

AFONSO CELSO DE MORAES MANZANO

Este exemplar corresponde a versão final da
Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de
Pós-Graduação em Cirurgia da FCM/UNICAMP,
para obtenção do título de Mestre em Cirurgia do
Médico, **AFONSO CELSO DE MORAES
MANZANO**.

Campinas, 06 de agosto de 2001

Prof. Dr. ALFIO JOSÉ TINCANI – Orientador

***CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO
INFILTRADO LINFOCITÁRIO EM BIÓPSIA DE
CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LÍNGUA E SOALHO
ORAL E SUA IMPLICAÇÃO PROGNÓSTICA***

CAMPINAS

2001

i

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

AFONSO CELSO DE MORAES MANZANO

**CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO
INFILTRADO LINFOCITÁRIO EM BIÓPSIA DE
CARCINOMA ESPINOCELULAR DA LÍNGUA E SOALHO
ORAL E SUA IMPLICAÇÃO PROGNÓSTICA**

*Dissertação de Mestrado apresentada à
Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção do título de Mestre em Cirurgia,
área de Cirurgia.*

Orientador: Prof. Dr. Alfio José Tincani

Co-orientadora: Profa. Dra. Albina M. A. M. Altemani

CAMPINAS

2001

UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: T/UNICAMP
M319c
 V. Ex.
 TOMBO BC/ 47420
 PROC. 837/02
 C ☐ D ☒
 PREÇO R\$ 11,00
 DATA 04-02-02
 N.º CPD 4

CM00162957-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
 UNICAMP**

M319c

Manzano, Afonso Celso de Moraes

Caracterização imuno-histoquímica do infiltrado linfocitário em biópsia de carcinoma espinocelular da língua e soalho oral e sua implicação prognostica / Afonso Celso de Moraes Manzano. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores : Alfio José Tincani, Albina Messias de Almeida Milani Altemani

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Imunohistoquímica 2. Carcinoma. 3. Oral. I. Alfio José Tincani. II. Albina Messias de Almeida Milani Altemani. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador: Prof. Dr. Alfio José Tincani

Co-orientador: Profa. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani

Membros:

1.

Alfio José Tincani

2.

Albina Messias de Almeida Milani Altemani

3.

Curso de pós-graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 06/08/2001

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que me acompanharam nessa empreitada, em especial à minha querida esposa Rosana e aos meus filhos Vitor e Juliana.

Agradeço aos meus queridos pais pela vida que me proporcionam.

Aos saudosos mestres que, ao longo de minha vida, sempre me incentivaram, fazendo-me crer que eu era capaz.

À Profª. Dra. Albina Messias de Almeida Milani Altemani, cuja orientação foi fundamental para a realização desse trabalho, ressaltando o seu imenso espírito científico, didático e humano.

Ao Prof. Dr. Alfio José Tincani que se dispôs a orientar-me sempre com muito entusiasmo e otimismo.

Ao Prof. Dr. Antonio Santos Martins que me recebeu em seu Serviço.

Ao Prof. Dr. John Cook Lane que me concedeu o aval para que se efetivasse a matrícula no Curso de Pós-Graduação em Cirurgia.

Ao Prof. Dr. José Vassalo, chefe do Laboratório de Imuno-histoquímica da FCM da UNICAMP.

Ao Dr. Erwin Langner, ex-residente do Depto. de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital das Clínicas da UNICAMP, pelo auxílio no levantamento de prontuários.

Ao Sr. Amaury Roberto Dias, diretor do Serviço de Arquivo Médico (SAME), bem como aos seus funcionários, que me ajudaram no levantamento dos prontuários e microfilmes.

À bioquímica Marisa de Almeida Matsura pelo preciso e fundamental trabalho técnico de realização das reações imuno-histoquímicas.

À técnica de patologia Divani de Fátima de Almeida pela preparação e montagem das lâminas.

Ao estatístico Hélio José de Abreu, profundamente interessado na pesquisa sobre câncer bucal, pelo grande auxílio na análise dos resultados.

Aos pacientes, motivo principal da busca científica.

“Para o homem de grande visão, recolher o lixo das ruas não incomoda, pois ele sabe que isso faz parte da tarefa de tornar o planeta mais belo. Enquanto, para o homem de pouca visão tornar o planeta mais belo não fascina, pois ele sabe que esse desejo traz consigo o trabalho de recolher o lixo dos caminhos. Para criar um mundo onde as realizações sejam obras do coração, existe um caminho de desafios. A única maneira de ele ser superado com tranquilidade é olharmos para o objetivo, e não para os obstáculos.”

R. Shinyashiki

	PÁG.
RESUMO	xxv
1. INTRODUÇÃO	29
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	35
2.1. Aspectos históricos da imunologia do câncer da cavidade oral.....	37
2.2. Fatores prognósticos no câncer da cavidade oral.....	38
2.3. Fatores prognósticos relacionados ao tumor.....	40
2.3.1. Características histopatológicas.....	40
2.3.2. Morfometria celular.....	42
2.3.3. Conteúdo de DNA.....	42
2.3.4. Índices de proliferação celular.....	43
2.3.5. Marcadores celulares.....	43
2.3.6. Cromossomos, oncogenes e antioncogenes.....	44
2.3.7. Marcadores séricos.....	44
2.4. Fatores prognósticos relacionados ao hospedeiro.....	45
2.4.1. Fatores não imunológicos.....	45
2.4.2. Fatores imunológicos.....	45
2.5. Células da resposta imune.....	46
2.6. Morfologia dos linfócitos.....	46
2.7. Diferenciação entre linfócitos T e B.....	47
2.8. Marcadores de superfície dos linfócitos T.....	47

2.9. Diferenciação dos linfócitos pela imunoquímica.....	48
2.10. O infiltrado linfocitário no CEC da cavidade oral.....	49
2.11. Classificação TNM.....	52
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS.....	55
4. RESULTADOS.....	65
5. DISCUSSÃO.....	89
6. CONCLUSÕES.....	97
7. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	101
8. SUMMARY.....	105
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	109
10. ANEXOS.....	125

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCCS	“American Joint Commettee on Cancer Staging”
BSA	solução de albumina bovina
CD	grupo de anticorpos monoclonais (“cluster designation”)
CD31	marcador (molécula de superfície) de células do endotélio
CD4/CD8	proporção entre linfócitos CD4 e CD8
CD4	grupo de anticorpos monoclonais que reagem com a membrana de linfócitos auxiliares/indutores.
CD8	grupo de anticorpos monoclonais que reagem com a membrana de linfócitos citotóxicos/supressores.
CEC	carcinoma espinocelular
CED	paciente com evidência de doença
DAB	diaminobenzidina (cromógeno de cor marrom)
DMSO	dimetilsufoxide
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNCB	dinitroclorobenzeno
HCFCM	Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas
HCl	ácido clorídrico
HPV	vírus do papiloma humano
IgA	imunoglobulina tipo A
IL-2	interleucina-2
INCa	Instituto Nacional do Câncer
Inf. Infla.(Epit)	infiltrado inflamatório epitelial

Inf. Infla.(Intra)	infiltrado inflamatório peritumoral
Intra-tu.	intratumoral
Ki-67	marcador de proliferação celular
N	refere-se a “node” do estadiamento TNM
N+	presença de linfonodos regionais metastáticos
N0	refere-se à ausência de metástases cervicais
P53	gene supressor de tumor localizado no cromossomo 17
Pan-B (Intra)	infiltrado linfocitário B intratumoral
Pan-B (Peri)	infiltrado linfocitário B peritumoral
Pan-B	refere-se ao anticorpo marcador de células B empregado no estudo.
Pan-T (Epit)	infiltrado linfocitário T epitelial
Pan-T(Intra)	infiltrado linfocitário T intratumoral
Pan-T(Peri)	infiltrado linfocitário T peritumoral
Pan-T	refere-se ao anticorpo marcador de células T empregado no estudo.
PAP	complexo peroxidase antiperoxidase
PBS	solução tampão padrão
PCNA	antígeno nuclear de proliferação celular
Peri-tu.	peritumoral
pH	coeficiente proposto por Sørensen para indicar a concentração dos íons hidrogênio de uma solução aquosa
Razão CD4/CD8-Intra	razão entre o número de linfócitos CD4 e CD8 intratumoral.
Razão CD4/CD8-Peri	razão entre o número de linfócitos CD4 e CD8 peritumoral.

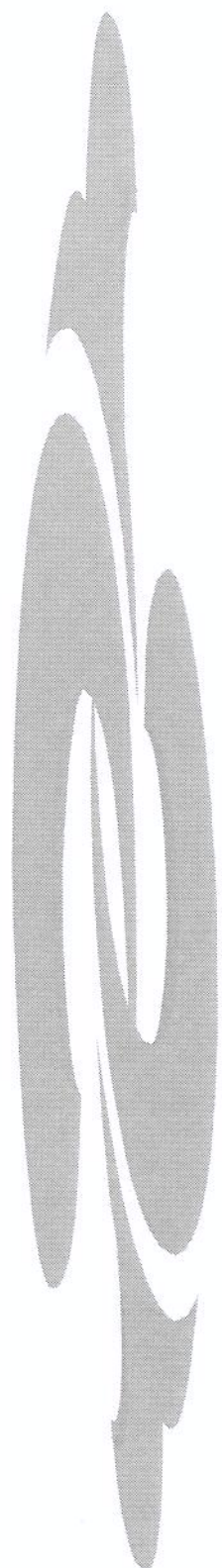
RCBP	Registro de Câncer de Base Populacional
SED	paciente sem evidência de doença
TCR	receptores antígeno-específicos que as células T utilizam para reconhecer os peptídeos antigênicos
TNM	classificação internacional de tumores malignos (T=tumor, N=linfonodo, M=metástase a distância).
UICC	União Internacional Contra o Câncer

Tabela 1:	Sistema de graduação de malignidade do CEC da cavidade oral conforme o grau histológico de malignidade da população de células tumorais (Fonte: ANNEROTH <i>et al.</i> , 1987).....	41
Tabela 2:	Sistema de graduação de malignidade do CEC da cavidade oral conforme o grau histológico de malignidade da interface tumor-hospedeiro (Fonte: ANNEROTH <i>et al.</i> , 1987).....	41
Tabela 3:	Análise do infiltrado inflamatório geral intratumoral, conforme a presença de metástases cervicais (N+).....	67
Tabela 4:	Análise do infiltrado inflamatório geral intratumoral conforme o estadiamento TNM.....	67
Tabela 5:	Análise do infiltrado inflamatório geral peritumoral conforme a presença de metástases cervicais (N+).....	69
Tabela 6:	Análise do infiltrado inflamatório geral peritumoral conforme o estadiamento TNM.....	69
Tabela 7:	Análise do infiltrado linfocitário T intratumoral conforme a presença de metástases cervicais (N+).....	71
Tabela 8:	Análise do infiltrado linfocitário T intratumoral conforme o estadiamento TNM.....	71
Tabela 9:	Análise do infiltrado linfocitário T peritumoral, conforme a presença de metástases cervicais (N+).....	73
Tabela 10:	Análise do infiltrado linfocitário T peritumoral, conforme o estadiamento TNM.....	73

Tabela 11:	Análise do infiltrado linfocitário B intratumoral, conforme a presença de metástases cervicais (N+).....	74
Tabela 12:	Análise do infiltrado linfocitário B intratumoral, conforme o estadiamento TNM.....	74
Tabela 13:	Análise do infiltrado linfocitário B peritumoral, conforme a presença de metástases cervicais (N+).....	76
Tabela 14:	Análise do infiltrado linfocitário B peritumoral, conforme o estadiamento TNM.....	76
Tabela 15:	Análise do infiltrado linfocitário CD4+, conforme a presença ou ausência de metástases cervicais (N0/N+).....	78
Tabela 16:	Análise do infiltrado linfocitário CD4+, conforme o estadiamento TNM.....	78
Tabela 17:	Análise do infiltrado linfocitário CD8+, conforme a presença ou ausência de metástases cervicais (N0/N+).....	79
Tabela 18:	Análise do infiltrado linfocitário CD8+, conforme o estadiamento TNM.....	79
Tabela 19:	Análise da razão CD4/CD8 intratumoral, conforme a presença de metástases cervicais (N+).....	80
Tabela 20:	Análise da razão CD4/CD8 intratumoral, conforme o estadiamento TNM.....	80
Tabela 21:	Análise da razão CD4/CD8 peritumoral, conforme a presença de metástases cervicais (N+).....	82
Tabela 22:	Análise da razão CD4/CD8 peritumoral, conforme o estadiamento TNM.....	82

	PÁG.
Figura 1: Observar que o infiltrado inflamatório peritumoral (seta maior) é mais intenso do que o intratumoral (setas menores) HE x 132.....	60
Figura 2: Infiltrado inflamatório (seta) circundando os agrupamentos carcinomatosos. Este infiltrado será analisado nas figuras seguintes (3 a 6), com os diferentes anticorpos utilizados e em cortes seriados. (HE x 132).....	61
Figura 3: Linfócitos B positivos para o anticorpo CD20 (técnica avidina-biotina-peroxidase x330).....	62
Figura 4: Linfócitos T positivos para o anticorpo CD45RO. Observar que o número de linfócitos T é significativamente maior que o de linfócitos B mostrado na figura anterior (técnica avidina-biotina-peroxidase x330).....	62
Figura 5: Linfócitos T CD8+ (técnica avidina-biotina-peroxidase x330).....	63
Figura 6: Linfócitos T CD4+ (técnica avidina-biotina-peroxidase x330).....	63

	PÁG.
Gráfico 1: Distribuição, segundo a localização anatômica, de 138 biópsias de pacientes portadores de CEC da cavidade oral, realizadas no HCFCM-UNICAMP entre 1993-1997.....	57
Gráfico 2: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme a intensidade do infiltrado inflamatório geral intratumoral.....	68
Gráfico 3: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme a intensidade do infiltrado inflamatório geral peritumoral.....	70
Gráfico 4: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme o infiltrado linfocitário T intratumoral.....	72
Gráfico 5: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme o infiltrado linfocitário B intratumoral.....	75
Gráfico 6: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme o infiltrado linfocitário B peritumoral.....	77
Gráfico 7: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme a razão CD4/CD8 intratumoral.....	81
Gráfico 8: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme a razão CD4/CD8 peritumoral.....	83
Gráfico 9: Análise da probabilidade de sobrevida global de 38 pacientes portadores de CEC da língua e soalho de boca, levantados no HCFCM da UNICAMP.....	84
Gráfico 10: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme a presença ou ausência de metástases cervicais (N0/N+), de 38 pacientes portadores de CEC de língua e soalho de boca, levantados no HCFCM da UNICAMP.....	85
Gráfico 11: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme o estadiamento TNM, de 38 pacientes portadores de CEC de língua e soalho de boca, levantados no HCFCM da UNICAMP.....	86



RESUMO

O infiltrado inflamatório tem sido considerado como um possível fator prognóstico em neoplasias malignas. O objetivo do presente estudo é caracterizar pela técnica imuno-histoquímica, o infiltrado inflamatório linfocitário em biópsias de CEC da língua e soalho de boca, analisando seu valor prognóstico por correlação dos achados, com os dados do estadiamento TNM e com a probabilidade de sobrevida dos doentes. Foram analisadas 46 biópsias de pacientes não tratados com CEC de língua e soalho da boca, nas quais foram avaliadas as seguintes características do infiltrado inflamatório: intensidade do infiltrado inflamatório geral, intensidade relativa do infiltrado de linfócitos T (CD45R0+) e B (CD20+) em relação ao infiltrado geral nas regiões intra e peritumorais, epitélio displásico e epitélio normal; quantidade de linfócitos CD4+, quantidade de linfócitos CD8+ e razão CD4/CD8 nas regiões intra e peritumorais. Tanto o infiltrado inflamatório geral, como o infiltrado de linfócitos T e B eram mais intensos na área peritumoral do que na intratumoral. Em ambas, os linfócitos T foram encontrados em maior quantidade do que os linfócitos B, a proporção CD4/CD8 não mostrou diferença significativa entre as áreas intra e peritumorais. Foi observado correlação inversa significativa entre a intensidade do infiltrado inflamatório geral intratumoral e a presença de metástases cervicais e estágio da doença. Houve, também, correlação inversa significativa entre intensidade de infiltrado de linfócitos B intratumoral e presença de metástases cervicais. Não foi encontrado qualquer correlação entre sobrevida e infiltrado inflamatório relacionado ao CEC na amostra estudada. Concluiu-se que, a análise do infiltrado inflamatório em biópsias pode contribuir para a avaliação do prognóstico dos doentes com CEC de cavidade oral.



