderadamente e pobremente diferenciadas, de acordo com as alterações apresentadas pelas células. Apesar de amplamente aceitos e utilizados, esses sistemas podem apresentar falhas e deficiências, revelando a importância de fatores prognósticos complementares na determinação mais fiel do prognóstico dos pacientes (CHATZISTAMOU et al., 2010; LARSEN et al., 2009).

Nesse sentido, outros sistemas de gradação microscópica foram propostos considerando, entre outras características, a presença de infiltrado inflamatório adjacente à área tumoral (ANNEROTH et al., 1987; BRANDWEIN-GENSLER et al., 2005; BRYNE et al., 1992; JAKOBSSON et al., 1973). Bryne et al. (1992) propôs a gradação das lesões na área mais invasiva da neoplasia, denominada de frente invasivo tumoral (FIT). Neste sistema, a maior intensidade do infiltrado inflamatório linfoplasmocitário é considerada para uma gradação histológica mais favorável, entretanto, de acordo com estudos mais recentes, o infiltrado inflamatório pode apresentar características antitumorigênicas e pró-tumorigênicas, contrariando a visão clássica de que as células inflamatórias participariam tão somente da defesa do hospedeiro contra neoplasias (CAMISASCA et al., 2011; CHATZISTAMOU et al., 2010;).

Além disso, a literatura sugere que células malignas localizadas não só na região do FIT, como também intratumorais ou dispersas pelo tecido conjuntivo tem maior potencial de disseminação e metástase e podem formar *buds*, ou seja, agrupamentos celulares, o que se conhece por *budding* tumoral (BT) (LUGLI et al.,

2011; MARANGON JUNIOR et al., 2014; WANG et al., 2011). Acredita-se que o BT represente a transição epitélio-mesênquima (CHAFFER, WEINBERG, 2011; ZLOBEC, LUGLI, 2010).

A avaliação desse achado histopatológico, entretanto, muitas vezes é dificultada pela presença de infiltrado inflamatório abundante, sendo que até mesmo fibroblastos, entre outras células presentes no estroma, podem ser confundidas com *buds* (MITROVIC et al., 2012). A realização de técnica imunoistoquímica para citoqueratinas pode ser útil na análise do BT, mesmo havendo controvérsias na literatura quanto a sua utilização (MARANGON JUNIOR et al., 2014; MITROVIC et al., 2012)

Estudos sobre o papel do BT em carcinomas de diferentes sítios vêm crescendo na última década, entretanto, para casos de carcinoma colorretal, a presença dessa característica histomorfológica há tempos figura como um fator prognóstico desfavorável independente, principalmente nos casos em que não há envolvimento linfonodal (LUGLI et al., 2011; MITROVIC et al. 2012; MORODOMI et al., 1989).

As variadas metodologias utilizadas na literatura divergem quanto à definição de BT e de sua intensidade, dificultando a padronização (GRIZZI et al., 2012; MITROVIC et al., 2012). Entretanto, na maioria dos estudos, *bud* é definido como a presença de células isoladas ou agrupamentos de até quatro células tumorais (MARANGON JUNIOR et al., 2014; WANG et al., 2011). A delimitação do diâmetro do campo a ser avaliado para identificação do BT, o qual pode variar dependendo da metodologia empregada, interfere na quantidade de agrupamentos contados (MITROVIC et al., 2012), bem como se a contagem é feita na área de maior concentração de *buds*, ou utilizando-se a média dos achados em todo o FIT ou ainda, pela obtenção da proporção da área do FIT que possui BT (HOMMA et al., 2010; MARANGON JUNIOR et al., 2014; SYK et al., 2011).

Wang et al. (2011) revelaram associação em CEC de língua entre presença de BT com: tamanho do tumor, seu grau de diferenciação celular, estágio clínico, metástase linfonodal e reduzida sobrevida. Dessa forma, a avaliação da presença do BT nos casos de CEC oral mostra-se promissora e relevante no que diz respeito à individualização do tratamento dos pacientes e à possibilidade de novas terapias que

tenham essa característica histopatológica como alvo, conforme já afirmado por Grizzi et al. (2012) e Zlobec e Lugli (2010) para os casos de carcinoma colorretal.

Atuação do infiltrado inflamatório, principalmente neutrófilos e linfócitos, na carcinogênese oral

A atuação de diferentes células inflamatórias na carcinogênese tem sido alvo de diversas pesquisas (CARUS et al., 2013; GALDIERO et al., 2013; TRELLAKIS et al., 2011). Leucócitos associados ao tumor podem atuar tanto na defesa, quanto contribuírem com a progressão tumoral, devido às funções inibitórias e estimulantes que podem exercer sobre as células neoplásicas (GALDIERO et al., 2013; HOUGHTON, 2010; TECCHIO et al., 2013). Macrófagos, por exemplo, possuem essa dupla função, a qual parece ser dependente do microambiente tumoral em que atuam (MANTOVANI, SICA, 2010; GALDIERO et al., 2013). Moléculas produzidas por células inflamatórias podem promover destruição de matriz extracelular e atuar como fatores angiogênicos e linfangiogênicos. As metaloproteinases de matriz, secretadas por macrófagos e neutrófilos associados ao tumor (TAMs e TANs, respectivamente do inglês *tumor-associated macrophages* e *tumor-associated neutrophils*) tem um importante papel na angiogênese, invasão tumoral e metástase, principalmente pela capacidade de degradar o colágeno IV, um dos principais componentes da membrana basal (GREGORY, HOUGHTON, 2011; TECCHIO et al., 2013).

Entre os componentes do infiltrado inflamatório em relação às neoplasias malignas humanas, os neutrófilos aparecem como células que devem ser melhor investigadas (DONSKOV, 2013). Há tempos a literatura vem relatando sua atuação antitumorigênica (SOUTO 2011). Entretanto, estudos mais recentes mostram que a função dos neutrófilos é modulada por uma série de quimiocinas e citocinas produzidas pelas células tumorais, e que tais células inflamatórias podem estar implicadas na progressão tumoral (HOUGHTON, 2010; TECCHIO et al., 2013). A expressão de interleucina-8 pelas células tumorais promove a infiltração de neutrófilos no tumor e sua ativação (TRELLAKIS et al., 2011), podendo degradar a matriz extracelular por meio de enzimas e estimular tanto a proliferação de células tumorais, quanto a imunossupressão relacionada à sua degranulação e liberação de Arginase-1, um inibidor de função de células T (DUMITRI et al., 2013).

Fridlender et al. (2009) demonstraram que TANS apresentam estados diferenciais de ativação/diferenciação, podendo revelar um fenótipo antitumorigênico, chamado de N1 ou pró-tumorigênico, N2. Especula-se que o nível de secreção de substâncias pelos neutrófilos os classificaria em N1 e N2, ou seja, esses níveis representariam diferentes estágios de ativação dessas células (GALDIERO et al., 2013; HOUGHTON, 2010).

Nesse contexto, diversos estudos têm demonstrado associação da contagem elevada de neutrófilos no tumor com desfecho clínico pobre em alguns tipos de câncer, entre eles o de cabeça e pescoço, demonstrando sua relevância prognóstica (DONSKOV, 2013; DUMITRU et al., 2013, TRELLAKIS et al. 2011).

Em relação ao CEC de cabeça e pescoço, Trellakis et al. (2011) encontraram, por meio da técnica imunoistoquímica para o anticorpo anti-CD66b, que a maioria dos tumores classificados como T4 exibia infiltração neutrofílica média ou intensa, enquanto tumores menores e menos invasivos mostravam menor infiltração. Além disso, ao avaliarem apenas pacientes com estadiamento III e IV, demonstraram que a sobrevida de cinco anos para pacientes com infiltração tecidual de neutrófilos média ou intensa foi significativamente menor que para pacientes com fraca ou nenhuma infiltração. Millrud et al. (2012) também chegaram a conclusões semelhantes, relatando que o número total de neutrófilos no sangue foi maior nos pacientes com CEC de cabeça e pescoço que nos controles saudáveis.

Ainda, conforme recente revisão de literatura, a contagem elevada de neutrófilos no sangue, no tumor ou em ambos é considerada um forte e independente fator de risco para que o paciente não experimente satisfatoriamente os benefícios da terapia instituída (DONSKOV, 2013).

Os linfócitos também aparecem nesse cenário de investigações. Foi relatado que linfócitos T CD4 e CD8 ativados no ambiente tumoral retardariam a apoptose de neutrófilos via liberação de TNF α , IFN α e GM-CSF (respectivamente, do inglês *tumor necrosis factor alpha*, *interferon alpha*, *granulocyte macrophage colony-stimulating factor*), o que foi demonstrado *in vitro* (PELLETIER, MICHELETTI, CASSATELLA, 2010).

He et al. (2012) observaram que alta porcentagem de linfócitos estava independentemente associada com favorável sobrevida livre da doença em pacientes com câncer de nasofaringe, enquanto alta porcentagem de neutrófilos relacionava-se

a pobre sobrevida livre da doença. Dessa forma, o papel dos linfócitos na carcinogênese parece estar principalmente relacionado no que diz respeito à relação neutrófilo/linfócito, ou seja, à interação que ocorre entre estes dois tipos celulares.