1. INTRODUÇÃO

Os registros de câncer de base populacional (BRASIL.INCa, 1997) em funcionamento no Brasil, mostram que o carcinoma da cavidade oral figura entre os seis tipos de câncer mais incidentes para o sexo masculino, existindo uma variação regional importante. Considerando-se todos os tipos de neoplasias malignas que acometem o ser humano, a frequência relativa do câncer de boca varia de 7% a 16% no sexo masculino e de 2% a 6% no sexo feminino, segundo relatórios dos registros hospitalares de câncer (BRASIL.INCa, 1997).

O carcinoma espinocelular (CEC), também chamado de carcinoma epidermóide ou de carcinoma de células escamosas, responde por 90% a 95% dos cânceres da cavidade oral, predominando no sexo masculino e na faixa etária entre 50 e 70 anos (KOWALSKI & RIERA, 1991).

A língua é o sítio mais comumente envolvido por CEC da cavidade oral (30%), principalmente nas bordas laterais entre os terços médio e posterior, seguida pelos lábios (25%), soalho de boca (15%), gengivas (10%), mucosa jugal (10%) e palato (10%). Metástases regionais estão presentes na avaliação inicial em aproximadamente 30% dos pacientes (BRANDÃO & CAVALHEIRO, 1999).

O carcinoma da cavidade oral tem etiologia multifatorial (LA VECCHIA *et al.*, 1997), relacionando-se a fatores ambientais, tais como, agressão por agentes físicos e químicos bem conhecidos, como o fumo e o álcool (SPITZ *et al.*, 1988) ou ainda por prováveis fatores biológicos como a infecção do epitélio oral pelo HPV (LÖNING *et al.*, 1985). Os fatores etiológicos inerentes ao portador ou hospedeiro da doença, tais como, sexo, idade e condições do estado físico geral (STELL, 1992) estão diretamente ligados ao papel dos mecanismos de defesa do indivíduo contra o crescimento do tumor. Dentre esses últimos, o papel da vigilância do sistema imunológico do hospedeiro contra o tumor tem sido objeto de investigação por causa da importância prognóstica (HIRATSUKA *et al.*, 1984), assim como, a aplicabilidade terapêutica (LETESSIER *et al.*, 1991).

O infiltrado inflamatório tumoral e peritumoral, constituído predominantemente de linfócitos é comum a vários tipos de tumores, incluindo o carcinoma espinocelular da cavidade oral (LIAVAAG *et al.*, 1994), sugerindo a existência de uma resposta imune local

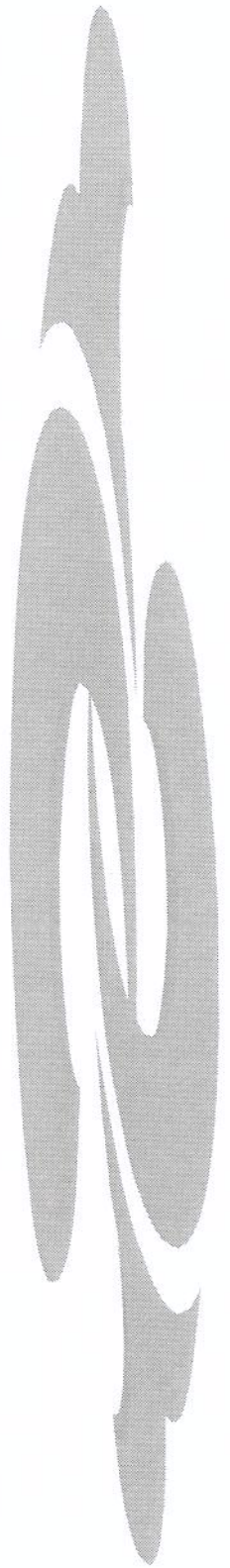
contra o tumor. Embora estudos relacionem diretamente a intensidade e o teor do infiltrado linfocitário a um melhor prognóstico da doença (BENNETT *et al.*, 1971; HIRATSUKA *et al.*, 1984; WOLF, HUDSON, PETERSON, 1986; SLOOTWEG *et al.*, 1994; STEPHENS *et al.*, 1998), esse assunto tem sido objeto de controvérsia. Outros autores estudaram o teor do infiltrado inflamatório tumoral, atribuindo-lhe um papel supressor da resposta imune, contribuindo para o crescimento e disseminação do câncer (VOSE & MOORE, 1979; YOUNG *et al.*, 1996).

Dentre as técnicas utilizadas pelos autores (VOSE & MOORE, 1979; TOTO, BROMBERG, TOTO, 1981; SNYDERMAN, 1989; GOEDEGEBUURE & EBERLEIN, 1995; YOUNG *et al.*, 1996) para analisar o infiltrado inflamatório tumoral, destaca-se a da imunoperoxidase com anticorpos monoclonais, através do método do complexo de avidina-biotina (HSU *et al.*, 1981). Tal técnica, permite a localização de antígenos em tecidos fixados em formalina com boa sensibilidade e relativa simplicidade, mesmo em material estocado.

Apesar do progresso dos procedimentos diagnósticos e terapêuticos alcançados nas últimas décadas, o prognóstico global do CEC da cavidade oral permanece ruim (BRYNE, 1991). Isto acontece devido a dois fatores cruciais: primeiro, a detecção tardia da doença, cerca de 70% a 80% dos casos são diagnosticados nos estádios III e IV (DIB *et al.*, 1990) e segundo, a avaliação prognóstica e o planejamento terapêutico são baseados, principalmente, na classificação clínica TNM, que não reflete a condição real do que está se passando entre o tumor e o seu hospedeiro (BRYNE, 1991).

Ao lado de outros fatores prognósticos, tais como, o grau histológico de malignidade (ANNEROTH, BATSAKIS, LUNA, 1987; BRYNE *et al.*, 1991a), a medida da espessura do tumor (BYERS, 1997; GUIMARÃES & ALTEMANI, 1999) e o conteúdo de DNA das células neoplásicas (KOKAL, GARDINE, SHEIBAM, 1988), a análise da resposta imune do hospedeiro, através da caracterização do infiltrado linfocitário tumoral, tem por objetivo adicionar elementos que corroborem para a decisão terapêutica, além de dar subsídios para o tratamento imunoterápico (LETESSIER *et al.*, 1991) que, associado com as modalidades terapêuticas ora empregadas, ou seja, a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia, aumente a sobrevida dos pacientes portadores de CEC da cavidade oral.

Assim, o objetivo do presente estudo é caracterizar pela técnica imuno-histoquímica, o infiltrado inflamatório linfocitário presente em biópsias de CEC da língua e soalho de boca, analisando seu valor prognóstico por correlação dos achados, com os dados do estadiamento TNM e com a probabilidade de sobrevida dos doentes.



2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ASPECTOS HISTÓRICOS DA IMUNOLOGIA DO CÂNCER DA CAVIDADE ORAL

O papel da imunologia no diagnóstico, prognóstico e planejamento terapêutico do câncer da cavidade oral começou a ser estudado quando linhagens de animais histocompatíveis tornaram-se disponíveis. Foi demonstrado que, quando um tumor maligno era transplantado de um animal para outro de mesma constituição genética, ele era rejeitado, embora a pele normal do mesmo doador fosse aceita (PREHN & MAIN, 1957).

Reações imunes específicas contra células de tumores malignos foram demonstradas através de testes de citotoxicidade. Linfócitos de pacientes portadores de tumores malignos mostraram-se citotóxicos para células tumorais em cultura. Além disso, os linfócitos foram citotóxicos para células tumorais do mesmo tipo histológico, provenientes de pacientes distintos, mas não se mostraram citotóxicos para células de diferentes tipos de tumor nem para as células normais (HELLSTRÖM & HELLSTRÖM, 1970).

Foi bem estabelecido que, pacientes com tumores malignos apresentam uma deficiência da resposta imune, principalmente, a mediada por células (EILBER & MORTON, 1970).

A análise quantitativa das respostas cutâneas de hipersensibilidade retardada é difícil e elas são geralmente lidas como positivas ou negativas. Por isso, passou-se a empregar testes *in vitro* que procuravam medir as respostas dos linfócitos. Um deles, media a resposta mitogênica dos linfócitos à fito-hemoaglutinina, notando-se que ocorria um declínio da mesma à proporção que a malignidade progredia, enquanto que, nas fases iniciais do câncer da cavidade oral, a resposta linfocitária à referida substância não se alterava (LEHNER *et al*, 1973).

Os estudos iniciais com dinitroclorobenzeno (DNCB), em pacientes portadores de tumores malignos, demonstraram uma diminuição da resposta de hipersensibilidade retardada ao agente de contato à proporção que a neoplasia avançava, sendo essa resposta utilizada como parâmetro para prever a evolução do paciente com alguma precisão, embora esse método de avaliação prognóstica não tenha sido aceito como um procedimento rotineiro na prática clínica (SHILLITOE, 1976).

A razão pela qual o tumor continuava a crescer levou à hipótese de que fatores humorais poderiam estar bloqueando a citotoxicidade *in vivo*, sendo proposto que a eliminação de tais fatores bloqueadores permitiria que a resposta imune eliminasse as células tumorais (BALDWIN, PRICE, ROBINS, 1972; BALDWIN, EMBLETON, PRICE, 1973; CURRIE & MCELWAIN, 1975).

Tais dados, de relevância histórica, já demonstravam que a resposta imune do hospedeiro ao câncer podia fornecer alguma proteção contra o crescimento dos tumores malignos, estando, no entanto, essa reação de defesa prejudicada por fatores ainda desconhecidos e que, talvez, a manipulação da resposta imune através da chamada imunoterapia pudesse beneficiar os pacientes com câncer (SHILLITOE, 1976).

2.2. FATORES PROGNÓSTICOS NO CÂNCER DA CAVIDADE ORAL

O comportamento clínico incerto dos pacientes com tumores malignos levou muitos pesquisadores à procura de fatores que pudessem ser usados como índices de prognóstico. Como resultado, surgiram os conceitos de estadiamento clínico e grau histológico do tumor primário que são utilizados na avaliação rotineira dos pacientes portadores de uma ampla variedade de tumores. Embora o estágio e o grau histológico do tumor primário tendem a apresentar um significado prognóstico, a diversidade biológica dos indivíduos classificados dentro de um mesmo estágio clínico ou grau histológico tem levado a se pesquisar outros fatores que poderiam aprimorar a capacidade de previsão da sobrevida. O papel dos mecanismos de defesa do hospedeiro contra o crescimento tumoral tem ganho atenção em diversos estudos clínicos e experimentais (HIRATSUKA, 1984; WOLF *et al.*, 1986; SLOOTWEG *et al.*, 1994; STEPHENS *et al.*, 1998).

No que se refere ao CEC da cavidade oral, BYERS, 1997, divide-os em fatores do paciente e fatores relacionados às características do tumor. Ambos os grupos de fatores, devem ser levados em conta na escolha da terapia a ser empregada, ou seja, radioterapia, cirurgia, quimioterapia ou combinações das três modalidades. No estudo de BYERS (1997), os fatores prognósticos de sobrevida relacionados, em ordem decrescente de significância estatística, são:

presença de linfonodos cervicais positivos (N+); espessura da invasão muscular; tratamento empregado (cirurgia *versus* cirurgia e radioterapia); espessura do tumor maior que dois milímetros; invasão perineural; invasão vascular e tamanho do tumor primário (T).

Os fatores prognósticos para se aferir a possibilidade de recorrência da doença, diferem, em parte, dos fatores prognósticos de sobrevida, obedecendo à seguinte ordem de importância: presença de linfonodos cervicais positivos (N+); morfologia da lesão (exofítica, ulcerada ou outra); tratamento empregado (cirurgia apenas *versus* cirurgia e radioterapia associadas) e, condição das margens cirúrgicas (livres, comprometidas ou ampliadas e exíguas quando menores que cinco milímetros).

Os demais fatores prognósticos, analisados nos pacientes portadores de CEC da cavidade oral do estudo de BYERS (1997), os quais não se mostraram com significância estatística, foram: invasão extracapsular de linfonodos acometidos, aneuploidia das células tumorais, localização da lesão, grau de diferenciação do tumor e nível de comprometimento dos linfonodos cervicais.

GLUCKMAN *et al.*, (1998), analisando fatores prognósticos em 53 casos de CEC da cavidade oral diagnosticados em estádios iniciais, dividiu-os conforme o seu comportamento clínico, em dois grupos: os agressivos e os não-agressivos. Estudou, nesses dois grupos, alguns fatores prognósticos, a saber: a) Fatores histológicos: grau de diferenciação histológica (bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado); avaliação da interface tumor-hospedeiro (a região mais profunda do tumor era avaliada quanto à forma de invasão, ou seja, em blocos tumorais 'que empurram', em cordões infiltrativos ou microinvasão); espessura do tumor (através da medida da superfície do tumor até a interface tumor-hospedeiro) e grau de diferenciação histológica do tumor na sua porção mais invasiva. b) Densidade microvascular através da pesquisa imuno-histoquímica do antígeno CD31. c) Expressão da proteína p53. Os autores concluíram que nenhum dos critérios prognósticos analisados foi estatisticamente significativo para que tivesse um real papel como indicador prognóstico na prática clínica e que futuras pesquisas são esperadas para que se possa ter índices simples e baratos a fim de se determinar o comportamento do câncer em determinado paciente.

A presença de margem cirúrgica positiva e a profundidade do tumor maior do que cinco milímetros foram as únicas variáveis associadas de maneira significativa na recorrência do CEC da cavidade oral no estudo de JONES *et al.*, (1992) em análise de 49 pacientes nos estádios iniciais.

Em relação aos fatores prognósticos do hospedeiro, tais como, sexo, idade e condições do estado geral do paciente, STELL em 1992, analisou uma amostra de 512 casos de CEC de cavidade oral e concluiu que o sexo não influenciou a sobrevida, mas o incremento da idade e a queda das condições do estado geral apresentaram correlação estatisticamente significativa, diminuindo a sobrevida e ressaltando que ambas as condições associam-se a um comprometimento do estado de vigilância imunológica.

Em artigo de revisão, BRYNE em 1991, avaliou vários fatores prognósticos, dividindo-os em fatores relacionados às características do tumor; fatores relacionados às características do ambiente peritumoral do hospedeiro e fatores relacionados à presença de determinados marcadores séricos.

2.3. FATORES PROGNÓSTICOS RELACIONADOS AO TUMOR

2.3.1. Características histopatológicas

Entre as características histopatológicas do tumor, o grau de malignidade constituiu-se em um dos primeiros fatores a ser considerado, baseando-se no pressuposto de que variações histológicas teriam um valor prognóstico (BRODERS, 1920; JACOBSSON *et al.*, 1973; CRISSMAN *et al.*, 1980; CRISSMAN *et al.*, 1984; ANNEROTH & HANSEN, 1984; ANNEROTH, BATSAKIS, LUNA, 1986; ANNEROTH *et al.*, 1987; BRYNE *et al.*, 1989). Inicialmente, em 1920, BRODERS sugeriu que os carcinomas pouco diferenciados representavam tumores com pior prognóstico. Mais tarde, sua classificação foi colocada em desuso para os CEC da cavidade oral, devido à sua pequena correlação anatomoclínica e baixa reprodutibilidade. ANNEROTH *et al.*, em 1987 redefiniram os critérios de classificação histológica e recomendaram uma graduação que consiste em seis características, conforme as tabelas a seguir:

Tabela 1: Sistema de graduação de malignidade do CEC da cavidade oral conforme o grau histológico de malignidade da população de células tumorais.

Grau Histológico de Malignidade				
Parâmetro Morfológico	1	2	3	4
Grau de queratinização	Altamente queratinizado (mais de 50% das células)	Moderada-mente queratinizado (20-50% das células)	Mínima queratinização (5-20% das células)	Nenhuma queratinização (0-5% das células)
Polimorfismo nuclear	Pouco polimorfismo nuclear (mais de 75% células maduras)	Moderado polimorfismo nuclear (50-75% células maduras)	Abundante polimorfismo nuclear (25 – 50% de células maduras)	Extremo polimorfismo nuclear (0- 25% de células maduras)
Número de mitoses/ campo	0-1	2-3	4-5	>5

Fonte: ANNEROTH *et al*, 1987

Tabela 2: Sistema de graduação de malignidade do CEC da cavidade oral de acordo com o grau histológico de malignidade da interface tumor-hospedeiro.

Grau Histológico de Malignidade				
Parâmetro Morfológico	1	2	3	4
Padrão de invasão	Empurrando, bordas de transição bem delimitadas	Infiltrando, cordões sólidos	Pequenos agrupamentos de células infiltrando	Pequenos grupos ou células individuais e espalhadas
Profundidade de invasão	Carcinoma <i>in situ</i>	Invasivo envolvendo apenas a lâmina própria (microinvasivo)	Invasão abaixo da lâmina própria adjacente aos músculos, glândulas salivares e periósteo	Invasão extensa e profunda substituindo a maior parte do estroma e invadindo a mandíbula
Infiltração linfoplasmocitária	Intensa	Moderada	Leve	Nenhuma

Fonte: ANNEROTH *et al*, 1987

Em relação à infiltração linfoplasmocitária, ANNEROTH *et al.* (1987) referem-se a esse parâmetro como sendo uma reação imunológica ao tumor, mas também, que pode ser apenas uma reação inflamatória à ulceração. No entanto, muitos casos de invasão neoplásica inicial, sem ulceração, não apresentam problema em graduar-se essa variável, pois a mesma já se encontra presente. Ressaltam ainda que o acesso a esse parâmetro deve ser feito o mais longe possível de área ulcerada, preferencialmente no estroma adjacente às células da linha de frente do crescimento tumoral.

Nos tumores, as células mais invasivas ou mais profundas tendem a ser menos diferenciadas e, assim, expressam melhor o grau histológico de malignidade que as células mais superficiais (HAMBRAEUS, MERCKE, WILLEN, 1988; BRYNE, 1991). Uma modificação do grau de malignidade, baseada nas margens de invasão, chamada graduação das células invasivas, mostrou-se de maior valor prognóstico no CEC da cavidade oral (BRYNE, 1991).

2.3.2. Morfometria celular

Através de métodos morfológicos e citométricos, as características celulares, tais como, tamanho, volume, morfologia e número, podem ser medidas de um modo objetivo (GUNDERSEN, BENDTSEN, KORBO, 1988; TOSI & COTTIER, 1989). Algumas características do tumor, obtidas através das técnicas morfométricas mostraram-se de valor prognóstico independente, tais como, o tamanho nuclear aumentado e as alterações de morfologia nuclear, relacionaram-se a um pior prognóstico (ABDEL-SALAM *et al.*, 1990).

2.3.3. Conteúdo de DNA

A medida do conteúdo de DNA no tumor pode ser utilizada como indicador prognóstico, sendo que, a presença de aneuploidia indica um comportamento mais agressivo e um pior prognóstico (TYTOR *et al.*, 1990). O valor prognóstico do conteúdo de DNA é discutível para o CEC da cavidade oral, conforme mostram os estudos de TYTOR *et al.*, (1987) e de GOLDSMITH *et al.*, (1987).

2.3.4. Índices de proliferação celular

O aumento da velocidade de crescimento tumoral está associada a um pior prognóstico (TUBIANA & COURDI, 1989), embora o valor prático das técnicas utilizadas seja limitado (FRANZEN *et al.*, 1986; TUBIANA & COURDI, 1989). Os métodos imuno-histoquímicos permitiram simplificar a avaliação das taxas de proliferação celular através da detecção de quantidades aumentadas de determinadas estruturas, tais como: antígeno Ki-67, receptor para fator de crescimento epidérmico, receptor de transferrina e PCNA (KEARSLEY, FULONG, WATERS, 1990; BROWN & GATTER, 1990).

2.3.5. Marcadores celulares

A expressão de vários carboidratos na superfície das células, ligados a lípidos ou a proteínas, ao nível da membrana celular, está intimamente relacionada ao grau de diferenciação celular, migração celular, transformação maligna e formação de metástases, sugerindo fortemente que tais estruturas possuem algum significado biológico (THURIN, 1990). Na mucosa oral, vários desses carboidratos da superfície celular têm sido estudados em lesões pré-malignas (BRYNE *et al.*, 1991a). Alterações na estrutura de tais carboidratos foram documentadas em CEC da cavidade oral, quando comparadas ao tecido normal (WOLF, CAREY, HAYASHIDA, 1988; BRYNE *et al.*, 1991a). Observou-se que um desses carboidratos, chamado antígeno-H, tem sua expressão diminuída nas células das margens mais invasivas do tumor, estando esse achado, associado à presença de metástases, bem como, a um pior prognóstico (BRYNE, THRANE, DABELSTEEN, 1991b).

Várias estruturas protéicas celulares têm sido estudadas como marcadores, tentando-se correlacionar as suas expressões com o curso clínico da neoplasia, tais como citoqueratinas, filagrina, caderina e involucrina (VIGNESWARAN *et al.*, 1989; TOTO, NADIMI, MAYWOOD, 1990).

2.3.6. Cromossomos, oncogenes e antioncogenes

As alterações dentro do DNA são extremamente importantes para o desenvolvimento incontrollável das células cancerígenas (NICOLSON, 1987; NOWELL, 1989; WEINBERG, 1989; BISHOP, 1991). Irregularidades cromossômicas, tais como, mutações, deleções e translocações, envolvendo áreas de cromossomos específicos foram relatadas na maioria dos cânceres humanos. A ativação ou a amplificação de vários genes, chamados de oncogenes, está relacionada à iniciação e à progressão tumoral (LEWIN, 1991; HUNTER, 1991). As proteínas resultantes da transcrição dos oncogenes estão envolvidas em diversos mecanismos de diferenciação e proliferação das células cancerígenas. Por outro lado, os genes supressores de tumor codificam para proteínas que, em situações normais, exercem suas ações inibindo a proliferação celular. O crescimento harmônico de um tecido é resultado tanto da ação de proteínas que ativam a divisão celular como da ação de proteínas que as reprime. Perturbações em oncogenes acarretam um aumento na função de proteínas indutoras da ativação, enquanto alterações em genes supressores mudam o comportamento celular, por produzirem uma diminuição nas proteínas inibidoras (SABBAGA, 2000).

2.3.7. Marcadores séricos

A identificação de marcadores no soro, cujos níveis correlacionam-se com o prognóstico do tumor, constitui um recurso de enorme interesse (COHN, LINCOLN, ROSEN, 1986) em CEC da cavidade oral. As substâncias que têm mostrado um possível valor prognóstico incluem: imunocomplexos, compostos fixadores de complemento, interleucinas, imunoglobulinas e leucócitos (SCULLY, 1983; SCHANTZ *et al.*, 1988; SCHANTZ, SAVAGE, BROWN, 1990). Outros marcadores séricos de origem não imunológica têm sido estudados quanto ao seu valor prognóstico, tal como a taxa de hemoglobina (MACIEJEWSKI *et al.*, 1990). Marcadores séricos, tais como, beta-2 microglobulina e antígeno carcinoembrionário são, no entanto, inespecíficos para serem usados como indicadores de tumor ou de metástases no CEC de boca (SCULLY, 1983).

2.4. FATORES PROGNÓSTICOS RELACIONADOS AO HOSPEDEIRO –

Segundo BRYNE (1991), os fatores prognósticos inerentes ao hospedeiro podem ser divididos em imunológicos e não imunológicos.

2.4.1. Fatores não imunológicos

Entre os fatores de origem não imunológica, relacionados ao hospedeiro e que têm relação com a progressão tumoral, destacam-se: influência das células do estroma, grau de vascularização, fatores de crescimento local e hormônios circulantes (LIOTTA, 1986; NICOLSON, 1987; LIOTTA *et al.*, 1991).

2.4.2. Fatores imunológicos

A importância da resposta imune na patogênese de várias doenças é bem descrita. No entanto, o papel da resposta imunológica nas doenças neoplásicas, em especial no CEC da cavidade oral, necessita de melhor estudo.

Várias evidências favoráveis ao envolvimento da resposta imune no desenvolvimento das neoplasias malignas têm sido apontadas (SCULLY, 1983; PREHN & PREHN, 1987; FERRINI & MORETTA, 1990). Assim, temos uma incidência aumentada de neoplasias em imunodeficiências primárias e secundárias (SCULLY & LEHNER, 1980). Ocorre uma melhora no prognóstico quando há um infiltrado celular mononuclear mais intenso no tumor (SCULLY, 1981; ANNEROTH *et al.*, 1987; GAZE & WILSON, 1988; BRYNE *et al.*, 1989; BRYNE, 1991) e quando os linfonodos regionais mostram alterações de atividade imunológica. Há associação entre antígenos de histocompatibilidade e CEC da cavidade oral (SCULLY, 1982).

Corroborando o envolvimento do sistema imunológico, ainda temos o aumento da incidência de neoplasias com a idade (BOYLE & SCULLY, 1982); regressão espontânea de tumores ; regressão ocasional das metástases quando o tumor primário é removido (SCULLY, 1983) .

Observa-se, ainda, a presença de anormalidades imunológicas concomitantes em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço, tais como prejuízo da reação da resposta imune mediada por células e da reação de hipersensibilidade retardada, diminuição do número de linfócitos T, alterações nas subpopulações de linfócitos T, prejuízo da resposta linfoproliferativa dos linfócitos T frente a determinados agentes mitogênicos (SCULLY, 1983), alteração da função dos linfócitos (WOLF, KERNEY, CHRETIEN, 1980) e aumento das concentrações séricas de IgA (SCULLY, 1981).

2.5. AS CÉLULAS DA RESPOSTA IMUNE

Conforme ROITT, BROSTOFF, MALE (1999), as células do sistema imune originam-se de células pluripotentes através de duas vias principais de diferenciação, a saber: a linhagem linfóide que produzirá os linfócitos e a mielóide que produzirá fagócitos (monócitos, macrófagos e neutrófilos) e outras células.

Embora o sistema imune seja composto por um grande número de tipos celulares, os linfócitos desempenham um papel central, conferindo especificidade ao mecanismo de reconhecimento imunológico (RESTIFO & WUNDERLICH, 1997).

O sistema imune é dividido em dois contingentes: o humoral, composto pelos linfócitos B e o celular, composto, principalmente, pelos linfócitos T. O contingente humoral está relacionado com a produção de anticorpos. O celular é responsável pela resposta imune celular que inclui a reação de hipersensibilidade do tipo retardada (LANDSTEINER & CHASE, 1942) e a rejeição a enxertos (BILLINGHAM, BRENT, MEDAWAR, 1954) e a tumores (MITCHISON, 1954).

2.6. MORFOLOGIA DOS LINFÓCITOS

Os linfócitos possuem um formato arredondado, com 6 a 12 μ de diâmetro, citoplasma bastante escasso, apresentando poucas organelas. São células mononucleares com o núcleo arredondado ou ovalado, às vezes, ligeiramente chanfrado que se coram intensamente pelos corantes básicos. (ISAAC, 1989).

2.7. DIFERENCIAÇÃO ENTRE LINFÓCITOS T E B

Segundo ISAAC (1989), não se pode distinguir entre um linfócito B e um linfócito T apenas pela morfologia. A distinção é possível através da identificação de componentes presentes na membrana que caracterizam estas populações celulares. O receptor para eritrócitos de carneiro que leva à adesão dos linfócitos T a essas hemácias, formando rosetas, foi bastante utilizado no passado.

Outra técnica empregada para diferenciar os linfócitos T e B entre si é avaliando as suas respostas proliferativas a certos agentes mitógenos. A fito-hemoaglutinina e a concanavalina-A agem preferencialmente em linfócitos T e o lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* atua induzindo a proliferação dos linfócitos B (CALICH & VAZ, 1989).

2.8. MARCADORES DE SUPERFÍCIE DOS LINFÓCITOS T

As populações de linfócitos podem ser identificadas através de marcadores característicos expressados nas suas superfícies. Muitos destes marcadores celulares podem ser identificados através de anticorpos monoclonais (BARCLAY *et al.*, 1994). Uma nomenclatura chamada sistema CD foi desenvolvida na qual o termo CD ("cluster designation") refere-se ao grupo ("cluster") de anticorpos monoclonais, produzidos em ratos, que se ligam especificamente a um determinado marcador celular (ROITT *et al.*, 1999). Os marcadores de superfície celulares, identificados através da reação com anticorpos, permitem, além da identificação dos tipos de linfócitos, a associação com o estágio de maturação de uma determinada célula T (BARCLAY *et al.*, 1994).

Assim, o marcador CD4 identifica a subpopulação de linfócitos T auxiliares e o marcador CD8 reconhece uma outra subpopulação que é predominantemente citotóxica (ROITT *et al.*, 1999).

Conforme LIMA & ABRAHNSOHN (1989) os linfócitos T auxiliares têm um papel fundamental nas reações imunológicas mediadas por células através de uma ação específica, condicionada ao reconhecimento do antígeno, e uma ação inespecífica resultante da ativação dos macrófagos que, uma vez ativados, poderão exercer suas funções tanto em

nível local como em nível sistêmico, independente do estímulo antigênico inicial. Os linfócitos T citotóxicos são estimulados *in vivo*, nas infecções virais, durante o crescimento dos tumores e durante a rejeição de aloenxertos. Com o auxílio das células T auxiliares e da produção de IL-2, as células T citotóxicas proliferam e se diferenciam em células efetoras que, ao interagirem com a célula alvo, provocam modificações irreversíveis na permeabilidade de sua membrana, levando-a à morte.

2.9. DIFERENCIAÇÃO DOS LINFÓCITOS PELA IMUNOQUÍMICA

Os métodos imunoquímicos, utilizando o complexo antígeno-anticorpo, são muito sensíveis e permitem a visualização de componentes celulares anteriormente não detectáveis.

A coloração da imunoperoxidase é um instrumento importante para a identificação de uma grande variedade de estruturas da célula. Esta, envolve o uso de anticorpos e a enzima peroxidase. O procedimento da reação de imunoperoxidase permite a caracterização de antígenos celulares em cortes de parafina, esfregaços e “imprints”.

Os principais métodos de coloração pela imunoperoxidase são: o método direto, o indireto, o PAP e o avidina-biotina.