Estudos sobre câncer de nasofaringe e ovário mostraram que resultados insatisfatórios no tratamento dos pacientes acometidos e baixa sobrevida estavam relacionados com razão elevada neutrófilos/linfócitos (CHO et al. 2009; HE et al., 2012). Desfecho clínico pobre também foi observado em carcinoma de células renais, melanoma, carcinoma hepatocelular, colangiocarcinoma, glioblastoma, tumor estromal gastrointestinal, câncer colorretal, cervical, gástrico, esofágico, pulmonar e de cabeça e pescoço, quando a razão neutrófilo/linfócito estava elevada no sangue (CARUS et al., 2013; DONSKOV, 2013; DUMITRU et al., 2013; ILIE et al., 2012; RAO et al., 2012).

Trellakis *et al.* (2011) demonstraram que não somente a porcentagem de polimorfonucleares neutrófilos, como também a razão neutrófilos/linfócitos sanguíneos foram maiores em pacientes com CEC de cabeça e pescoço do que no grupo controle, com envolvimento linfonodal e tamanho das lesões (principalmente T4) associados a esses valores elevados. Millrud et al. (2012) também encontraram maior proporção neutrófilos/linfócitos em pacientes com envolvimento linfonodal e com pior desfecho. Pobre sobrevida doença-específica em pacientes com câncer de boca avançado (estadiamento III e IV) e pobre diferenciação tumoral também apareceram associadas com maior razão entre tais células sanguíneas no período pré-tratamento (PERISANIDIS et al., 2013), revelando a participação e importância da investigação dessas células inflamatórias na carcinogênese bucal.

2.2 Justificativa

As pesquisas acerca do câncer de boca são importantes devido à alta prevalência dessa patologia em algumas regiões do mundo, mostrando a relevância de conhecer melhor os fatores envolvidos na carcinogênese oral. Dessa forma, as lesões de carcinoma espinocelular (CEC) em lábio permitem um modelo privilegiado para o estudo da progressão tumoral a partir da análise histológica de peças cirúrgicas desta neoplasia na região do fronte invasivo tumoral, bem como na lâmina própria do epitélio adjacente ao tumor. A avaliação do infiltrado inflamatório, principalmente neutrófilos e linfócitos, nestas diferentes regiões tumorais e de sua associação com o *budding* tumoral pode ajudar na compreensão do papel da inflamação na carcinogênese labial e do comportamento diferenciado dos CECs de lábio.

2.3 Objetivos

Objetivo Geral

Avaliar a participação de neutrófilos e linfócitos na progressão tumoral do carcinoma espinocelular (CEC) de lábio inferior, avaliando a presença destas células inflamatórias em diferentes regiões, frente invasivo tumoral (FIT) e lâmina própria do epitélio adjacente ao tumor, e sua associação com o *budding* tumoral (BT).

Objetivos Específicos

- Avaliar a presença do BT nos espécimes tumorais e analisar a relação deste achado com o grau histológico de malignidade;
- Estabelecer a contagem de neutrófilos e linfócitos e a razão neutrófilos/linfócitos (RNL) no FIT e na lâmina própria do epitélio adjacente ao tumor;
- Verificar a associação entre a presença do BT nos casos de CEC de lábio inferior com a contagem de neutrófilos e linfócitos e a RNL no FIT e na lâmina própria do epitélio adjacente ao tumor.

2.4 Hipótese

Em carcinomas espinocelulares (CECs) de lábio, neutrófilos e linfócitos concentram-se na região do fronte invasivo tumoral. Nestes tumores, a razão neutrófilos/linfócitos apresenta valores baixos, diferente do que a literatura aponta para os casos de CEC intraorais, e mostra associação com baixo grau histológico de malignidade e ausência de *budding* tumoral.

2.5 Materiais e Métodos

Aspectos éticos e legais

O presente projeto de pesquisa será submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (CEP/FO-UFPeI/RS).

Tipo de estudo

Estudo retrospectivo de casos de carcinoma espinocelular (CEC) de lábio inferior dos arquivos do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (CDDDB/FO-UFPeI/RS). A amostra será de conveniência, conforme trabalhos semelhantes encontrados na literatura (FREITAS et al., 2011; MARANGON JUNIOR et al., 2014; SOUZA et al., 2010). Estima-se selecionar 60 indivíduos com CEC de lábio inferior.

Amostras

Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos a partir das fichas de biópsia que acompanhavam os espécimes. Os critérios de inclusão e exclusão foram os seguintes:

Critérios de inclusão: material proveniente do tratamento cirúrgico (biópsia excisional) de CEC de lábio inferior que tenha sido encaminhado ao CDDDB/FO-UFPeI/RS para análise histopatológica.

Critérios de exclusão: material anátomo-patológico proveniente de lesões de CEC em lábio superior e amostras que apresentem material insuficiente ou com sinais de má fixação.

Análise histológica

Os materiais provenientes do tratamento cirúrgico dos tumores e as respectivas lâminas histológicas coradas em hematoxilina & eosina (H&E) serão avaliados por um patologista oral experiente e um aluno de mestrado em Diagnóstico Bucal devidamente treinado para tal análise. Teste estatístico *kappa* será realizado para observar a concordância intra e inter-avaliadores. A análise será realizada na região do fronte invasivo tumoral (FIT) e quanto à presença de *budding* tumoral (BT).

Avaliação do BT: Com o auxílio de imunoistoquímica para os anticorpos AE1/AE3, visando mais fácil observação das células tumorais ao microscópio óptico, a presença do BT será avaliada buscando-se primeiramente a região com maior número de *buds* em um aumento de 100X. Considera-se BT presente quando, em campo observado com lente objetiva de 20X, houver células isoladas ou pequenos agrupamentos de até quatro células, totalizando no mínimo cinco *buds* (MARANGON JUNIOR et al., 2014).

Técnica imunoistoquímica

Novas lâminas serão confeccionadas para observar a marcação das células-alvo da pesquisa (neutrófilos, linfócitos) e pesquisa do BT. A partir dos blocos de parafina, serão obtidos cortes histológicos com 3µm de espessura, que serão acomodados em lâminas silanizadas. Estas lâminas serão submetidas à técnica imunoistoquímica para os antígenos CD66b (neutrófilos), CD45RO (linfócitos) e AE1/AE3 (*budding* tumoral), descrita abaixo:

1. Desparafinização dos cortes histológicos em xilol seguidos por hidratação em banhos decrescentes de etanol;
2. Recuperação antigênica, conforme descrito na Tabela 1;
3. Bloqueio da atividade de ligação à biotina endógena, segundo o protocolo e MILLER et al. (1999);
4. Bloqueio da peroxidase endógena, solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes;

5. Incubação com anticorpo primário, conforme especificações descritas na Tabela 1, por 60 minutos, à temperatura ambiente;
6. Incubação com sistema de detecção, conforme descrito na Tabela 1;
7. Revelação da reação utilizando-se solução cromógena de 3,3' diaminobenzidina-DAB (Dako Cytomation, Carpinteria, Califórnia, EUA, código K3468);
8. Contracoloração com hematoxilina de Mayer;
9. Desidratação em soluções de etanol em concentrações crescentes; diafanização em xilol e montagem com lâminulas de vidro.

Tabela 1: Reagentes e procedimentos para imunoistoquímica

Anticorpo primário	Clone/fabricante	Recuperação antigênica	Diluição	Sistema de detecção
CD66b	GF 10F5, BD Biosciences, EUA	TRIS-EDTA, pH 9.0, banho maria 96°C, 30 min	1:600	LSAB
CD45RO	UCHL-1, Biocare Medical, EUA	Ácido Cítrico, pH 6.0, banho maria 95°C, 30 min	1:100	LSAB
AE1/AE3	Biocare Medical, EUA	Ácido Cítrico, pH 6.0, banho maria 95°C, 30 min	1:100	LSAB

Gradação histopatológica dos tumores

Esta classificação será realizada nas lâminas histológicas coradas em H&E, conforme os critérios do sistema proposto por Bryne et al. (1992), detalhado no Anexo A.

Determinação da contagem de neutrófilos e linfócitos e da razão neutrófilos/ linfócitos

Para a contagem de neutrófilos e linfócitos, primeiramente, serão identificadas as seguintes regiões tumorais: fronte invasivo e lâmina própria do epitélio adjacente

ao tumor. Em cada uma dessas áreas serão obtidas até 10 fotomicrografias em aumento de 200X em câmera (Zeiss AxioCam ICc 1) acoplada a microscópio (Zeiss AX10 Scope.A1) e conectada a software de aquisição de imagens (Axio Vison) (Laboratório Experimental de Patologia 1 – UFMG/MG). As imagens capturadas serão avaliadas no programa *Image Tool*, onde será feita a contagem manual do número de neutrófilos e de linfócitos, de acordo com a imunomarcagem dessas células. Desta forma, obter-se-á o número de neutrófilos e de linfócitos por campo e total da lâmina, além da razão neutrófilos/linfócitos nos tumores.