O método do complexo de avidina-biotina (GUESDOM, TERNYNCK, AVRAMEAS, 1979) utiliza a aplicação de um anticorpo secundário, marcado com biotina, seguido da adição do complexo de avidina-biotina-peroxidase e fornece um resultado superior quando comparado com os métodos que utilizam anticorpos não marcados (HSU *et al.*, 1981). Este método é baseado na capacidade da glicoproteína da clara do ovo, a avidina, ligar-se covalentemente (não imunologicamente) a quatro pequenas moléculas da vitamina biotina. Neste método, três reagentes são usados. O primeiro é um anticorpo específico primário para o antígeno a ser localizado. O segundo é um anticorpo secundário, conjugado à biotina e capaz de ligar-se ao primeiro e o terceiro reagente é o complexo de peroxidase conjugado à biotina e à avidina. Os lugares livres na molécula de avidina permitem a ligação com a biotina no anticorpo secundário. A enzima peroxidase, e

portanto, o antígeno original, são visualizados com um cromógeno apropriado. A forte afinidade da avidina pela biotina confere a este método maior sensibilidade que os demais. Os antígenos de superfície dos linfócitos, assim como as citocinas secretadas, podem ser identificados muito bem através desta técnica (BOURNE, 1997; ROITT *et al.*, 1999).

2.10. O INFILTRADO LINFOCITÁRIO NO CEC DE CAVIDADE ORAL

Desde a época de EHRLICH, 1879 (*apud* KREIDER, BARTLETT, BUTKIEWICZ, 1984) tem-se a idéia que o infiltrado linfocitário dos tecidos é um indicador da resposta imunológica do hospedeiro contra o tumor e que sua presença pode refletir uma sobrevida mais longa (KREIDER *et al.*, 1984). No entanto, tal assunto tem sido objeto de pesquisas e discussões há mais de um século.

O prognóstico de pacientes portadores de câncer tende a ser melhor quando existe um infiltrado linfocitário tumoral mais intenso. Este fenômeno foi relatado pela primeira vez em melanomas (HANDLEY, 1907) e depois observado em outros tipos de câncer (BENNET *et al.*, 1971; IOACHIM, 1976; SVENNEVIG *et al.*, 1978; VAN NAGELL *et al.*, 1978; VOSE & MOORE, 1979; HOLMES, 1985; BROCKER, 1989; YOUNG *et al.*, 1996). A presença da infiltração linfocitária é um fenômeno comum a várias neoplasias, incluindo o CEC da cavidade oral (JONES & COYLE, 1969; PAAVOLAINEN, TARKKANEN, SAKSELA, 1973; BONCINELLI, FORNIERI, MUSCATELLO, 1978; TOTO *et al.*, 1981; SCULLY, 1982; FURUSAKA, 1982; BROEMAL, BECKER, OTTO, 1983; RABIN, JOHNSON, CLAASSEN, 1984; HIRATSUKA *et al.*, 1984; KREIDER *et al.*, 1984; MIWA, 1984; HARABUCHI, YAMANAKA, KATAURA, 1985; WOLF *et al.*, 1986; MIGLIORATI *et al.*, 1986; WOLF, SCHMALTZ, HUDSON, 1987; GUO *et al.*, 1987; SNYDERMAN, 1989; HIROTA *et al.*, 1990; SARIOGLU *et al.*, 1994; LIAVAAG *et al.*, 1994; SLOOTWEG *et al.*, 1994; LAAD *et al.*, 1996; STEPHENS *et al.*, 1998).

HIRATSUKA *et al.* (1984) estudaram 30 pacientes com CEC da cavidade oral, constatando que as células T predominavam sobre as células B e o grau de infiltração de linfócitos T correlacionava-se com o tamanho do tumor e era mais marcante em pacientes sem metástases linfonodais. Além disso, constataram que as taxas de regressão do tumor

após o tratamento com bleomicina eram maiores nos casos em que o infiltrado inflamatório linfocitário era mais abundante. Tais achados levaram os autores a concluir que a infiltração de células T poderia inibir o desenvolvimento e a disseminação das células neoplásicas.

RABIN *et al.* (1984), utilizando anticorpos monoclonais, encontraram uma predominância de linfócitos T e poucos linfócitos B em infiltrados de CEC de cabeça e pescoço, incluindo laringe, esôfago e cavidade oral. Os linfócitos T foram encontrados no estroma do tumor, na periferia do tecido tumoral e algumas vezes infiltrando o tumor.

WOLF *et al.* (1986) estudaram 40 pacientes portadores de CEC da cabeça e pescoço incluindo, cavidade oral, orofaringe, laringe e hipofaringe, quanto ao infiltrado de linfócitos na interface tumor-hospedeiro, utilizando imuno-histoquímica. Quantitativamente, o grau de infiltração estromal foi sempre maior que a infiltração parenquimatosa do tumor e a maioria da população de linfócitos consistiram de células T com infiltrado ocasional de células B. O infiltrado estromal consistia de células CD4 e CD8 em proporções iguais e o infiltrado parenquimatoso consistia de uma proporção maior de células CD8 em relação a CD4.

MIGLIORATI *et al.* (1986) analisando o infiltrado inflamatório de lesões leucoplásicas e eritroplásicas da cavidade oral, encontraram predominância de linfócitos, células CD4 em maior número que as células CD8 e as proporções CD4/CD8 tiveram diferenças significativas entre as lesões displásicas moderadas e severas.

GUO *et al.* (1987) identificaram, por meio de anticorpos monoclonais e utilizando a técnica da avidina-biotina peroxidase, os fenótipos linfocitários do tecido tumoral de pacientes portadores de CEC de cabeça e pescoço, incluindo a língua. O fenótipo mais encontrado foi o de linfócitos T, com a presença de duas vezes mais linfócitos CD4 do que linfócitos CD8. Os pacientes, nos estádios II e III, apresentavam um número significativamente mais alto de linfócitos T e de linfócitos CD8 quando comparados com os pacientes do estágio IV.

HARABUCHI *et al.* (1985) analisaram o infiltrado de linfócitos em CEC de cabeça e pescoço, incluindo a cavidade oral, observando que a infiltração de linfócitos T era mais intensa nos CEC pouco diferenciados do que nos moderadamente ou bem diferenciados.

SNYDERMAN (1989) utilizando tecidos frescos e a técnica de citometria de fluxo, observou que 25% dos pacientes com uma proporção de linfócitos CD4/CD8 menor que um, desenvolveram metástases linfonodais cervicais, sendo que nenhum apresentou disseminação extranodal. No grupo onde a proporção CD4/CD8 era maior que um, 75% desenvolveram metástases cervicais e 83% apresentaram comprometimento extracapsular. O aumento na taxa CD4/CD8 foi atribuído a uma diminuição nas células CD8.

BONCINELLI *et al.* (1978) pesquisaram a natureza das células que compunham a reação inflamatória em lesões pré-cancerígenas e cancerígenas do lábio, utilizando microscopia eletrônica, observando que a predominância era de linfócitos, sendo que outras células como, plasmócitos e macrófagos eram pouco observados.

SARIOGLU *et al.* (1994) estudaram o efeito da infiltração linfocitária na sobrevida de pacientes com CEC de língua. Em análise retrospectiva de 60 casos, a intensidade do infiltrado linfocitário peritumoral não demonstrou ser um marcador prognóstico estatisticamente significativo.

VALENTE *et al.* (1990) analisaram o infiltrado leucocitário e as subpopulações de linfócitos T em CEC de cabeça e pescoço em pacientes recebendo injeções perilinfáticas de interleucina-2, constatando que ocorria um aumento marcante de eosinófilos e do infiltrado linfocitário, havendo predomínio de linfócitos T, bem como, a presença de células CD4+ e CD8+ próximas aos cordões neoplásicos. Os autores concluem que tais achados sugerem que a administração local de interleucina-2 induz a um aumento nas populações de linfócitos T ativados no tecido tumoral, indicando uma reação tumor-específica.

LIAVAAG *et al.* (1994) analisaram a expressão dos receptores de linfócitos T (TCR) em pacientes com CEC do trato aerodigestivo alto e constataram que a maioria dos linfócitos T apresentavam TCR semelhantes aos dos linfócitos do epitélio normal, contrariando a hipótese de que tais alterações celulares teriam um papel importante na defesa da mucosa contra a transformação neoplásica.

HIROTA *et al.* (1990) avaliaram a intensidade do infiltrado celular mononuclear em 50 casos de biópsias de CEC da cavidade oral encontrando predomínio de células T com concentração maior dessas células na periferia do tumor. Houve, ainda, predomínio das células T auxiliares/indutoras sobre as células T citotóxicas/supressoras com diminuição da intensidade do infiltrado linfocitário nos tumores mais avançados e aumento da proporção CD4/CD8 nos casos avançados às custas de uma diminuição de CD8.

SLOOTWEG *et al.* (1994) analisaram uma série de 76 pacientes com CEC de cabeça e pescoço, incluindo a cavidade oral, relacionando o infiltrado linfocitário peritumoral com alguns parâmetros e encontraram correlação apenas com o padrão de invasão tumoral, sendo que para os outros parâmetros investigados (tamanho do tumor, espessura e presença de metástases) não obtiveram significância estatística.

THOMAS *et al.* (1995) caracterizaram a natureza da resposta imune celular local em modelos animais de carcinogênese oral.

LAAD *et al.* (1996), avaliando pacientes com CEC da cavidade oral, encontraram uma redução marcante de linfócitos citotóxicos no tecido tumoral comparado ao sangue periférico.

STEPHENS *et al.* (1998) , utilizando a técnica de hibridização de DNA “Southern blot”, encontraram um predomínio de linfócitos CD8 em alguns CEC da cavidade oral, estando os mesmos adjacentes às células tumorais e causando ilhas de destruição das mesmas, sugerindo que a ativação e a expansão clonal de células T ocorre e pode ter um papel na destruição local do tumor.

2.11. A CLASSIFICAÇÃO TNM

A classificação internacional de tumores malignos – TNM, é utilizada para a avaliação da extensão da doença. Essa classificação foi desenvolvida entre 1943 e 1952 por Pierre Denoix (MORAES, SOUZA FILHO, MACHADO, 1996), tornando-se a mais utilizada no mundo. Tem sido editada pela União Internacional contra o Câncer (UICC) desde 1987 e pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC) desde 1988, com várias

revisões (BAILEY, 1991; PICCIRILLO, 1995). É utilizada para todas as doenças malignas, exceto as leucemias.

O 'T' avalia o tamanho do tumor primário, o 'N' avalia o envolvimento linfonodal locorregional e o 'M' avalia o comprometimento metastático à distância do tumor (MORAES *et al.*, 1996). Segundo esse autor, a classificação TNM serve para planejar o tratamento, indicar o prognóstico, facilitar a avaliação dos resultados e comparar as modalidades de tratamento.

Embora o sistema de estadiamento TNM seja baseado principalmente no exame físico, têm-se incorporado os achados radiológicos como uma maneira de aumentar a acurácia (SCHANTZ *et al.*, 1997). Os benefícios da incorporação de outras técnicas diagnósticas aos achados de exame físico têm sido investigados (CLOSE *et al.*, 1989; VAN DEN BREKEL *et al.*, 1991a; VAN DEN BREKEL *et al.*, 1991b; SOM, 1992; MADISON *et al.*, 1994).

O estadiamento clínico das neoplasias malignas de cavidade oral segue o estabelecido pelo AJCC. Uma lesão estadiada como 'Tx' não pode, por algum motivo, ser avaliada; 'T0' representa ausência de tumor primário; 'Tis' representa um carcinoma *in situ*; 'T1' uma lesão cujo maior diâmetro é menor ou igual a 2 centímetros; 'T2' lesões cujo maior diâmetro está entre 2 e 4 centímetros; 'T3' lesões maiores do que 4 centímetros e 'T4' lesões que invadem estruturas adjacentes (BRANDÃO & CAVALHEIRO, 1999).

Segundo a classificação TNM, nos carcinomas espinocelulares do trato aero-digestivo alto, o pescoço é classificado da seguinte forma:

N0: ausência de metástase detectável

N1: linfonodo único de até 3cm

N2a: linfonodo único de 3 a 6cm

N2b: linfonodos múltiplos, menores que 6cm

N2c: linfonodos contralaterais

N3: linfonodo maior que 6cm ou fixo

Em relação ao 'M' temos: 'Mx', a presença de metástases à distância não pode ser avaliada por algum motivo; 'M0', significa ausência de metástase à distância e 'M1', a presença de metástase à distância .

SHAH, 1996 coloca a classificação TNM entre os fatores dependentes do tumor e que vão influenciar a escolha do tratamento inicial.

BRYNE, 1991 relata que a classificação TNM tem uma concordância, entre diversos examinadores, de 70%, sendo esse dado corroborado por outros autores (FRIEDMAN *et al.*, 1990).

A classificação TNM permite o agrupamento em estádios. Segundo os critérios do AJCC, o estágio '0' engloba a classificação TisN0M0, o estágio 'I' compreende a classificação T1N0M0, o estágio 'II' corresponde à classificação T2N0M0, o estágio 'III' agrega as classificações T3N0M0, T1N1M0, T2N1M0, T3N1M0 e o estágio 'IV' qualquer T, N2 ou N3 e qualquer TN, M1.

Os estádios iniciais apresentam melhores prognósticos, sendo que, as taxas de cura para o estágio I variam entre 75-95%, para o estágio II entre 65-85%, para o estágio III entre 45-65% e para o estágio IV entre 10-35% (SHAH, 1996).



3. CASUÍSTICA E MÉTODOS

Foram estudados 138 pacientes portadores de CEC da cavidade oral, levantados a partir de relatórios de biópsias do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Ciências Médicas (HCFCM) da UNICAMP entre os anos de 1993 e 1997, analisados, retrospectivamente, a partir de questionário aplicado aos prontuários.

Os sítios primários das lesões neoplásicas foram anotados, constando do gráfico a seguir:

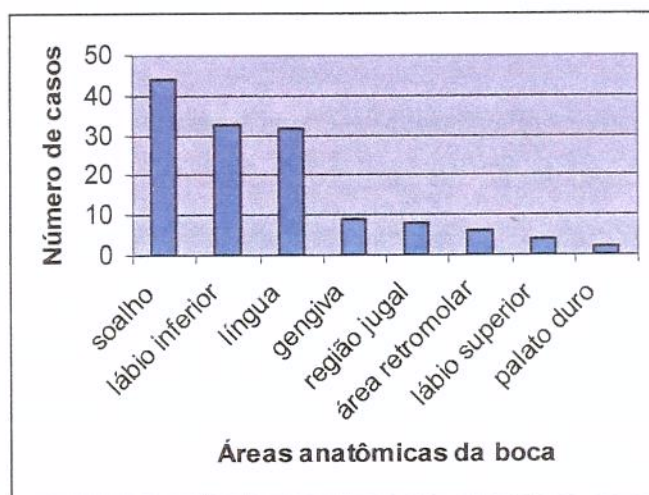


Gráfico 1: Distribuição, segundo a localização anatômica, de 138 biópsias de pacientes portadores de CEC da cavidade oral, realizadas no HCFCM-UNICAMP entre 1993-1997.

As áreas anatômicas mais acometidas foram soalho da boca, lábio inferior e língua.

A maioria dos pacientes era do sexo masculino (83%).

A maior parte dos casos encontrava-se entre a quarta e a sétima décadas da vida.

A maioria da população alvo era composta de pacientes tabagistas (91%) e etilistas (72%).

Casuística

Dos 138 pacientes, foram estudados apenas aqueles cujas biópsias eram de sítios primários na língua e/ou no soalho da boca e sem tratamento prévio.