Análise estatística

Os resultados do estudo serão organizados em um banco de dados do programa STATA® 11.0 (College Station, Texas, USA), para realização das análises estatísticas. Será realizada análise descritiva, bem como testes comparativos entre as variáveis estudadas:

- Presença de BT e sua gradação nos espécimes,
- Contagem de neutrófilos e linfócitos e a razão neutrófilos linfócitos (RNL) no tumor em suas diferentes regiões, FIT e lâmina própria do epitélio adjacente à lesão;
- Associação entre a presença de BT com o grau histológico de malignidade (GHM) dos casos de CEC de lábio inferior na região do FIT;
- Relação entre a presença de BT e a contagem de neutrófilos e linfócitos, bem como com a RNL, nas diferentes regiões avaliadas.

2.6 Orçamento*

Anticorpos

CD66b.....	R\$ 900,00
CD45RO.....	R\$ 764,50
AE1/AE3.....	R\$ 850,00
<i>Subtotal.....</i>	<i>R\$ 2.514,50</i>
Kit de detecção Starr Trek Universal HRP.....	R\$ 1.006,00
Total.....	R\$ 3.520,50

*O projeto será financiado pelo Auxílio Casadinho/Procad, Chamada Pública MCT/CNPq/MEC/CAPES - Ação Transversal nº 06/2011 - Casadinho/Procad, processo no. 552662/2009-9, sob a coordenação da Profa. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio e também por meio do Programa Nacional de Cooperação Acadêmica. A UFPel/RS e a UFMG/MG são parceiras no Programa Casadinho-Procad e a coordenadora desse projeto, Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar, é membro do corpo docente da universidade mineira.

2.7 Cronograma

[illegible]

3 Relatório do trabalho de campo

O presente projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (CEP/FO-UFPel/RS), obtendo aprovação no dia 30 de junho de 2015 sob número 1.143.507 (Apêndice A).

A seguir serão relatadas algumas complementações e alterações realizadas no projeto de pesquisa:

Em relação ao título

Foi modificado de “Avaliação da participação de neutrófilos e linfócitos na patogênese do carcinoma espinocelular de lábio inferior: Análise Imunoistoquímica” para “Avaliação imunoistoquímica de neutrófilos e linfócitos no fronte invasivo do carcinoma espinocelular de lábio inferior”, uma vez que esse atende melhor ao que foi proposto e efetivamente realizado no trabalho.

Em relação à justificativa

Acreditamos que a melhor justificativa para o presente trabalho seria: “O carcinoma espinocelular (CEC) de lábio apresenta um comportamento mais favorável que os CECs intraorais, com bons índices de sobrevida e baixo índice de metástases regionais e sistêmicas. Apesar de algumas características específicas relacionadas principalmente à localização da lesão, parecem faltar dados que expliquem adequadamente este comportamento principalmente diante da rica rede linfática que drena o lábio inferior e que poderia levar facilmente ao espalhamento da lesão. Diante disso, a avaliação de características presentes nos tumores intraorais, e relacionadas ao pior prognóstico destas lesões, merecem também ser avaliadas nos CECs de lábio”.

Em relação à imunoistoquímica

-Utilizou-se o anticorpo CD3 ao invés do CD45RO, devido a sua especificidade por linfócitos T. Além disso, soluções prontas para uso fornecidas pelo Kit Spring (BioScience, SPB-999, Pleasanton, Califórnia, EUA) foram utilizadas para o bloqueio da peroxidase endógena e de proteínas e como sistema de detecção;

-Optou-se por não mais avaliar a lâmina própria do epitélio adjacente à lesão, já que a mesma não se configurava em um bom controle negativo para o estudo, pois podia apresentar alterações iniciais do processo de carcinogênese. Além disso, em muitas amostras este componente era pouco extenso, o que dificultaria a análise.

Em relação à contagem de células CD66b⁺ e CD3⁺

Optou-se pela análise semi-quantitativa, pois apesar de discussões na literatura quanto a sua utilização, a mesma foi empregada em trabalhos importantes na área, como os desenvolvidos por Caldeira, Sousa, Aguiar (2015), Silveira et al. (2010) e Zhao et al. (2012). O estudo de Caldeira, Sousa, Aguiar (2015) foi utilizado como referência para o desenvolvimento da metodologia do presente trabalho.

É importante salientar que o presente trabalho está apresentado de acordo com o nível de descrição em artigos previsto no Manual de Normas para Teses, Dissertações e Trabalhos Acadêmicos da Universidade Federal de Pelotas (2013). O referido manual está disponível no seguinte endereço eletrônico: http://sisbi.ufpel.edu.br/arquivos/PDF/Manual_Normas_UFPel_trabalhos_acad%C3%AAmicos.pdf

4. Artigo¹

Neutrophils and lymphocytes in the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma

Karine Duarte da Silva¹, Alessandro Menna Alves¹, Ana Paula Neutzling Gomes¹, Maria Cássia Ferreira de Aguiar², Sandra Beatriz Chaves Tarquinio^{1*}

¹ Department of Semiology and Clinics, Dentistry School, Federal University of Pelotas, Pelotas-RS, Brazil

² Department of Oral Pathology, Dentistry School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brazil

***Corresponding author:** Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Odontologia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Rua Gonçalves Chaves, 457, Centro, CEP: 96015-560, Pelotas-RS, Brasil.

E-mail addresses: sbtarquinio@gmail.com (S.B.C. Tarquinio); karineduardedasilva1@gmail.com (K.D. da Silva); menna.odonto@gmail.com (A.M. Alves); apngomes@gmail.com (A.P.N. Gomes); cassiafaster@gmail.com (M.C.F. de Aguiar)

¹ Este trabalho será submetido para a revista *Experimental and Molecular Pathology* e está formatado conforme as normas da mesma.

Abstract

Patients with lip squamous cell carcinoma (LSCC) present a more favorable prognosis compared to those with intraoral lesion. Analysis of tumor budding (TB) and inflammatory infiltrate in the tumoral invasive front (TIF) can be configured as additional prognostic factors, since TB positive, high counting of neutrophils in the tumor, blood, or both, and increased neutrophils/lymphocytes ratio (NLR) represent a worse prognosis for patients with intraoral SCC. The aim was to evaluate the presence and the NLR in the TIF and the association of these findings with the histological malignancy grading (HMG) of tumors and the TB in a LSCC sample. The files from a reference center of oral diseases were reviewed searching specimens from excisional biopsies of lower LSCC (LLSCC) and classifying them according to a HMG system. Immunohistochemistry was performed with CD66b and CD3 antibodies for evaluation of neutrophils and lymphocytes, respectively. The AE1/AE3 antibody was used for the identification of BT. CD66b⁺ neutrophils and CD3⁺ lymphocytes were analyzed semi-quantitatively in the TIF. From a total of 43 cases, 36 (83.7%) represented well differentiated tumors and 32 (74.4%) showed none TB. There were low neutrophils and high lymphocytes infiltrations (indexes 0.8 and 2.0, respectively) in the TIF, leading to a low NLR in the same region. Therefore, the low NLR in the TIF, the few BT positive cases and the high differentiation grading of tumors may be associated with better prognosis in LLSCC.

Keywords: squamous cell carcinoma; neutrophils; lymphocytes; inflammation; prognosis; tumor budding

Introduction

Lip cancer, especially in lower lip, is represented mostly by squamous cell carcinoma (SCC) (Silveira et al., 2010; Zini, Czerninski, Sgan-Cohen, 2010). It has remarkable prevalence in parts of Australia, Europe, USA and Brazil, mainly among fair-skinned people who work in outdoor places and are chronically exposed to the sun (Abreu et al., 2009; Domínguez-Gordillo et al., 2015; Koutros et al., 2010; Osterne et al. 2011).

Patients with lip squamous cell carcinoma (LSCC) have 5-years disease-free survival rates that can reach 100% for initial cases, therefore more favorable than for intraoral cases (Bhandari et al., 2014; Xie et al., 2015). The labial site for SCC provides frequently early diagnosis of the lesions and facilitates broad surgical treatment, being associated with better prognosis (Rena et al., 2014; Sena et al., 2010). These features however, are not enough to explain the low rates of metastasis although the rich vascularization of the lower lip (Domínguez-Gordillo et al., 2015; Sollamo et al., 2015). Studies to unravel this intriguing behavior are desirable.

Some histomorphologic features are useful in predicting the prognosis of carcinomas. Tumor budding (TB) are clusters (buds) of malignant cells localized not only in the tumoral invasive front (TIF), most invasive neoplasm area, but also in intratumor areas or scattered distributed by the surrounding tissues. TB has been associated to an increased potential for tumor spreading and metastasis (Marangon Junior et al., 2014; Wang et al., 2011).

Further, the histological malignancy grading (HMG) restricted to the invasive front, proposed by Bryne et al. (1992) can be used to classified the patients into a good, moderate or poor prognosis. In this grading system, a greater intensity of inflammatory infiltrate is considered beneficial to the patient and associated with a low grade of malignancy. However, more recent studies have showed that the inflammatory infiltrate may have antitumor and pro-tumor roles, in opposition to the classical view which assume that the inflammatory cells participate only in the host defense against cancer (Galdiero et al., 2013; Houghton, 2010; Souto, 2011).

Among the components of the inflammatory infiltrate in relation to malignant human neoplasms, neutrophils should be further investigated (Donskov, 2013). TANs (tumor-associated neutrophils) may be involved in the initiation, angiogenesis, invasion, progression and cancer dissemination (Donskov, 2013; Fridlender et al., 2009). Its function is modulated by a number of chemokines and cytokines produced by tumor cells (Houghton, 2010; Tecchio et al., 2013).

Moreover, the immunosuppression related to the degranulation and release of Arginase-1 by neutrophils, a T cell function inhibitor, has been reported for TANs (Dumitri et al., 2013; Tecchio et al., 2013). These cells may influence the recruitment and function of CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes and the function of neutrophils can be modulated by T lymphocytes, revealing the interaction that can occur between these cells in the tumor microenvironment (Carus et al., 2013; Millrud et al., 2012; Trellakis et al., 2011).

Studies in many types of cancers, including oral cancer, showed that unfavorable clinical outcomes, unsatisfactory results in the treatment and poor survival were associated with the high neutrophils/lymphocytes ratio (NLR), considering blood, tumor or both (He et al., 2012; Ilie et al., 2012; Perisanidis et al., 2013). These findings have revealed the involvement of these inflammatory cells in the oral carcinogenesis, stimulating researches in this field.

Therefore, the aim of this study was to evaluate the presence of these cells and the NLR, as well as its association with the HMG and TB in a LSCC sample.

Materials and Methods

Samples

This study was approved by the Research Ethics Committee of Dentistry School of Federal University of Pelotas (protocol #1143507). Specimens were recovered from the files of Diagnosis Center of Oral Diseases of the Federal University of Pelotas, and constitute convenience samples (Freitas et al., 2011; Marangon Junior et al., 2014; Souza et al., 2010). Only lower LSCCs (LLSCCs) excisional biopsies specimens were included in this study. Individuals reporting use immunosuppressive medications were excluded. Clinical data of patients were obtained from the biopsy records accompanying the specimens.

Histopathological grading of LSCC samples

The histopathological grading was performed on slides stained with haematoxylin and eosin (H&E) by an experienced oral pathologist (M.C.F.A) and a master's student in Oral Pathology (K.D.S), properly trained for such analysis, in a two headed optical microscope (Zeiss Axiostar Plus, Ser. 3109007734, Oberkochen, Deutschland). When they disagree, the cases were discussed until obtaining a consensus. The criteria used were those proposed by Bryne et al. (1992). At this point in the study, the evaluators were blinded in respect to the clinical characteristics of the lesions.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical technique was carried out for the identification of neutrophils, lymphocytes and cytokeratin, using the antibodies CD66b (1:600, clone GF10F5; BD Biosciences, San Diego, California, USA, code 555723), CD3 (1:200, clone F7.2.38; Dako Cytomation, Glostrup, Denmark, code M7254) and the pancytokeratin (1:100, clone AE1/AE1, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark, code M3515), respectively. Sections were deparaffinised in xylol and hydrated in an ethanol solution. For the first two, antigen retrieval was performed with a TRIS–EDTA solution (pH 9.0) in a 96 °C water bath for 20 min. For AE1/AE3, the antigen retrieval was conducted using citric acid solution (pH 6.0) in a 96 °C water bath for 30 min. The hydrogen peroxide blocking, protein blocking, and detection steps were performed with ready-to-use solutions provided in the kit (Spring BioScience, SPB-999, Pleasanton, California, USA). The reaction was revealed with 3,3'-diaminobenzidine (Spring BioScience, code DAB-999, Pleasanton, California, USA), and Harris's haematoxylin was used for the counterstaining. Appropriate positive controls were included.

Evaluation of immunohistochemistry

One observer (K.D.S) evaluated all cases using an eyepiece grid coupled to an optical microscope (Zeiss Axiostar, Ser. 48824, Oberkochen, Deutschland). Intravascular neutrophils and lymphocytes were not counted. Necrotic areas or artifacts were ignored. Semi-quantitative analysis was performed based on Caldeira et al. (2015). Infiltrate were counted in five consecutive non-overlapping high-power fields (400x magnification) in the TIF and positivity was graded as 0 (no staining in relation

to total infiltrate), 1 (1–25% of positive cells), 2 (>25–50%), and 3 (>50%). The mean value of the scores from the five fields was set as the CD66b and CD3 index of staining for each case. The CD66b/CD3 ratio (NLR) was obtained. Concordance with an oral pathologist (P.C.C) was done for a representative sample (ten cases), with Intraclass Correlation Coefficient value of 0,867 for neutrophils and 0,899 for lymphocytes.

The analysis of TB and Bryne's gradation were performed by the same two evaluators (M.C.F.A and K.D.S) in the same microscope. For TB, first, the hot spot area of the slide that contained the largest number of buds was identified (100x magnification). TB was considered present when there were isolated cells or small clusters of up to four cells totaling at least five buds in a field (200x magnification) (Marangon Junior et al., 2014; Wang et al., 2011).

Statistical analysis

Statistical tests were performed using SPSS® version 22.0 for Windows. Firstly, the Shapiro–Wilk normality test was applied. The absolute and relative frequencies were estimated with descriptive analysis. Comparisons of Bryne's parameters and tumor size with TB (absence vs. presence) were performed with the Pearson χ^2 test. Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to compare CD66b⁺ and CD3⁺ indexes and the CD66b/CD3 ratio with groups of TB and parameters status (Bryne et al., 1992). For all the tests, a p value of less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

The clinical and pathological features of 43 patients can be observed in the Table 1.

In relation to clinical stage, only the tumor size could be recovered, since in most cases there was no information regarding the parameters N (lymph node metastasis) and M (distant metastasis) in the files.

The immunohistochemical analysis of CD66 and CD3 was restricted to the TIF, however, when the entire neoplasm was viewed, the region which exhibited greater infiltration of inflammatory cells (hot spot) was coincident with the TIF.

This analyses showed that neutrophils represented 0-25% of total inflammatory infiltrate in most cases 34 (79.08%), while in 28 cases (65.12%) lymphocytes showed

immunostaining higher percentages, considering the whole inflammatory infiltrate, such as 25 up to 50% and higher than 50%. Regarding the means indexes of those cells, the neutrophils presented median index of 0.80 (min 0.0; max 2.40) and lymphocytes 2.0 (min 0.0; max 3.0). Immunostaining of these cells can be seen in Figures 1 and 2.

With respect to the NLR, it was observed that in 38 cases (88.36%) the percentage of CD66b⁺ neutrophils was lower than that of CD3⁺ lymphocytes, therefore the median index for this parameter was 0.4 (min 0.0; max 2.40).

TB was present in 11 (25.6%) and absent in 32 (74.4%) cases. There was no statistically significant association between this variable and the CD66b⁺ neutrophils and CD3⁺ lymphocytes cells counting. NLR was not associated with the TB ($p \geq 0.05$). Moreover, there was a statistically significant association between pattern of invasion and presence of TB, when assessed individually the features of the system proposed by Bryne et al. (1992) ($p = 0.025$).

Respecting to the HMG of the tumors according to Bryne's system, the majority of the cases were well-differentiated tumors (Table 2).

Table 3 shows how the Bryne's system parameters are related to the median indexes of CD66b⁺ and CD3⁺ cells. There was no association between the positivity of CD66b and CD3 cells and the total malignancy score ($p \geq 0.05$). However, there was a statistically significant association between lymphoplasmocytic inflammatory infiltrate and CD3⁺ cell counting ($p = 0.027$).

Discussion

The low NLR, the few TB positive cases and the high differentiation grading observed in the majority of LLSCCs samples in our study seem to agree with the better behavior of LSCCs when compared with the intraoral tumors.

Many studies showed the association of a high NLR with features of aggressiveness in different cancers. Millrud et al. (2012) and Trellakis et al. (2011) found higher blood leucocytes and neutrophil counts, as well as higher NLR, when they compared head and neck SCC patients with the control group. Trellakis et al. (2011) showed that those increased levels (mainly CD66b⁺ neutrophils) were associated to

the bigger sized tumors (especially T4 lesions), which had also lymph node involvement.

The LSCCs generally are diagnosed when they have small sizes (Bhandari et al., 2014; Rena et al., 2014). In the present study 30 samples (69.8%) were T1 LLSCCs and 34 (79.1%) had no significant percentages of polymorphonuclear neutrophil cells, averaging between 0-25% of the total inflammatory infiltrate.

In accordance with Carus et al. (2013), we believe that more studies are necessary to evaluate the neutrophilic activity in the peritumoral areas, since these regions are the most invasive part of the neoplasms and could demonstrate different immunoprofiles, comparing with the central portion of the tumors (Bryne et al., 1989; Bryne et al., 1992). The semi-quantitative method used in this study, even though being a target of controversial opinions about its utilization (Leong et al., 2010), has been used in important researches in this field (Caldeira et al., 2015; Silveira et al., 2010; Zhao et al., 2012).

Carus et al. (2013) identified high CD66b⁺ peritumoral neutrophil counting when evaluated 101 individuals with focal uterine cervix cancer. Besides the low CD8⁺ peritumoral lymphocytes and lymph node metastasis, CD66b⁺ counting was an independent prognostic factor for the short survival rates. Moreover, these authors found that the lower NLR ratio improved the 5-years disease-free survival rate. However, they emphasized the necessity of further studies in more representative and independent populations.