A amostra populacional ficou constituída por 57 pacientes. Destes, foram excluídos três casos nos quais houve insuficiência de tecido na biópsia e oito casos, nos quais houve perda do material fixado à lâmina ou problemas na técnica imuno-histoquímica que não permitiram a identificação das células a serem estudadas, mesmo após várias repetições. Portanto, a avaliação de parâmetros do infiltrado inflamatório foi realizada em 46 pacientes.

Em relação ao estadiamento, oito eram estágio I, quatro estágio II, 18 estágio III e 16 estágio IV. Em relação ao 'N', 18 eram 'N0' e 28 eram 'N+'.

Ao final do estudo, 26 pacientes tinham ido a óbito pela doença ou estavam com evidência de doença (CED), um paciente foi a óbito por outro motivo, enquanto que 11 encontravam-se sem evidência de doença (SED). Em 8 pacientes não puderam ser obtidas informações quanto à evolução da doença. O período de seguimento variou de no mínimo três anos a no máximo seis anos.

Método

Todas as biópsias dos 46 pacientes, foram fixadas em formalina 10% e incluídas em parafina. As reações imuno-histoquímicas em secções de parafina foram realizadas, usando-se o método avidina-biotina-peroxidase, utilizando-se os seguintes anticorpos (DAKO Co.®):

- CD45RO, UCHL1 : anticorpo monoclonal que reconhece especificamente o marcador de superfície CD45 que ocorre na maioria das células T.
- CD20, L26: anticorpo monoclonal que é dirigido contra um antígeno presente na maioria das células B.
- CD45RO, OPD4: anticorpo monoclonal OPD4, pertencente ao grupo do CD45RO, que fixa-se fortemente na membrana de linfócitos com fenótipos auxiliares/indutores.

- CD8, C8/144B: anticorpos monoclonais que reagem com uma proteína equivalente à molécula de CD8, fixando-se nas células T citotóxicas/supressoras.

Após o preparo dos cortes de parafina em lâminas siliconizadas para aumentar a sua aderência, realizaram-se as reações de imunoperoxidase, no laboratório de imunohistoquímica da FCM da UNICAMP, utilizando os anticorpos acima descritos. A reação de imunoperoxidase compreendeu as etapas de desparafinização e de coloração, conforme HSU *et al.*, 1981.

Análise das lâminas

As lâminas foram analisadas em microscopia óptica, utilizando-se aumento de 40X e objetiva de 10mm, sendo avaliados os seguintes parâmetros histopatológicos: grau de diferenciação do CEC, padrão de invasão, intensidade do infiltrado inflamatório geral, intensidade do infiltrado de linfócitos T, intensidade do infiltrado de linfócitos B, contagem de linfócitos T CD4+ e CD8+ em três campos distintos e em cortes seriados. Todos os parâmetros foram analisados, em parte dos casos, na região intratumoral, na região peritumoral, no epitélio displásico e no epitélio normal.

O grau de diferenciação foi avaliado como bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado. O padrão de invasão foi avaliado como compressivo, cordões grossos, cordões finos, células isoladas ou como *in situ* (não invasivo). A intensidade do infiltrado inflamatório geral foi avaliada semi-quantitativamente, sendo denominado como intenso (+ + +), moderado (+ +), discreto (+) ou ausente (0). A intensidade do infiltrado inflamatório de linfócitos T e B foi avaliada semi-quantitativamente, sendo chamado de intenso (maior que 60 células/campo), moderado (30 a 60 células/campo) e escasso (menor que 30 células/campo) ou ausente. A avaliação dos linfócitos CD4+ e CD8+ foi realizada de modo quantitativo, contando-se as células em três campos distintos e obtendo-se a média aritmética.

As proporções entre as contagens de linfócitos CD4+ e linfócitos CD8+ foi obtida no tecido peri e intratumoral, quando possível, estabelecendo-se a proporção maior ou menor que a unidade como parâmetro para a análise.

As fotos a seguir referem-se ao caso número 26 (anexo 1 - paciente do sexo masculino, 47 anos, portador de CEC de soalho da boca T4N3M0):

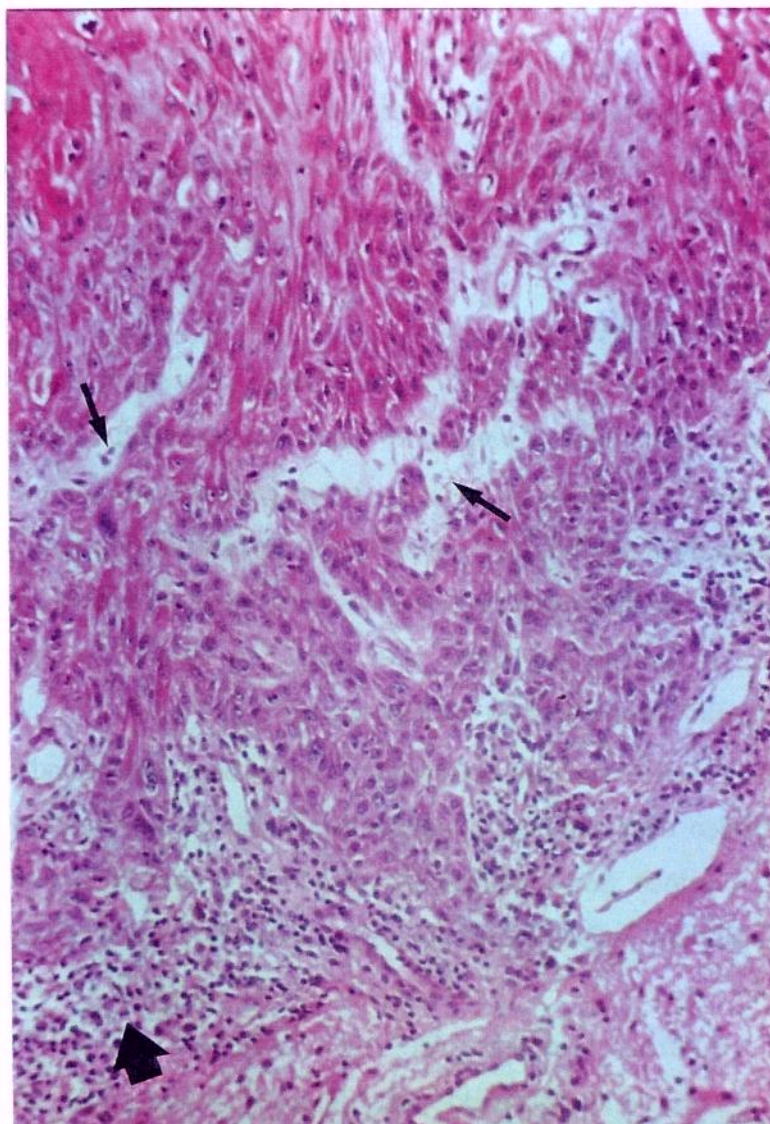


Figura 1: Observar que o infiltrado inflamatório peritumoral (seta maior) é mais intenso do que o intratumoral (setas menores). HE x132.

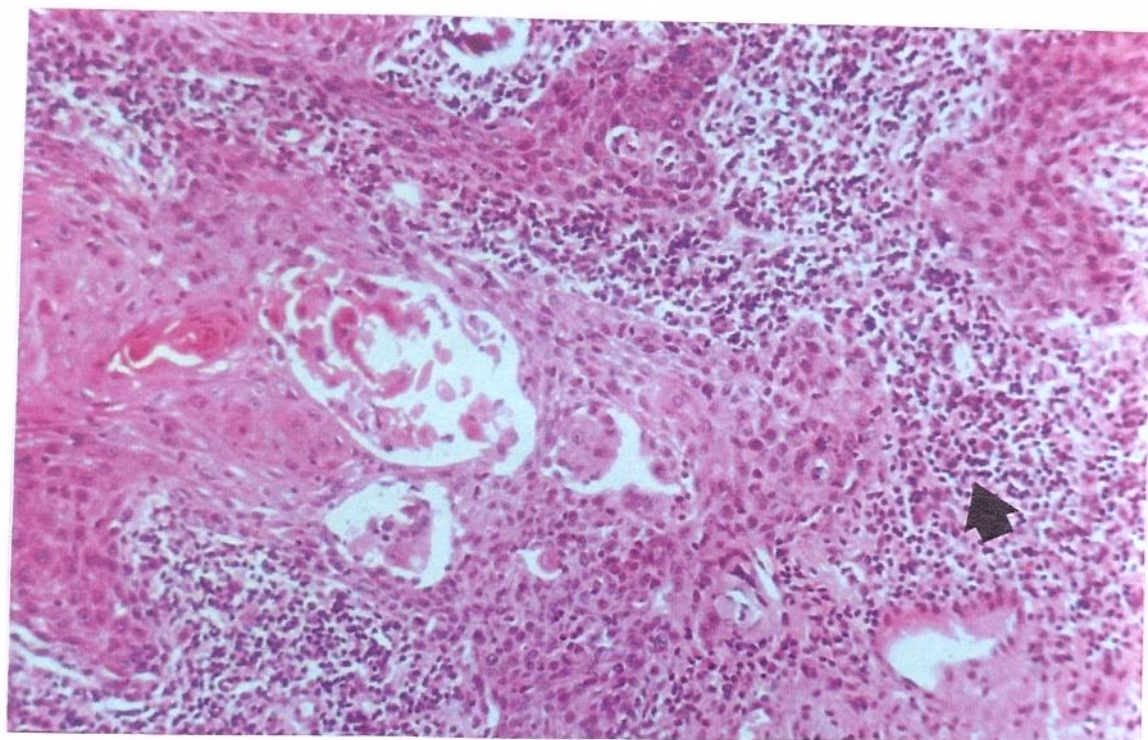


Figura 2: Infiltrado inflamatório (seta) circundando os agrupamentos carcinomatosos. Este infiltrado será analisado nas figuras seguintes (3 a 6), com os diferentes anticorpos utilizados e em cortes seriados. (HE x132).

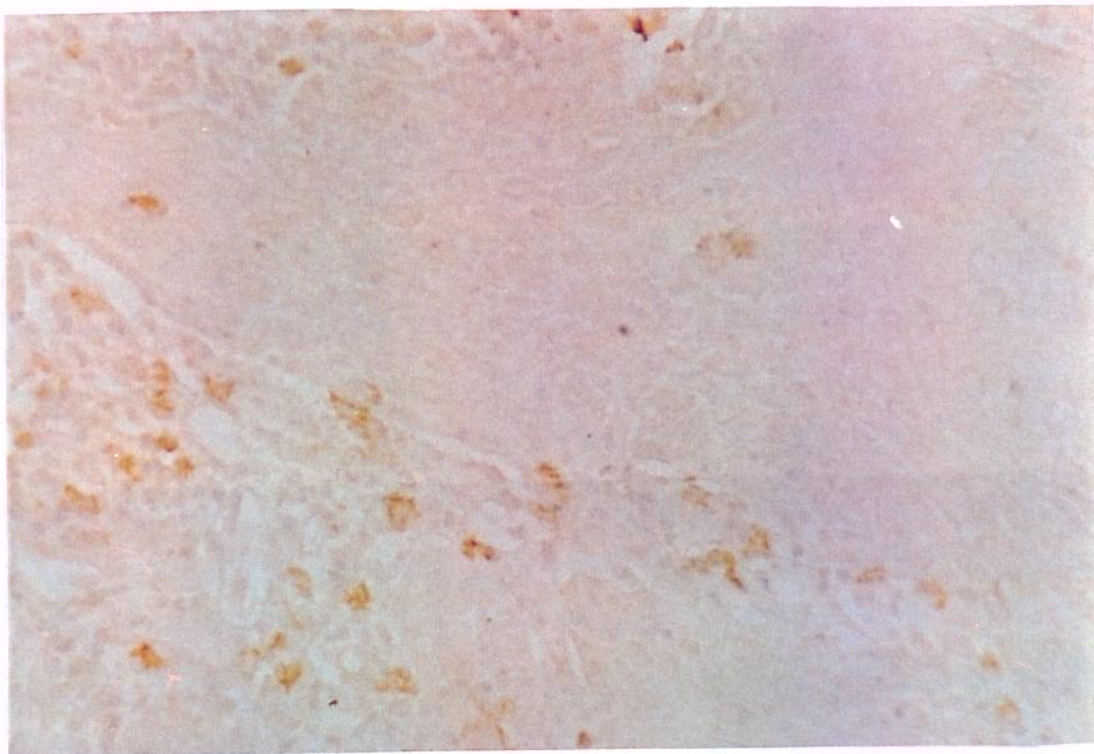


Figura 3: Linfócitos B positivos para o anticorpo CD20 (técnica avidina-biotina-peroxidase x330)

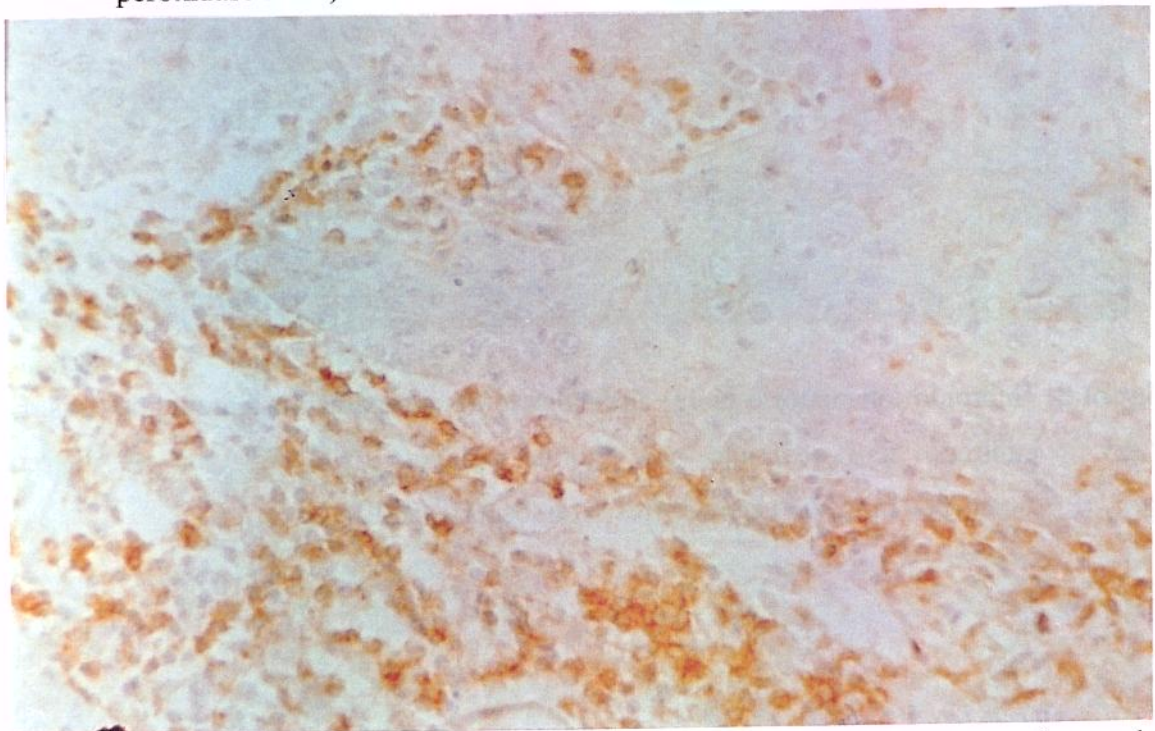


Figura 4: Linfócitos T positivos para o anticorpo CD45RO. Observar que o número de linfócitos T é significativamente maior que o de linfócitos B mostrado na figura anterior (técnica avidina-biotina-peroxidase x330).