One of the probable mechanisms of pro-tumoral function of the neutrophils was studied by Glogauer et al. (2015), analyzing cell lines of neutrophils and two OSCC tumors in invasion assays. They concluded that neutrophils could increase the ability of the tumor cells in promoting invasion and that it was dependent of the neutrophil/tumoral cell ratio, being more effective in the proportion of 4:1. This effect, according to the authors, does not need the cell-cell contact and could occur in the absence of other stimuli. These findings could explain in part the less aggressive profile of the LLSCC samples in the present study.

It is known that some cells like the TANs can have a double phenotype in tumors, demonstrating anti and pro-tumoral activities (Fridlender et al., 2009; Houghton, 2010). Although this evaluation was not performed in the present study, we believe that the neutrophilic inflammatory infiltrate in our LLSCC samples could

present a beneficial profile, in accordance with the better prognosis for tumors in the lower lip site (Bhandari et al., 2014; Silveira et al., 2010), like it is showed in our study.

Silveira et al. (2010) confirmed the favorable profile of the LSCCs, in regarding to the prognosis, analyzing the inflammatory infiltrate role in these tumors. They found higher CD8⁺ and CD25⁺ cells counting in LSCCs, comparing with lesions located in tongue. In the present study, it was observed high CD3⁺ lymphocyte counts, which we attributed to their protective effect in the tumors, corroborating the Bryne' hypothesis for the role of the lymphocytic infiltrate. In the same manner, the NLR was not increased, which is probable a good point for our LLSCC cases, in terms of prognosis.

CD3⁺ cell counting had statistically significant association with the inflammatory infiltrate of lymphocytes and plasma cells parameter of Bryne's system. It is important to highlight that in our study the plasma cells were identified only by their morphological features in H&E staining, and we did not count these cells. However, we could realize their abundance in some cases. We speculate that the marked infiltration of these two mononuclear cells may contribute for a more favorable prognosis in our sample, like is for OSCC according to Bryne et al. (1992).

The presence of TB is associated with poor prognosis in several types of cancers (Almangush et al., 2015; Mitrovic et al. 2012; Wang et al., 2011). To the best of our knowledge, it is the first study that analyses the TB in LSCC, demonstrating the low expression of this feature in the sample.

According to Mitrovic et al. (2012) TB evaluation is sometimes difficult, when using routine staining, since some stromal cells like fibroblasts can be misunderstood with them. Therefore, immunohistochemistry technique for cytokeratin collaborates in this analysis (Marangon Junior et al., 2014; Mitrovic et al., 2012).

Wang et al. (2011) revealed positive association between the presence of TB and the parameters of tumor size, clinical staging, histological differentiation grade, lymph node metastasis and low survival rates in tongue OSCC. The present work did not evaluate all of these parameters, but it was found statistically significant association between the invasion pattern (Bryne et al., 1992) and the presence/absence of TB ($p=0,025$). This fact suggests that morphological analysis of the invasion pattern of the tumor *per si* could be sufficient and sensible to assist in the evaluation of the prognosis, suppressing the TB identification, especially in the analysis of small samples, when the TB could not be identified; however other studies are need to confirm our observation.

It is fundamental to highlight, as affirmed by Bryne et al. (1998), that the LSCC samples from excisional biopsies are a good material for the histological grading, since they provide a greater area for analysis. Moreover, we decided to use the method proposed by Bryne et al. (1992), once we agree that the relationship between host and tumor is important (Bryne et al., 1989; Bryne et al., 1992).

In relation to the HMG for the studied LLSCC tumors, our findings are in accordance with the literature, showing a less aggressive behavior (Sena et al., 2010; Silveira et al., 2010). Silveira et al. (2010) found that 65% of the cases were classified as low malignant ones, even using the criteria determined by Bryne et al. (1992).

Further, our results may explain in part the low rates of local and systemic metastasis in LSCC observed in the literature, despite the rich local vascularity (Domínguez-Gordillo et al., 2015; Sollamo et al., 2015), whereas the absence of TB and the low infiltration of neutrophils in the TIF can disadvantage the process of metastasis. However, more studies are needed in this field, since we did not evaluate the occurrence of metastasis.

In addition, the classic pattern of occurrence for LLSCC was confirmed in our samples, with higher prevalence in males, individuals aged over 40 years-old, white-skinned and predominance in workers exposed chronically to the sunlight (Abreu, Kruger, Tenant, 2009; Domínguez-Gordillo et al., 2015; Osterne et al., 2011).

Considering that the study is a retrospective analysis, loss of information such as those related to size of the lesions, clinical aspects and evolution time in some cases are expected. However, in accordance with our aims, these facts definitely did not affect the final results.

Even though 90% of the oral cancers are OSCC tumors with morphological similarities, the biological behavior of these neoplasms can vary considerably (Silveira et al., 2010). Thus, the fact of our sample is from a diagnosis center, not a therapeutic center for OSCC, can explain the low prevalence of more aggressive cases. In this way, probably studies including OSCC with these characteristics are needed to be confirmed the present results.

Therefore, studies about the role of the immune system in OSCC are very important in order to better understand the mechanisms involved in the behavior of this disease, and contributes in the development of new therapies or to optimize the existent treatments (Silveira et al., 2010). In this context, the use of an old and simple

tool such as immunohistochemistry can be relevant in the prognosis evaluation of OSCC lesions, like in the present analysis of LLSCCs.

Conclusions

The favorable prognosis of LLSCC cases can be partly explained by the low CD66b⁺ neutrophils/CD3⁺ lymphocytes ratio in the TIF, the few BT positive cases and the high differentiation grading of tumors. However, more studies including specific LLSCC with high HMG or aggressive behavior are further desirable.

Table 1. Descriptive analysis of the clinical and pathological characteristics of the sample (n=43).

Characteristics	n (%)	Characteristics	n (%)
Sex		Size⁴	
Female	11 (25.6)	T1 (up to 2cm)	30 (69.8)
Male	32 (74.4)	T2 (>2-4)	6 (14)
Age¹		T3 (>4cm)	2 (4.7)
<40 years	2 (4.7)	Clinical aspect⁵	
40-60 years	16 (37.2)	Erythroplakia	2 (4.7)
>60 years	23 (53.5)	Ulcer	33 (76.7)
Skin color^{2,*}		Associated aspects**	4 (9.3)
White	40 (93)	Evolution time⁶	
Non-white	0 (0)	0-6 months	13 (30.2)
Occupation³		6-12 months	6 (14)
Indoor	7 (16.3)	>12 months	11 (25.6)
Outdoor	24 (55.8)		
Retired	8 (18.6)		

¹⁻⁶Not recovered, respectively, 2 (4.7%), 3 (7%), 4 (9.3%), 5 (11.6%), 4 (9.3%) and 13 (30.2%) cases.

*Professional's perception.

**Erythroplakia+ulcer; ulcer+leukoplakia.

Table 2. Descriptive analysis of the histological classification (Byrne et al., 1992) applied to the sample (n = 43).

Parameters	n (%)
Total malignancy score¹	
Good prognosis	36 (83.7)
Moderate prognosis	7 (16.3)
Degree of keratinization	
1	20 (46.5)
2	18 (41.9)
3	3 (7)
4	2 (4.7)
Nuclear pleomorphism²	
1	24 (55.8)
2	18 (41.9)
3	1 (2.3)
Pattern of invasion²	
1	12 (27.9)
2	21 (48.8)
3	10 (23.3)
Inflammatory cell infiltration²	
1	26 (60.5)
2	16 (37.2)
3	1 (2.3)

¹There were no cases with poor prognosis.

²The degree 4 did not occur for these features.

Table 3. Relationship between histological parameters (Byrne et al., 1992) of the LLSSC cases and the CD66b⁺ and CD3⁺ cells count in the TIF (Kruskal-Wallis test).

	CD66b ⁺	p value	CD3 ⁺	p value
	Median		Median	
Degree of keratinization		0,619		0,743
1	0.9 (0.0-2.4)		2.0 (0.0-3.0)	
2	0.9 (0.0-2.0)		1.9 (0.0-3.0)	
3	0.4 (0.0-1.0)		1.0 (1.0-2.8)	
4	1.1 (0.6-1.6)		2.5 (2.2-2.8)	
Nuclear pleomorphism		0,501		0,349
1	1 (0.0-2.0)		2.0 (0.0-3.0)	
2	0.8 (0.0-2.4)		1.9 (0.0-2.8)	
3	0.4*		1.0	
Pattern of invasion		0,504		0,81
1	0.9 (0.0-1.6)		2.0 (0.2-3.0)	
2	1.0 (0.0-2.0)		2.0 (0.0-3.0)	
3	0.6 (0.0-2.4)		1.8 (0.8-2.8)	
Inflammatory cell infiltration		0,318		0,027**
1	0.8 (0.0-2.4)		1.4 (0.0-3.0)	
2	1.0 (0.0-2.0)		2.4 (1.0-3.0)	
3	0.0*		2.8*	

*There was only one case.