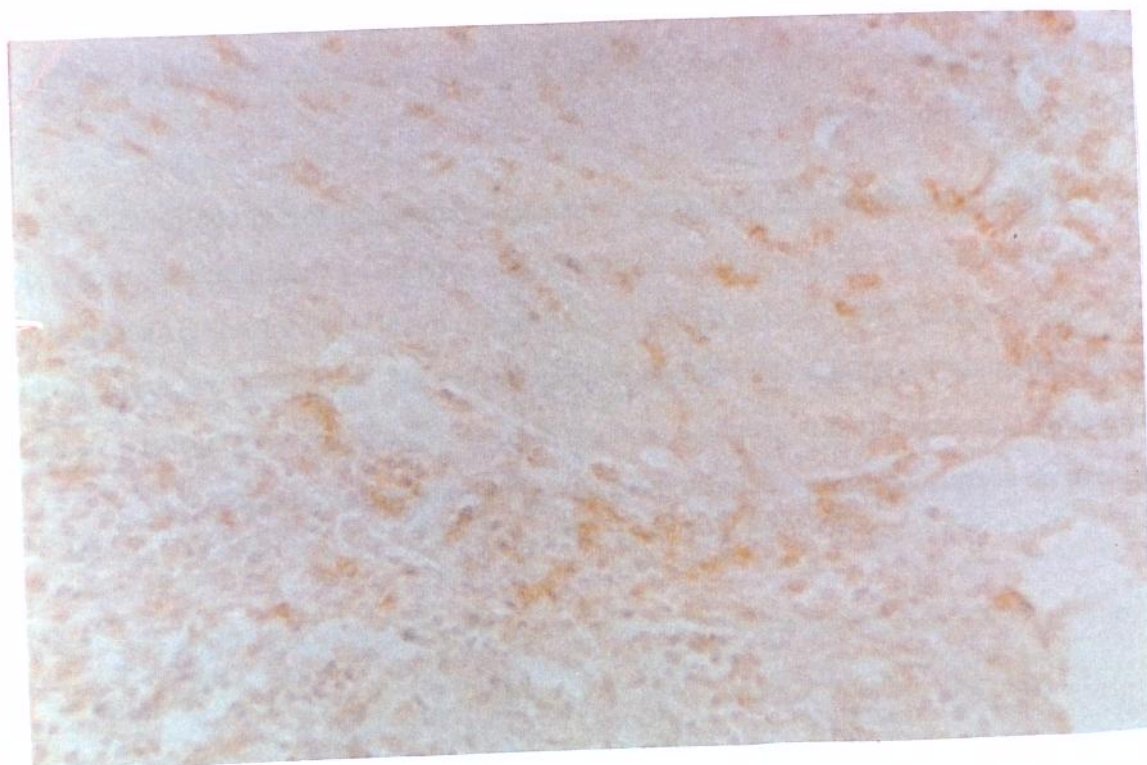


Figura 5: Linfócitos T CD8+ (técnica avidina-biotina-peroxidase x330).

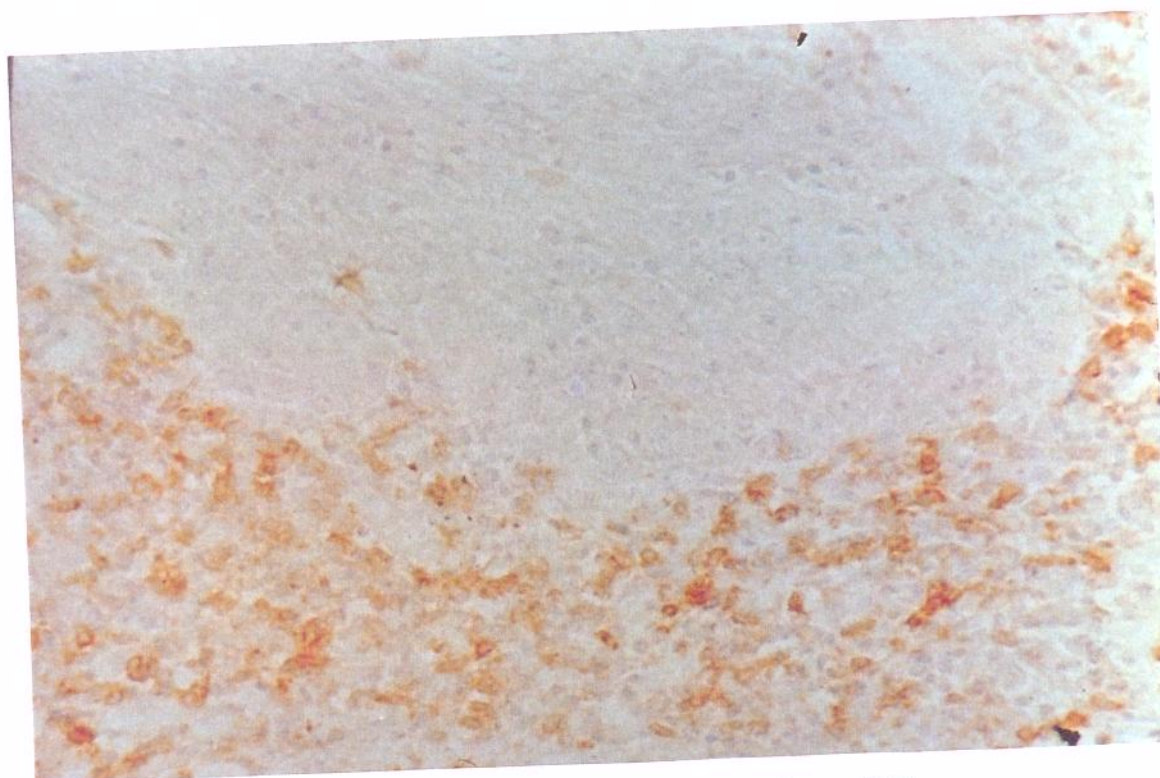


Figura 6: Linfócitos T CD4+ (técnica avidina-biotina-peroxidase x330).

Os casos foram, avaliados também, quanto ao aspecto das lesões neoplásicas, descrito nos prontuários, como úlcero-infiltrativo, úlcero-vegetante, vegetante, ulcerado, leucoplásico ou eritroplásico.

Os dados obtidos da análise do infiltrado inflamatório foram confrontados com dados do estadiamento TNM e com a sobrevida dos doentes. Construíram-se grupos de acordo com o estágio TNM (I+II e III+IV) e a situação do 'N' (N0 e N+). Os achados do infiltrado inflamatório geral e dos subtipos linfocitários (B, T, CD4+ e CD8+) foram confrontados com cada um dos grupos e com curvas de probabilidade de sobrevida, visando a obtenção de correlação anatomoclínica, bem como, inferências prognósticas.



4. RESULTADOS

• **Análise qualitativa do infiltrado inflamatório geral intratumoral**

A análise do infiltrado inflamatório geral intratumoral foi possível em 44 doentes, do total de 46 que foram avaliados. Na maioria dos casos, o infiltrado inflamatório geral intratumoral era leve (65,9%), sendo moderado em 29,5% e intenso em raros casos (4,5%). Ao se confrontar essa análise com a presença de metástases cervicais (N+) e com o estadiamento TNM, obteve-se um índice de significância de $p=0,0029$ e $p=0,0047$ respectivamente, como mostram as tabelas 3 e 4:

Tabela 3: Análise do infiltrado inflamatório geral intratumoral conforme a presença de metástases cervicais (N+) em 44 doentes.

Infiltrado inflamatório geral intratumoral	Número de casos (n)	%	N+	%
+	29	66	23	79,3
++	13	29,5	5	38,5
+++	2	4,5	0	0
Total	44	100		

+ = discreto; ++ = moderado; +++ = intenso

Teste Exato de Fisher $p=0,0029$

Tabela 4: Análise do infiltrado inflamatório geral intratumoral conforme o estadiamento TNM

Infiltrado inflamatório geral intratumoral	Estádio (n)		Total
	I/II (10)	III/IV (34)	
+	3 (10,4 %)	26 (89,6%)	29
++	5 (38,5%)	8 (61,5%)	13
+++	2 (100%)	0	2

+ = discreto; ++ = moderado; +++ = intenso

Teste Exato de Fisher $p=0,0047$

As curvas de sobrevida para as diversas intensidades do infiltrado inflamatório geral intratumoral não mostraram diferenças significativas ($p=0,7957$) como mostra o gráfico:

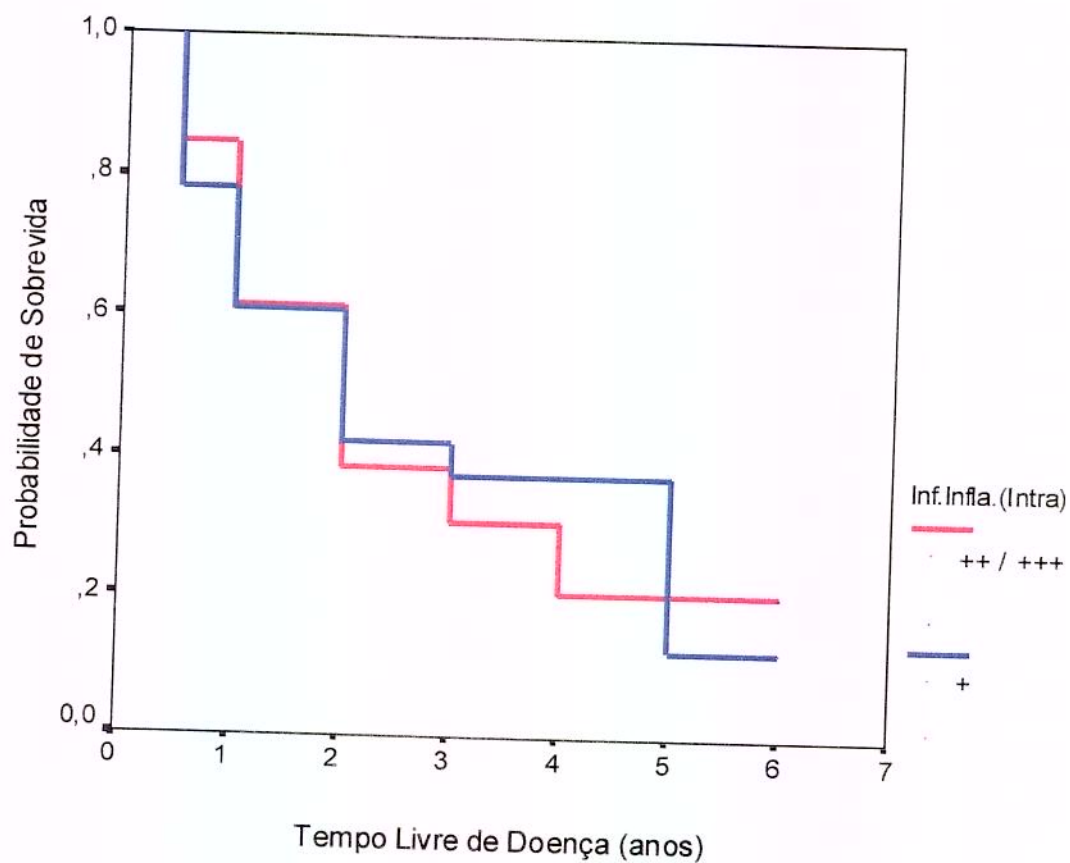


Gráfico 2: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme a intensidade do infiltrado inflamatório intratumoral.

• **Análise qualitativa do infiltrado inflamatório geral peritumoral**

A análise do infiltrado inflamatório geral peritumoral foi possível em 28 casos dos 46 pacientes estudados. Em contraste com o infiltrado intratumoral, era intenso em 17 casos (60,7%), sendo leve e moderado em 11 (39,2%).

As correlações desse parâmetro com o "N+" e com o estadiamento TNM não obtiveram significância ($p=0,435$ e $p=0,419$, respectivamente), como mostram as tabelas 5 e 6:

Tabela 5: Análise do infiltrado inflamatório geral peritumoral conforme a presença de metástases cervicais (N+)

Infiltrado inflamatório peritumoral	Número de casos (n)	%	N+	%
+ / + +	11	39	8	72,7
+ + +	17	61	9	52,9
Total	28	100		

+ / + + = discreto ou moderado; + + + = intenso

Teste Exato de Fisher $p=0,435$

Tabela 6: Análise do infiltrado inflamatório geral peritumoral conforme o estadiamento TNM

Infiltrado inflamatório geral peritumoral	Estádio (n)		Total
	I/II (8)	III/IV (n=20)	
+ / + +	2 (18,2 %)	9 (81,8%)	11
+ + +	6 (35,3%)	11 (64,7%)	17

+ / + + = discreto ou moderado; + + + = intenso

Teste Exato de Fisher $p=0,419$

As curvas de sobrevida para as diversas intensidades do infiltrado inflamatório geral peritumoral não mostraram diferenças significativas ($p=0,6932$), como mostra o gráfico:

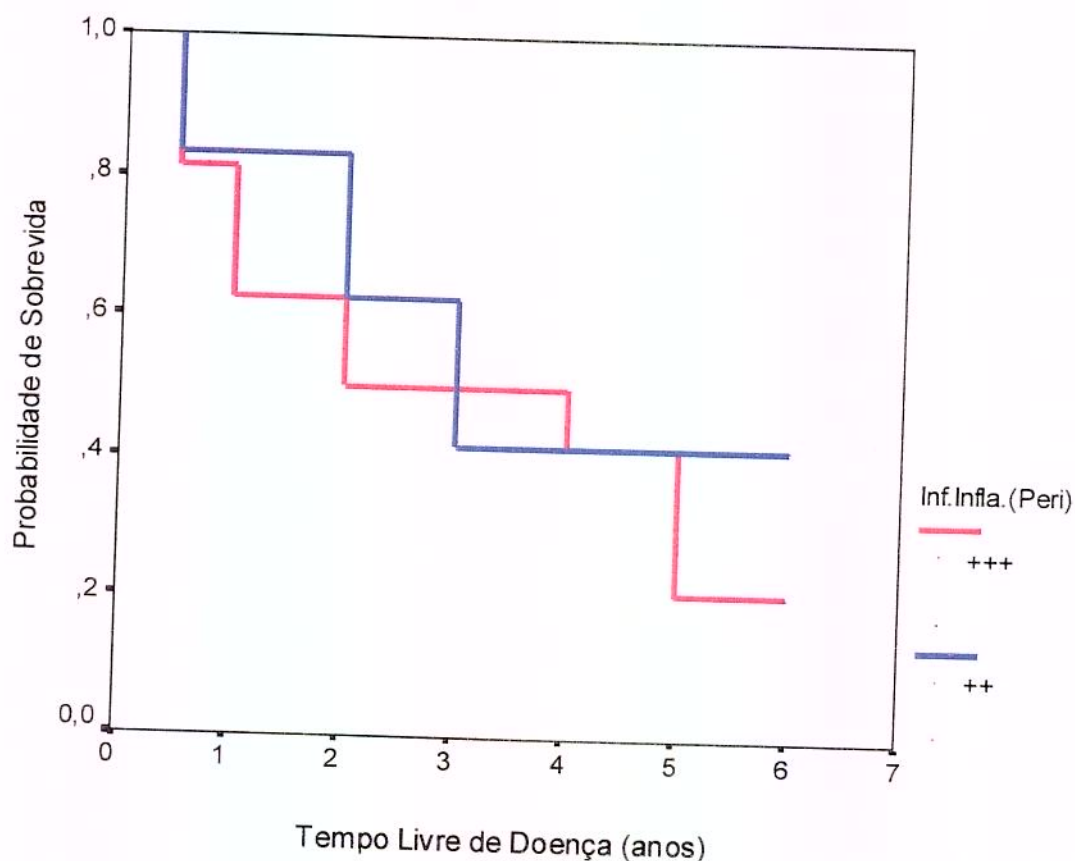


Gráfico 3: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme a intensidade do infiltrado inflamatório geral peritumoral.