**Statistically significant.

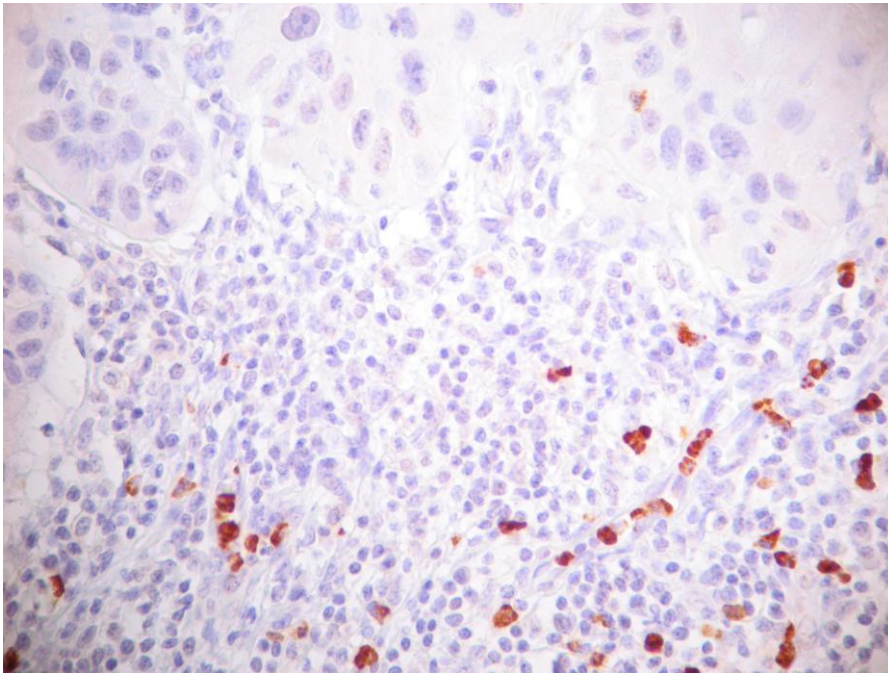


Figure 1. CD66b⁺ cells in the TIF. Cytoplasmic labeling (400x magnification).

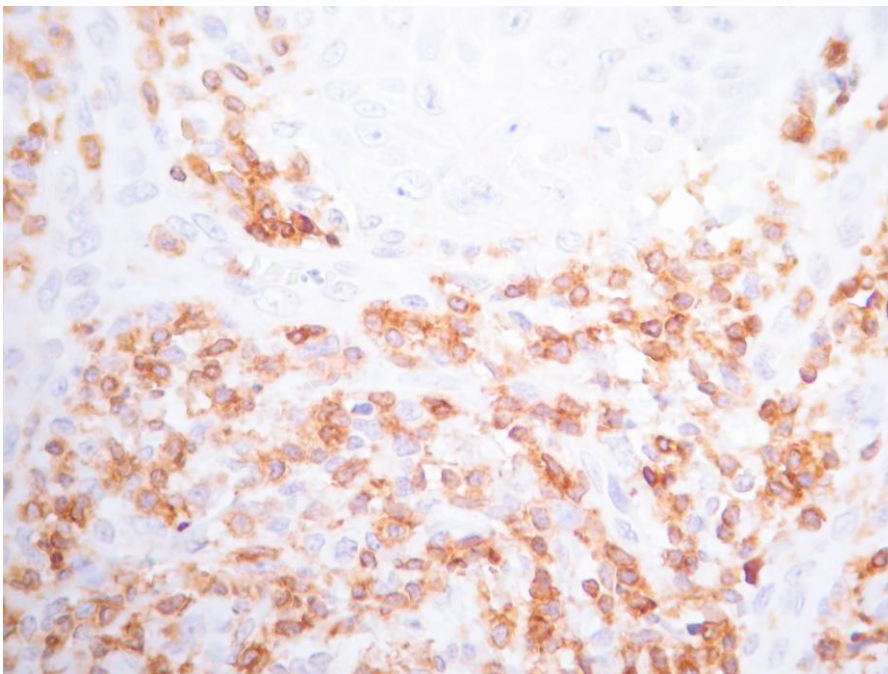


Figure 2. CD3⁺ cells in the TIF. Membranous labeling (400x magnification).

References

- ABREU, L.; KRUGER, E.; TENNANT, M. Lip cancer in Western Australia, 1982-2006: a 25-year retrospective epidemiological study. **Aust Dent J**, v.54, n.2, p.130-5, 2009 Jun. doi: 10.1111/j.1834-7819.2009.01105.x.
- ALMANGUSH, A. et al. Prognostic value of tumour budding in oesophageal cancer: a meta-analysis. **Histopathology**, 2015 Jul. doi: 10.1111/his.12781.
- BHANDARI, K. et al. Primary cN0 lip squamous cell carcinoma and elective neck dissection: Systematic review and meta-analysis. **Head and Neck**, v.37, n.9, p.1392-400, 2015 Sep. doi: 10.1002/hed.23772.
- BRYNE, M. et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med**, v.18, n.8, p.432-437, 1989 Sep.
- BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J Pathol**, v.166, n.4, p.375-81, 1992 Apr.
- 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 Jun.
- CALDEIRA, P.C.; SOUSA, A.A.; AGUIAR, M.C.F. Differential infiltration of neutrophils in T1–T2 versus T3–T4 oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. **BMC Res Notes**, v.8, n.569, 2015 Oct. doi:10.1186/s13104-015-1541-x.
- CARUS, A. et al. Tumour-associated CD66b⁺ neutrophil count is an independent prognostic factor for recurrence in localised cervical cancer. **Br J Cancer**, v.108, n.10, p.2116-22, 2013 May. doi: 10.1038/bjc.2013.167.
- DOMÍNGUEZ-GORDILLO, A. et al. The pattern of lip cancer occurrence over the 1990–2011 period in public hospitals in Madrid, Spain. **J Oral Pathol Med**, 2015 Aug. doi: 10.1111/jop.12340.
- DONSKOV, F. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. **Semin Cancer Biol**, v.23, n.3, p.200-7, 2013 Jun. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.02.001.
- DUMITRU, C.A.; LANG, S.; BRANDAU, S. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progression. **Semin Cancer Biol**, v.23, n.3, p.141-8, 2013 Jun. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.02.005.
- FREITAS, V.S. et al. Mast cells and matrix metalloproteinase 9 expression in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.112, n.3, p.342-348, 2011 Sep. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.02.032.

FRIDLENDER, Z.G. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. **Cancer Cell**, v.16, n.3, p.183-94, 2009 Sep. doi: 10.1016/j.ccr.2009.06.017.

GALDIERO, M.R. et al. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. **Immunobiology**, v.218, n.11, p.1402-1410, 2013 Jun. doi: 10.1016/j.imbio.2013.06.003.

GLOGAUER, J.E. et al. Neutrophils Increase Oral Squamous Cell Carcinoma Invasion through an Invadopodia-Dependent Pathway. **Cancer Immunol Res.**, v.3,n.11, p.1218-26, 2015 Jun. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0017.

HE, J.R. et al. Pretreatment levels of peripheral neutrophils and lymphocytes as independent prognostic factors in patients with nasopharyngeal carcinoma. **Head and Neck**, v.34, n.12, p.1769-76, 2012 Dec. doi: 10.1002/hed.22008.

HOUGHTON, A.M. The paradox of tumor-associated neutrophils: fueling tumor growth with cytotoxic substances. **Cell Cycle**, v.9, n.9, p.1732-7, 2010 May.

ILIE, M. et al. Predictive clinical outcome of the intratumoral CD66b-positive neutrophil-to-CD8-positive T-cell ratio in patients with resectable non small cell lung cancer. **Cancer**, v.118, n.6, p.1726-37, 2012 Mar. doi: 10.1002/cncr.26456.

LEONG, T.Y-M. et al. Immunohistology-Past, Present, and Future. **Adv Anat Pathol**, v.17, n.6, p.404-418, 2010 Nov. doi: 10.1097/PAP.0b013e3181f8957c.

KOUTROS, S. et al. An update of cancer incidence in the Agricultural Health Study. **J Occup Environ Med**, v.52, n.11, p.1098-105, 2010 Nov. doi: 10.1097/JOM.0b013e3181f72b7c.

MARANGON JUNIOR, H. et al. Laminin-5 gamma 2 chain expression is associated with intensity of tumor budding and density of stromal myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.43, p.199-204, 2014 Mar. doi: 10.1111/jop.12121.

MILLRUD C.R. et al. The activation pattern of blood leukocytes in head and neck squamous cell carcinoma is correlated to survival. **PLoS One**. v.7, n.12, p.e511-20, 2012 Dec. doi: 10.1371/journal.pone.0051120.

MITROVIC, B. et al. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. **Mod Pathol**, v.25, p.1315-1325, 2012 Oct. doi: 10.1038/modpathol.2012.94.

OSTERNE, R.L. et al. Lip lesions in a Brazilian population. **J Craniofac Surg**, v.22, n.6, p. 2421-5, 2011 Nov. doi: 10.1097/SCS.0b013e318232a7dc.

PERISANIDIS, C. et al. High neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent marker of poor disease-specific survival in patients with oral cancer. **Med Oncol**, v.30, n.1, p.334-41, 2013 Mar. doi: 10.1007/s12032-012-0334-5.

RENA, W. et al. Surgical management of Squamous Cell Carcinoma of the lower lip: An experience of 109 cases. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.19, n.4, p.e398-402, 2014 Jul. doi: 10.4317/medoral.19595.