A análise do infiltrado inflamatório geral no epitélio normal e no epitélio displásico foi possível em 20 casos e em seis casos, respectivamente. Observou-se que o infiltrado era leve em 60% dos epitélios normais, contrastando com as áreas de epitélio displásico, nas quais o infiltrado inflamatório sempre era moderado ou intenso. Notou-se que, à medida em que se afastava do tumor, ocorria uma diminuição do infiltrado inflamatório.

• **Análise semiquantitativa do infiltrado linfocitário T intratumoral**

A análise do infiltrado linfocitário T intratumoral foi possível em 44 casos. Observou-se que era leve, moderado e intenso em 31,8%, 38,6% e 29,5% dos casos respectivamente, não havendo correlação significativa entre esse parâmetro e o "N+" ou com o estadiamento TNM, conforme mostram as tabelas 7 e 8:

Tabela 7: Análise do infiltrado linfocitário T intratumoral conforme a presença de metástases cervicais (N+)

Infiltrado linfocitário T intratumoral	Número de casos	%	N+	%
+	14	31,8	10	71,4
++	17	38,6	11	64,7
+++	13	29,6	7	53,8
Total	44	100		

+ = discreto; ++ = moderado; +++ = intenso

Teste Qui-quadrado $p=0,633$

Tabela 8: Análise do infiltrado linfocitário T intratumoral conforme o estadiamento TNM

Infiltrado linfocitário T intratumoral	Estádio (n)		Total
	I/II (10)	III/IV (34)	
+	2 (14,3 %)	12 (85,7%)	14
++	4 (23,5%)	13 (76,5%)	17
+++	4 (30,8%)	9 (69,2%)	13

+ = discreto; ++ = moderado; +++ = intenso

Teste Exato de Fisher $p=0,540$

As curvas de probabilidade de sobrevida para as diversas intensidades do infiltrado linfocitário T intratumoral não apresentaram diferenças significativas ($p=0,5504$) como mostra o gráfico:

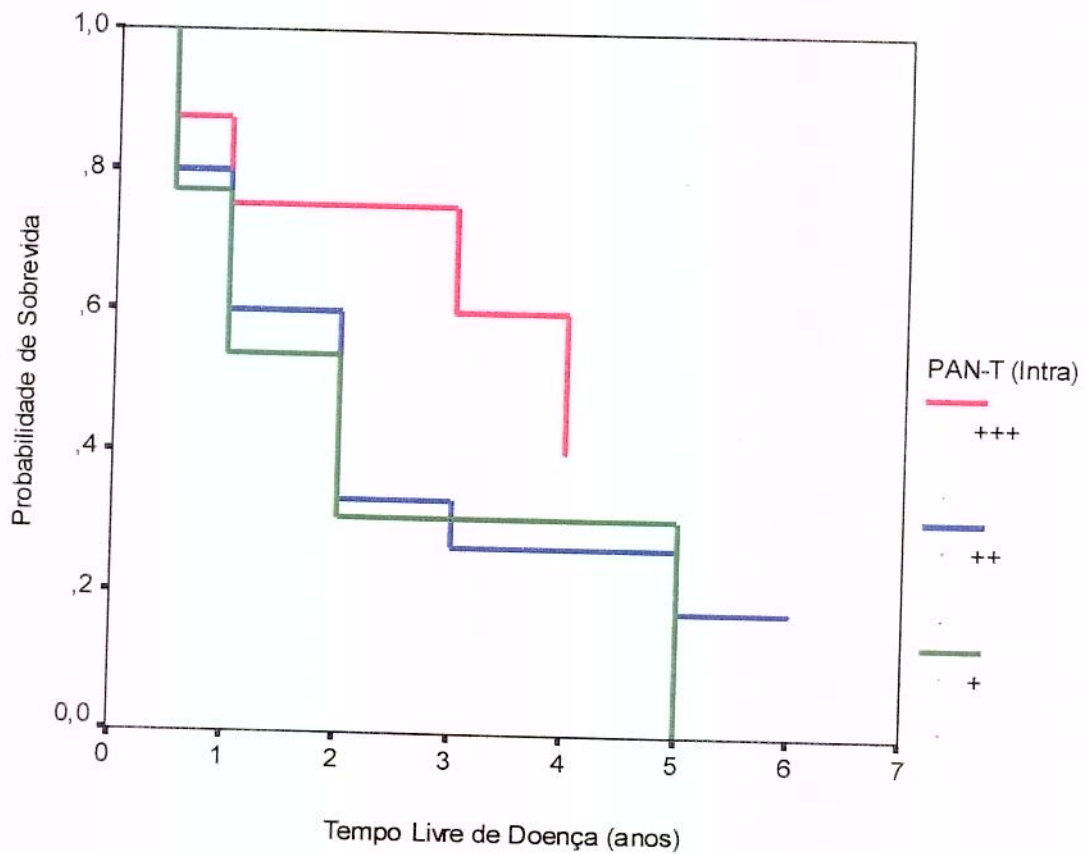


Gráfico 4: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme o infiltrado linfocitário T intratumoral

• **Análise semiquantitativa do infiltrado linfocitário T peritumoral**

A análise do infiltrado linfocitário T peritumoral foi possível em 27 casos. Na maioria dos casos ele era intenso (81,5%). As suas correlações com o 'N+' e com o estadiamento TNM não se mostraram significativas ($p=0,621$ e $p=1,000$ respectivamente) como mostram as tabelas 9 e 10:

Tabela 9: Análise do infiltrado linfocitário T peritumoral, conforme a presença de metástases cervicais (N+)

Infiltrado linfocitário T peritumoral	Número de casos (n)	%	N+	%
++	5	18,5	4	80
+++	22	81,5	13	59
Total	27	100		

++ = moderado; +++ = intenso

Teste Exato de Fisher $p=0,621$

Tabela 10: Análise do infiltrado linfocitário T peritumoral conforme o estadiamento TNM

Infiltrado linfocitário T peritumoral	Estádio (n)		Total
	I/II (7)	III/IV (20)	
++	1 (20 %)	4 (80%)	5
+++	6 (27,3%)	16 (72,7%)	22

++ = moderado; +++ = intenso

Teste Exato de Fisher $p=1,000$

• **Análise semiquantitativa do infiltrado linfocitário B intratumoral**

A análise do infiltrado linfocitário B intratumoral foi possível em 44 casos. Em 52,2% dos casos, o infiltrado mostrava-se ausente e era leve ou moderado em 47,7% dos casos. Em nenhum caso foi observado como intenso.

A correlação com o 'N+' mostrou significância ($p=0,0072$), sendo que quando o infiltrado estava ausente havia presença de metástases cervicais em 82,61% dos casos, enquanto que quando o infiltrado estava presente esta porcentagem era de 42,86%, como mostra a tabela 11:

Tabela 11: Análise do infiltrado linfocitário B intratumoral conforme a presença de metástases cervicais (N+)

Infiltrado linfocitário B intratumoral	Número de casos	%	N+	
			N+	%
0	23	52,3	19	82,6
+ / + +	21	47,7	9	42,9
Total	44	100		

0 = ausente; + / + + = discreto ou moderado

Teste Exato de Fisher $p=0,0072$

A correlação dos achados do infiltrado linfocitário B com o estadiamento TNM, no entanto, não mostrou significância ($p=0,481$), como mostra a tabela 12:

Tabela 12: Análise do infiltrado linfocitário B intratumoral conforme o estadiamento TNM

Infiltrado linfocitário B intratumoral	Estádio (n)		Total
	I / II (10)	III / IV (34)	
0	4 (17,4 %)	19 (82,6%)	23
+ / + +	6 (28,6%)	15 (71,4%)	21

0 = ausente; + / + + = discreto ou moderado

Teste Exato de Fisher $p=0,481$

As curvas de sobrevida para as diversas intensidades do infiltrado linfocitário B intratumoral não mostraram diferenças significativas ($p=0,8486$) como mostra o gráfico:

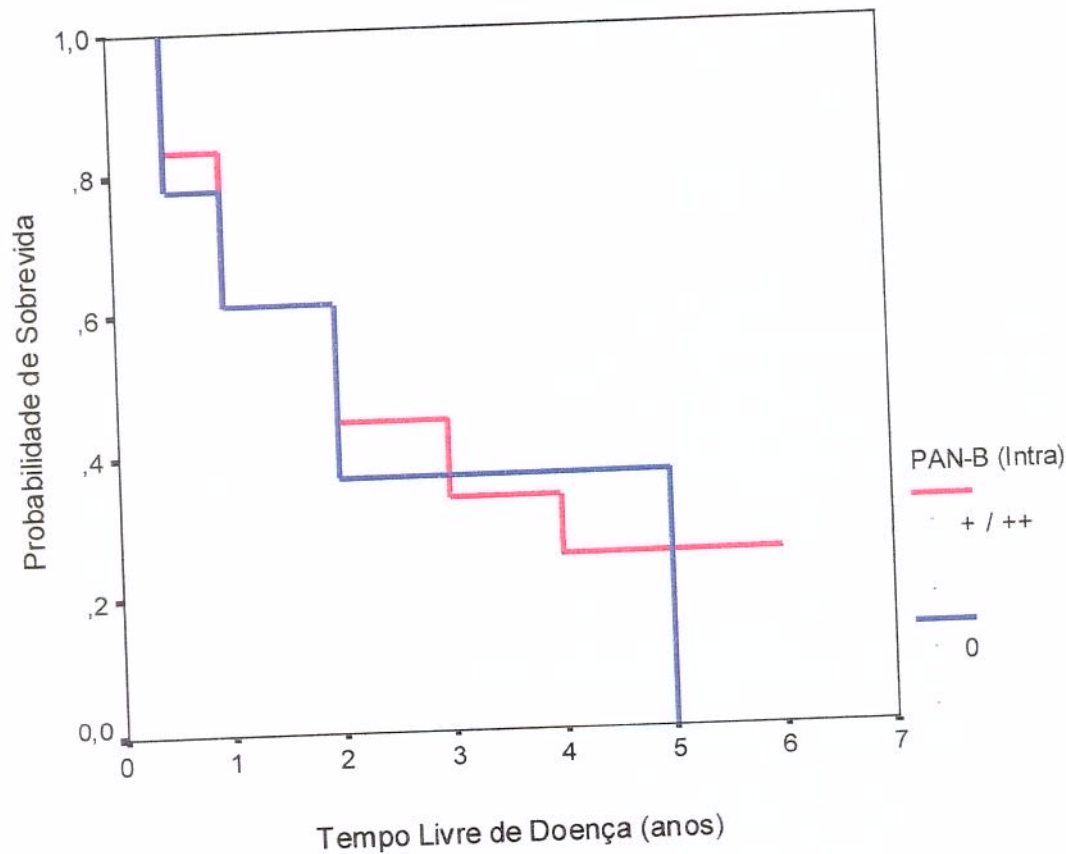


Gráfico 5: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme o infiltrado linfocitário B intratumoral

• **Análise semiquantitativa do infiltrado linfocitário B peritumoral**

A análise do infiltrado de linfócitos B peritumoral foi possível em 27 casos. Era ausente ou leve em aproximadamente metade dos casos, diferindo do infiltrado linfocitário T que se mostrava intenso na maioria dos casos. As correlações com o 'N+' e com o estadiamento TNM não mostraram significância ($p=0.440$ e $p=0,209$ respectivamente), como mostram as tabelas 13 e 14:

Tabela 13: Análise do infiltrado linfocitário B peritumoral conforme a presença de metástases cervicais (N+)

Infiltrado linfocitário B peritumoral	Número de casos (n)	%	N+	%
0 / +	13	48,1	7	53,9
++ / +++	14	51,9	10	71,4
Total	27	100		

0 / + = ausente ou discreto; ++ / +++ = moderado ou intenso

Teste Exato de Fisher $p=0,440$

Tabela 14: Análise do infiltrado linfocitário B peritumoral, conforme o estadiamento TNM

Infiltrado linfocitário B peritumoral	Estádio (n)		Total
	I / II (13)	III / IV (14)	
0 / +	5 (38,5 %)	8 (61,5%)	13
++ / +++	2 (14,3%)	12 (85,7%)	14

0 / + = ausente ou discreto; ++ / +++ = moderado ou intenso

Teste Exato de Fisher $p=0,209$

As curvas de sobrevida para as diversas intensidades de infiltrado linfocitário B peritumoral não apresentaram diferenças significativas ($p=0,7905$), como mostra o gráfico:

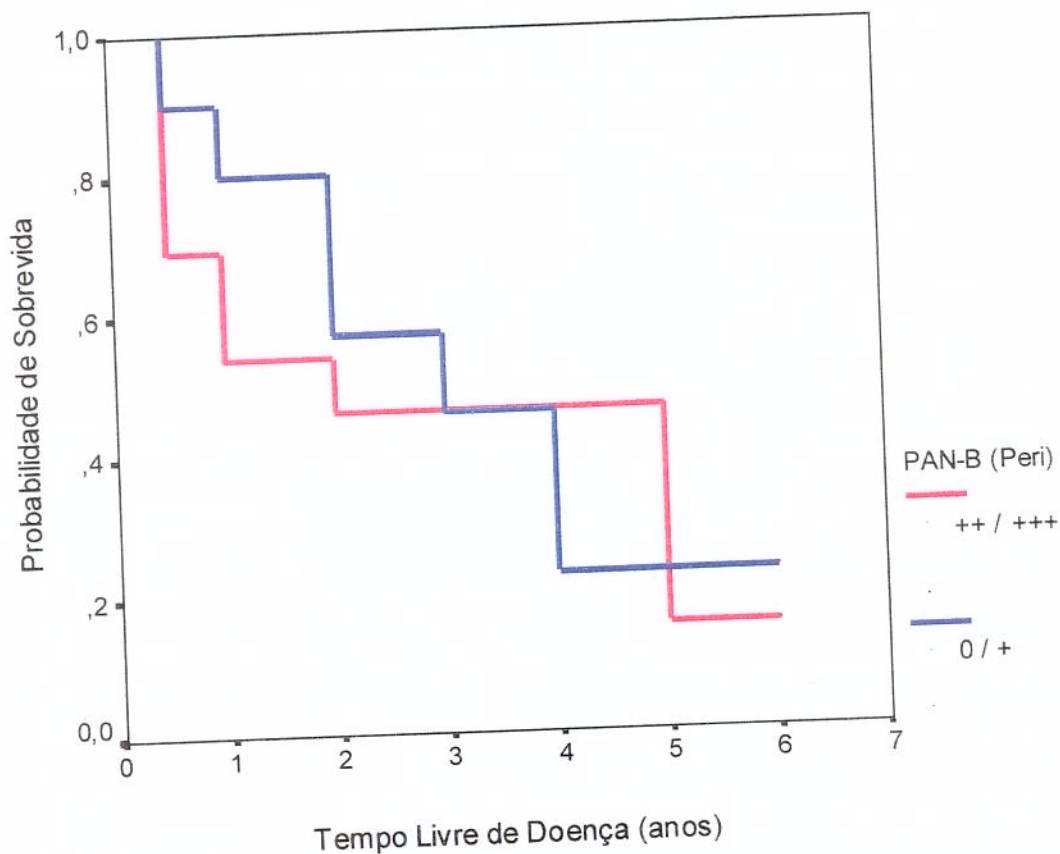


Gráfico 6: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme o infiltrado linfocitário B peritumoral