SENA, M.F. et al. Avaliação dos Fatores Prognósticos Relacionados ao Câncer de Lábio: Revisão Sistemática. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.56, n.1, p.93-102, 2010.

SILVEIRA, E.J.D et al. Analysis of local immunity in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. **Exp Mol Pathol**, v.88, n.1, p.171–175, 2010 Feb. doi: 10.1016/j.yexmp.2009.11.009.

SOLLAMO, E.M.J. et al. Sentinel lymph node biopsy in cN0 squamous cell carcinoma of the lip: A retrospective study. **Head & Neck**, 2015 Oct. doi: 10.1002/hed.24230.

SOUTO, J.C.; VILA, L.; BRÚ, A. Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. **Med Res Rev**, v.31, n.3, p.311-63, 2011 May. doi: 10.1002/med.20185.

SOUZA, L.R. et al. Association of mast cell, eosinophil leucocyte and microvessel densities in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v.57, n.6, p.796-805, 2010 Dec. doi: 10.1111/j.1365-2559.2010.03721.x.

TECCHIO, C. et al. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. **Semin Cancer Biol**, v.23, n.3, p.159-70, 2013 Jun. doi: 10.1016/j.semcancer.2013.02.004.

TRELLAKIS, S. et al. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. **Int J Cancer**, v.129, n.9, p.2183-93, 2011 Nov. doi: 10.1002/ijc.25892.

WANG, C. et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.40, n.7, p.545-551, 2011 Aug. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01041.x.

XIE, L. et al. Facial lymph node involvement as a prognostic factor for patient survival in oral cavity squamous cell carcinoma. **Tumor Biol**, p.1-8, 2015 Oct.

ZHAO et al. The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Neutrophils in Gastric Adenocarcinoma after Resection, **Plos One**, v.7, n.3, p. e33655, 2012 Mar. doi:10.1371/journal.pone.0033655.

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, n.4, p.299-305, 2010 Apr. doi: 10.1111/j.1600-0714.2009.00845.x.

5 Considerações finais

O prognóstico favorável observado nos casos de carcinoma espinocelular (CEC) de lábio inferior, com baixa razão neutrófilos linfócitos no fronte invasivo tumoral, poucos casos exibindo *budding* tumoral positivo e alta diferenciação tumoral corroboram com o comportamento diferenciado das lesões nesse sítio em comparação ao CEC intraoral.

Nesse contexto, a análise imunoistoquímica mostrou-se uma ferramenta interessante, trazendo resultados importantes e revelando potencial para novas investigações.

Assim sendo, pesquisas em torno da participação de células inflamatórias na carcinogênese, em especial de lábio inferior, são relevantes e promissoras, visto que existem lacunas no conhecimento relacionado a esse assunto.

Referências

- ABREU, L.; KRUGER, E.; TENNANT, M. Lip cancer in Western Australia, 1982-2006: a 25-year retrospective epidemiological study. **Aust Dent J**, v.54, n.2, p.130-5, 2009 Jun.
- ALMANGUSH, A. et al. Prognostic value of tumour budding in oesophageal cancer: a meta-analysis. **Histopathology**, 2015 Jul.
- ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. **Scand J Dent Res**, v.95, n.3, p.229-49, 1987 Jun.
- BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral cancer: clinical features. **Oral Oncol**, v.46, n.6, p.414-7, 2010 Jun.
- BANDYOPADHYAY, R.; NAG, D.; BANDYOPADHYAY, S.K. Massive scapular metastasis as a presenting feature of carcinoma of the lip. **J Cancer Res Ther**, v.6, n.3, p.397-9, 2010 Jul.
- BHANDARI, K. et al. Primary cN0 lip squamous cell carcinoma and elective neck dissection: Systematic review and meta-analysis. **Head and Neck**, v.37, n.9, p.1392-400, 2015 Sep.
- BRANDWEIN-GENSLER, M. et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. **Am J Surg Pathol**, v.29, n.2, p.167-78, 2005 Feb.
- BRYNE, M. et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med**, v.18, n.8, p.432-437, 1989 Sep.
- BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J Pathol**, v.166, n.4, p.375-81, 1992 Apr.
- 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 Jun.
- CALDEIRA, P.C.; SOUSA, A.A.; AGUIAR, M.C.F. Differential infiltration of neutrophils in T1–T2 versus T3–T4 oral squamous cell carcinomas: a preliminary study. **BMC Res Notes**, v.8, n.569, 2015 Oct.
- CAMISASCA, D.R. et al. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features in patients with and without recurrence. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec**, v.73, n.3, p.170-6, 2011 May.

CARUS, A. et al. Tumour-associated CD66b⁺ neutrophil count is an independent prognostic factor for recurrence in localised cervical cancer. **Br J Cancer**, v.108, n.10, p.2116-22, 2013 May.

CHAFFER, L.C.; WEINBERG, R.A. A Perspective on Cancer Cell Metastasis. **Science**, v.331, n.6024, 2011 Mar.

CHATZISTAMOU, I. et al. Prognostic significance of tumor shape and stromal chronic inflammatory infiltration in squamous cell carcinomas of the oral tongue. **J Oral Pathol Med**, v.39, n.9, p.667-71, 2010 Oct

CHO, H. et al. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio is elevated in epithelial ovarian cancer and predicts survival after treatment. **Cancer Immunol Immunother**, v.58, p.15-23, 2009 Jan.

DA-SILVA, J.P. et al. Expression of laminin-5 and integrins in actinic cheilitis and superficially invasive squamous cell carcinomas of the lip. **Pathol Res Pract**, v.208, n.10, p.598-603, 2012 Oct.

DOMÍNGUEZ-GORDILLO, A. et al. The pattern of lip cancer occurrence over the 1990–2011 period in public hospitals in Madrid, Spain. **J Oral Pathol Med**, 2015 Aug.

DONSKOV, F. Immunomonitoring and prognostic relevance of neutrophils in clinical trials. **Semin Cancer Biol**, v.23, n.3, p.200-7, 2013 Jun.

DUMITRU, C.A.; LANG, S.; BRANDAU, S. Modulation of neutrophil granulocytes in the tumor microenvironment: mechanisms and consequences for tumor progression. **Semin Cancer Biol**, v.23, n.3, p.141-8, 2013 Jun.

FREITAS, V.S. et al. Mast cells and matrix metalloproteinase 9 expression in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.112, n.3, p.342-348, 2011 Sep.

FRIDLENDER, Z.G. et al. Polarization of tumor-associated neutrophil phenotype by TGF-beta: "N1" versus "N2" TAN. **Cancer Cell**, v.16, n.3, p.183-94, 2009 Sep.

GALDIERO, M.R. et al. Tumor associated macrophages and neutrophils in cancer. **Immunobiology**, v.218, n.11, p.1402-1410, 2013 Jun.

Global Burden of Disease Cancer Collaboration. The Global Burden of Cancer 2013. **JAMA Oncol**, v.1, n.4, p.505-527, 2015.

GREENE, Frederick et al. **AJCC cancer staging manual**. 6 ed. New York: Springer, 2002. 195 p.

GLOGAUER, J.E. et al. Neutrophils Increase Oral Squamous Cell Carcinoma Invasion through an Invadopodia-Dependent Pathway. **Cancer Immunol Res.**, v.3,n.11, p.1218-26, 2015 Jun.

GREGORY, A.D.; HOUGHTON, A.M. Tumor-Associated Neutrophils: New Targets for Cancer Therapy. **Cancer Res**, v.71, n.7, p.2411–6, 2011 Apr.

GRIZZI, F. et al. Tumor budding as a potential histopathological biomarker in colorectal cancer: Hype or hope? **World J Gastroenterol**, v.18, n.45, p.6532-6536, 2012 Dec.

HE, J.R. et al. Pretreatment levels of peripheral neutrophils and lymphocytes as independent prognostic factors in patients with nasopharyngeal carcinoma. **Head and Neck**, v.34, n.12, p.1769-76, 2012 Dec.

HOMMA, I. et al. Severe tumor budding is a risk factor for lateral lymph node metastasis in early rectal cancers. **J Surg Oncol**, v.102, n.3, p.230-234, 2010 Sep.

HOUGHTON, A.M. The paradox of tumor-associated neutrophils: fueling tumor growth with cytotoxic substances. **Cell Cycle**, v.9, n.9, p.1732-7, 2010 May.

IARC-INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (GLOBOCAN 2012). Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

ILIE, M. et al. Predictive clinical outcome of the intratumoral CD66b-positive neutrophil-to-CD8-positive T-cell ratio in patients with resectable non small cell lung cancer. **Cancer**, v.118, n.6, p.1726-37, 2012 Mar.

INCA-INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em 27 out. 2015.

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

JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2009. **CA Cancer J Clin**, v.59, n.4, p.225-49, 2009 Jul-Aug.

LEONG, T.Y-M. et al. Immunohistology-Past, Present, and Future. **Adv Anat Pathol**, v.17, n.6, p.404-418, 2010 Nov.

LIANG, F. The prognostic value of tumor budding in invasive breast cancer. **Pathol Res Pract**, v.209, p.269-275, 2013 May.

MANTOVANI, A.; SICA, A., 2010. Macrophages, innate immunity and cancer: balance, tolerance, and diversity. **Curr Opin Immunol**, v.22, n.2, p.231-237, 2010 Apr.

MORODOMI, T. et al. An Index for Estimating the Probability of Lymph Node Metastasis in Rectal Cancers. **Cancer**, v.63, n.3, p.63539-543, 1989 Feb.

KARAMITOPOULOU, E. Tumour budding is a strong and independent prognostic factor in pancreatic cancer. **Eur J Cancer**, v.49, n.5, p.1032-1039, 2013 Mar.

KOUTROS, S. et al. An update of cancer incidence in the Agricultural Health Study. **J Occup Environ Med**, v.52, n.11, p.1098-105, 2010 Nov.

LARSEN, S.R. et al. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.38, n.8, p.657-62, 2009 Sep.

LUCENA, E.E.S. et al. Prevalence and factors associated to actinic cheilitis in beach workers. **Oral Dis**, v.18, n.6, p.575-9, 2012 Sep.

LUGLI, A. et al. Intratumoral budding as a potential parameter of tumor progression in mismatch repair-proficient and mismatch repair-deficient colorectal cancer patients. **Hum Pathol**, v.42, n.12, p.1833-1840, 2011 Dec.

MAASLAND, D.H.E. et al. Alcohol consumption, cigarette smoking and the risk of subtypes of head-neck cancer: results from the Netherlands Cohort Study. **BMC Cancer**, v.14, n.187, 2014 Mar.

MARANGON JUNIOR, H. et al. Laminin-5 gamma 2 chain expression is associated with intensity of tumor budding and density of stromal myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.43, n.3, p.199-204, 2014 Mar.

MILLER, R.T. et al. Blocking of Endogenous Avidin-Binding Activity in Immunohistochemistry: The Use of Skim Milk as an Economical and Effective Substitute for Commercial Biotin Solutions. **Appl Imm Mol Morphol**, v.7, n.1, p.63-65, 1999.

MILLRUD C.R. et al. The activation pattern of blood leukocytes in head and neck squamous cell carcinoma is correlated to survival. **PLoS One**. v.7, n.12, p.e511-20, 2012 Dec.

MITROVIC, B. et al. Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. **Mod Pathol**, v.25, n.10, p.1315-1325, 2012 Oct.

NEVILLE, Brad W. et al. **Patologia oral e maxilofacial**. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 972 p.

Organização Mundial de Saúde (OMS). BARNES Leon et al. **Pathology & Genetics. Head neck tumors**. Lyon: IARC Press, 2005. 430p.

OSTERNE, R.L. et al. Lip lesions in a Brazilian population. **J Craniofac Surg**, v.22, n.6, p. 2421-5, 2011 Nov.

PELLETIER, M.; MICHELETTI, A.; CASSATELLA, M.A. Modulation of human neutrophil survival and antigen expression by activated CD4+ and CD8+ T cells. **J Leukoc Biol**, v.88, n.6, p.1163-70, 2010 Dec.

PEREIRA, A.L.A. et al. Role of Integrins in the Carcinogenesis of Squamous Cell Carcinoma of the Tongue and Lower Lip. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v.21, n.2, p.154-158, 2013 Mar.

PERISANIDIS, C. et al. High neutrophil-to-lymphocyte ratio is an independent marker of poor disease-specific survival in patients with oral cancer. **Med Oncol**, v.30, n.1, p.334, 2013 Mar.

PUIGPINOS, R. et al. Trends in socioeconomic inequalities in cancer mortality in Barcelona: 1992-2003. **BMC Public Health**, v.9, v.35, 2009 Jan.

RAO, H.L. et al. Increased intratumoral neutrophil in colorectal carcinomas correlates closely with malignant phenotype and predicts patients' adverse prognosis. **PLoS One**, v.7, n.1, p.e30806, 2012 Jan.

RENA, W. et al. Surgical management of Squamous Cell Carcinoma of the lower lip: An experience of 109 cases. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.19, n.4, p.e398-402, 2014 Jul.

SALVADORI, G. et al. Ki-67, TGF- β 1, and elastin content are significantly altered in lip carcinogenesis. **Tumour Biol**, v.35, n.8, p.7635-44, 2014 Aug.

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

SCULLY, Crispian; MOLES, David R. Oral cancer. In: Encyclopedia of public health. Vol 4. San Diego, CA: Academic Press, 2008. P. 668–677.

SENA, M.F. et al. Avaliação dos Fatores Prognósticos Relacionados ao Câncer de Lábio: Revisão Sistemática. **Rev Bras Cancerol**, v.56, n.1, p.93-102, 2010.

SGARBI, F.C. et al. Morphology of collagen fibers and elastic system fibers in actinic cheilitis. **Indian J Dent Res**, v.21, n.4, p.518-22, 2010 Oct-Dec.

SILVEIRA, E.J.D et al. Analysis of local immunity in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. **Exp Mol Pathol**, v.88, n.1, p.171–175, 2010 Feb.

SYE, E. et al. Tumour budding correlates with local recurrence of rectal cancer. **Colorectal Dis**, v.13, n.3, p.255-62, 2011 Mar.

SOBIN, Leslie H.; GOSPODAROWICZ, Mary K.; WITTEKIND, Christian. **TNM classification of malignant tumors**. 7th ed. Oxford, UK: Wiley–Blackwell, 2009.336p.

SOLLAMO, E.M.J. et al. Sentinel lymph node biopsy in cN0 squamous cell carcinoma of the lip: A retrospective study. **Head & Neck**, 2015 Oct.

SOUTO, J.C.; VILA, L.; BRÚ, A. Polymorphonuclear neutrophils and cancer: intense and sustained neutrophilia as a treatment against solid tumors. **Med Res Rev**, v.31, n.3, p.311-63, 2011 May.

SOUZA, L.R. et al. Association of mast cell, eosinophil leucocyte and microvessel densities in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v.57, n.6, p.796-805, 2010 Dec.

SOUZA, R.L. et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.16, n.6, p.757-62, 2011 Sep.

TECCHIO, C. et al. On the cytokines produced by human neutrophils in tumors. **Semin Cancer Biol**, v.23, n.3, p.159-70, 2013 Jun.

TRELLAKIS, S. et al. Polymorphonuclear granulocytes in human head and neck cancer: enhanced inflammatory activity, modulation by cancer cells and expansion in advanced disease. **Int J Cancer**, v.129, n.9, p.2183-93, 2011 Nov.

WANG, C. et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.40, n.7, p.545-551, 2011 Aug.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**, v.45, n.4-5, p.309-16, 2009 Apr-May.

WÜSCH FILHO, V. et al. Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. **Rev Bras Epidemiol**, v. 13, n.2, p. 175-87, 2010.

XIE, L. et al. Facial lymph node involvement as a prognostic factor for patient survival in oral cavity squamous cell carcinoma. **Tumor Biol**, p.1-8, 2015 Oct.

ZHAO et al. The Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Neutrophils in Gastric Adenocarcinoma after Resection, **Plos One**, v.7, n.3, p. e33655, 2012 Mar.

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, n.4, p.299-305, 2010 Apr.

ZLOBEC, I; LUGLI, A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: Tumor budding as oncotarget. **Oncotarget**, v.1, n.7, p. 651-661, 2010 Nov.

Apêndice

Apêndice A

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação da participação de neutrófilos e linfócitos na patogênese do carcinoma espinocelular de lábio inferior: Análise Imunoistoquímica.

Pesquisador: Sandra Beatriz Chaves Tarquinio

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 44133615.2.0000.5318

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.143.507

Data da Relatoria: 30/06/2015

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O protocolo de pesquisa contempla, segundo a análise do CEP, os aspectos normativos fundamentais previstos no sistema CEP/CONEP e pelo CNS para sua aprovação.

PELOTAS, 08 de Julho de 2015

Assinado por:
Renato Waldemarin
(Coordenador)

Endereço: Rua Gonçalves Chaves, 457

Bairro: Centro

CEP: 96.015-560

UF: RS

Município: PELOTAS

Telefone: (53)3222-4439

Fax: (53)3222-4439

E-mail: cep.fop@gmail.com

Anexo

Anexo A - Sistema de gradação histológica de carcinoma espinocelular de boca
(Bryne et al., 1992)

Parâmetro Morfológico/Gradação	Valor 1	Valor 2	Valor 3	Valor 4
Grau de queratinização	Altamente queratinizado (acima de 50% das células)	Moderadamente queratinizado (entre 20 e 50% das células)	Queratinização mínima (entre 5 e 20% das células)	Queratinização ausente (entre 0 e 5% das células)
Pleomorfismo nuclear	Pequeno (acima de 75% de células maduras)	Moderado (entre 50 e 75% de células maduras)	Abundante (entre 25 e 50% de células maduras)	Extremo (entre 0 e 25% de células maduras)
Padrão de invasão	Expansivo, bordas tumorais amplas e bem delimitadas	Infiltrativo, feixes, bandas ou cordões sólidos	Cordões ou pequenos grupos com mais de 15 células	Células individuais ou pequenos grupos com menos de 15 células
Infiltrado inflamatório	Intenso	Moderado	Leve	Ausente

Escore total de malignidade:

Prognóstico bom: somatório dos quatro parâmetros com valor entre 4 e 8.

Prognóstico moderado: valor entre 9 e 12.

Prognóstico ruim: entre 13 e 16.