• **Análise quantitativa do infiltrado linfocitário CD4+**

A análise do infiltrado de linfócitos T , CD4+, foi possível em 44 casos nas áreas intratumorais e em 27 casos nas áreas peritumorais. Observou-se uma maior concentração desse subtipo de linfócito nas áreas peritumorais em relação às áreas intratumorais, áreas de displasia e epitélio normal. As correlações dos achados com o 'N+' e com o estadiamento TNM não mostraram significância, como mostram as tabelas 15 e 16:

Tabela 15: Análise do infiltrado linfocitário CD4+, conforme a presença ou ausência de metástases cervicais (N0/N+)

CD4	N0				N+				
	n	média	mediana	dp	n	média	mediana	dp	
Intratumoral	16	15,6	3,9	31,1	28	5,1	3,6	6,0	0,5314
Peritumoral	10	50,9	32,3	56,8	17	36	29	25,9	0,6877
Epitélio normal	6	19,7	6,6	25,6	11	20	16,6	15,2	0,5131
Epitélio displásico	3	24,3	24,3	23,7	3	64,3	92,6	55,6	

Teste não-paramétrico de Wilcoxon

Tabela 16: Análise do infiltrado linfocitário CD4+, conforme o estadiamento TNM

CD4	I + II				III + IV				p
	n	média	mediana	dp	n	média	mediana	dp	
Intratumoral	10	20,9	4,1	38,5	34	5,4	3,6	6,58	0,5541
Peritumoral	7	50,8	30,6	68,5	20	38,2	31,8	25,3	0,7608
Epitélio normal	4	19,5	4,5	31,5	13	20	16,6	14,8	
Epitélio displásico	3	24,3	24,3	23,7	3	64,3	92,6	55,5	

Teste não-paramétrico de Wilcoxon

• **Análise quantitativa do infiltrado linfocitário CD8+**

A análise do infiltrado de linfócitos T, CD8+, foi possível em 40 casos nas áreas intratumorais e em 25 casos nas áreas peritumorais. Observou-se um maior número desse subtipo de linfócito nas áreas peritumorais em relação às outras áreas estudadas (intratumorais, displasia e epitélio normal). Não se encontrou correlação significativa com o 'N+' ou com o estadiamento TNM como mostram as tabelas 17 e 18:

Tabela 17: Análise do infiltrado linfocitário CD8+, conforme a presença ou ausência de metástases cervicais (N0/N+)

CD8	N0				N+				P
	n	média	mediana	dp	n	média	mediana	dp	
Intratumoral	14	19,9	2,3	33,6	26	7,9	3,5	9,6	0,7760
Peritumoral	9	44,2	21,6	66,7	16	40	33	28,6	0,2573
Epitélio normal	5	8,1	6,3	6,9	10	31,7	31,6	23,7	0,0979
Epitélio displásico	3	8,1	4,6	9,6	2	41,5	41,5	18,2	

Teste não-paramétrico de Wilcoxon

Tabela 18: Análise do infiltrado linfocitário CD8+, conforme o estadiamento TNM

CD8	I + II				III + IV				P
	n	média	mediana	dp	n	média	mediana	dp	
Intratumoral	9	30,2	9,3	38,7	31	6,9	2,6	9,1	0,1226
Peritumoral	7	53,0	25,6	74,3	18	37,0	30,5	28,3	0,6068
Epitélio normal	3	9,0	5,0	9,6	12	27,5	20,6	23,6	
Epitélio displásico	3	8,1	4,6	9,6	2	41,5	41,5	18,2	

Teste não-paramétrico de Wilcoxon

• **Análise da razão de linfócitos CD4/CD8 intratumoral**

A análise da razão entre os linfócitos auxiliares ou indutores e os linfócitos citotóxicos ou supressores no parênquima tumoral foi possível de ser medida em 40 casos. Observou-se que ela era menor ou igual a 1 em 60% dos casos e maior que 1 em 40% dos casos, ou seja, na maior parte dos casos havia mais ou igual número de linfócitos citotóxicos ou supressores (CD8+) dentro do tumor do que linfócitos auxiliares ou indutores (CD4+). As correlações com o 'N+' e com o estadiamento TNM não mostraram significância, como mostram as tabelas 19 e 20:

Tabela 19: Análise da razão CD4/CD8 intratumoral, conforme a presença de metástases cervicais (N+)

CD4/CD8	Número de casos	%	N+	%
< ou = 1	24	60	16	66,67
> 1	16	40	10	62,50
Teste do Qui-quadrado p=0,787				

Tabela 20: Análise da razão CD4/CD8 intratumoral, conforme o estadiamento TNM

CD4/CD8	Número de casos	%	I / II	III / IV
< ou = 1	24	60	6 (25 %)	18 (75 %)
> 1	16	40	3 (18,7%)	13 (81,3%)
Teste exato de Fisher p=0,717				

As curvas de probabilidade de sobrevida dos dois grupos não mostraram diferenças significativas ($p=0,6836$), como mostra o gráfico:

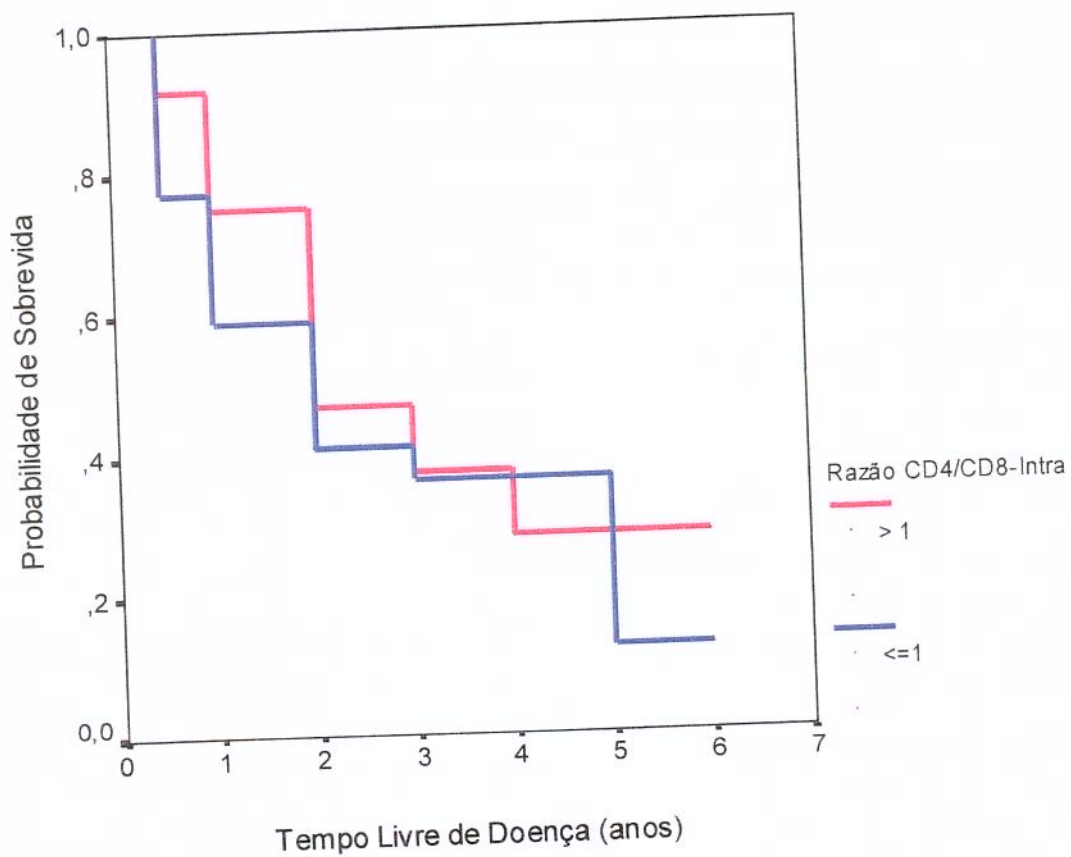


Gráfico 7: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme a razão CD4/CD8 intratumoral

- **Análise da razão de linfócitos CD4/CD8 peritumoral**

A análise da proporção entre linfócitos auxiliares ou indutores (CD4+) e linfócitos citotóxicos ou supressores (CD8+) no estroma peritumoral foi possível em 25 casos. Observou-se que essa proporção era menor ou igual a 1 em 48% dos casos e era maior que 1 em 52%, indicando que, na maior parte dos casos, havia um número menor de linfócitos CD8+ em relação ao número de linfócitos CD4+ na periferia do tumor, inversamente ao observado nas áreas intratumorais.

As correlações com o 'N+' e com o estadiamento TNM não mostraram significância, como mostra a tabela 21:

Tabela 21: Análise da razão CD4/CD8 peritumoral, conforme a presença de metástases cervicais (N+)

CD4/CD8	Número de casos	%	N+	%
< ou = 1	12	48	8	66,7
> 1	13	52	8	61,5

Teste exato de Fisher p=1,000

Tabela 22: Análise da razão CD4/CD8 peritumoral conforme o estadiamento TNM

CD4/CD8	Número de casos	%	I / II	III / IV
< ou = 1	12	48	4 (33,3 %)	8 (66,7 %)
> 1	13	52	3 (23 %)	10 (77 %)

Teste exato de Fisher p=0,673

As curvas de probabilidade de sobrevida dos dois grupos não mostraram diferenças significativas ($p=0,3093$) entre si, como mostra o gráfico:

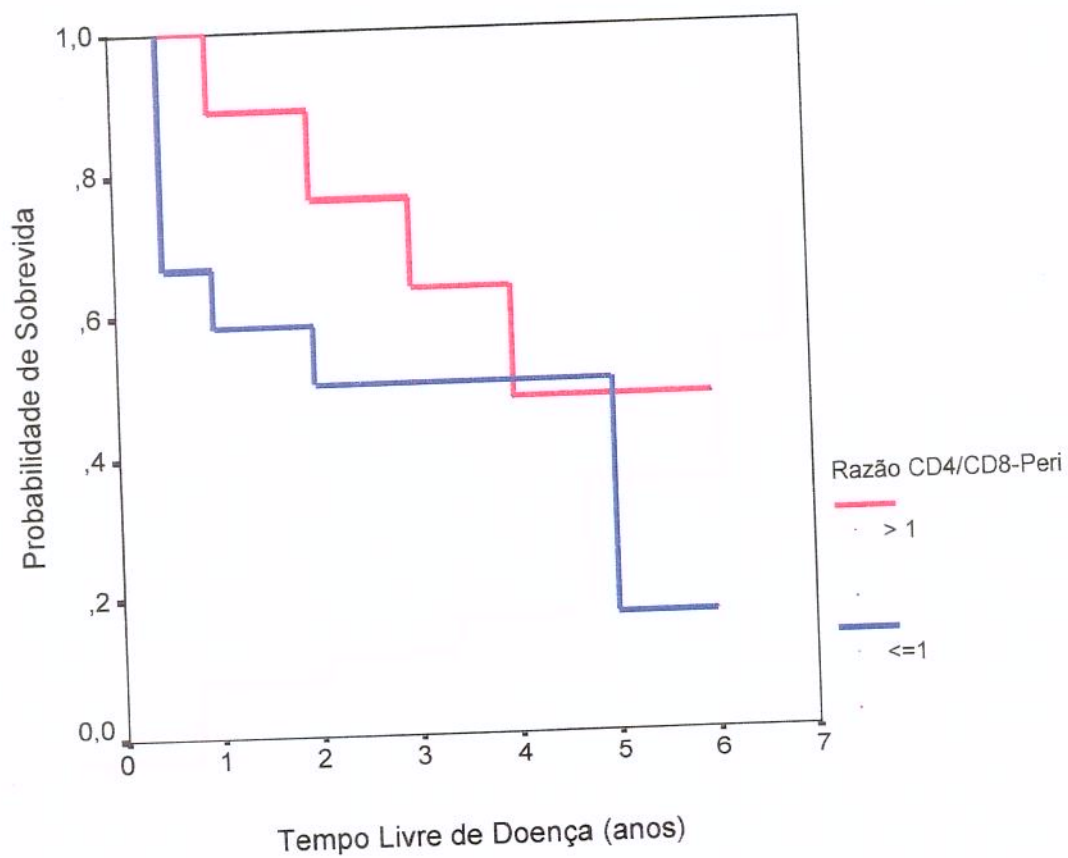


Gráfico 8: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme a razão CD4/CD8 peritumoral

- **Análise de outras curvas de probabilidade de sobrevida da população estudada**

A avaliação da sobrevida foi possível em 38 doentes dos 46 estudados. A probabilidade de sobrevida global destes doentes foi de 20% em 5 anos, como mostra o gráfico:

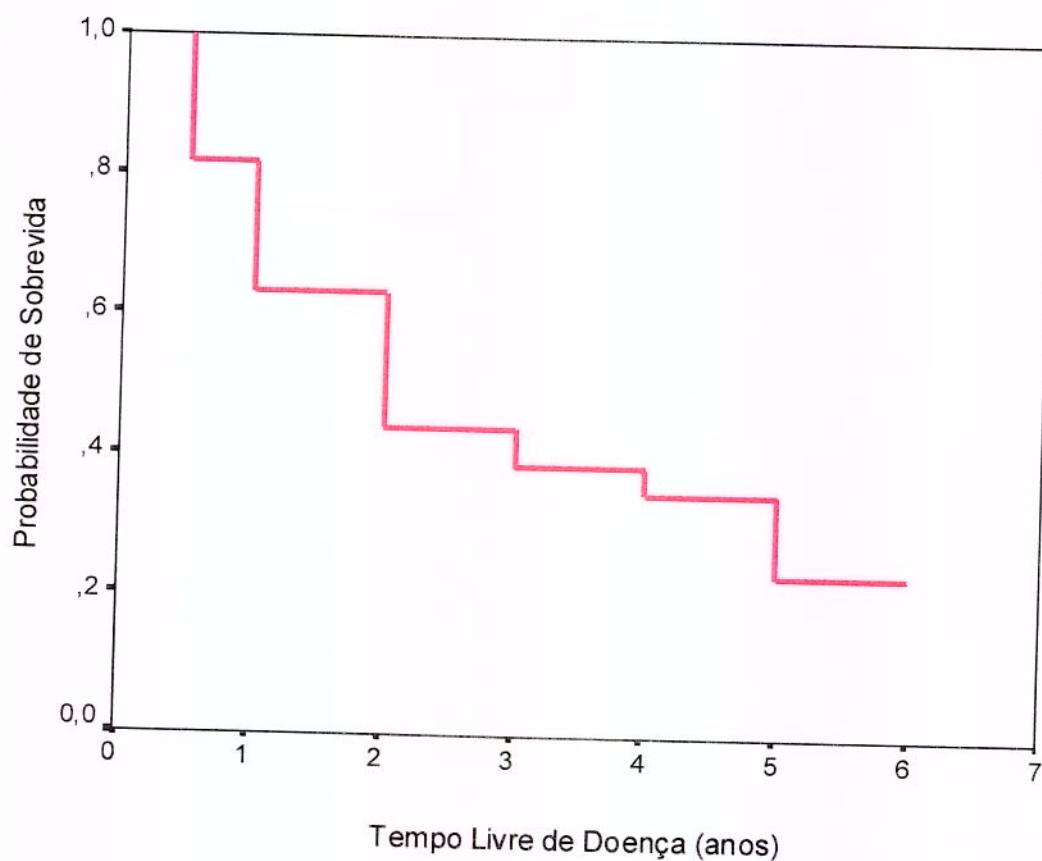


Gráfico 9: Análise da probabilidade de sobrevida global de 38 pacientes portadores de CEC da língua e soalho de boca, levantados no HCFCM da UNICAMP.

As análises de probabilidade de sobrevida conforme o 'N' e conforme o estadiamento TNM mostraram diferenças com significância estatística ($p < 0,05$), conforme mostram os gráficos:

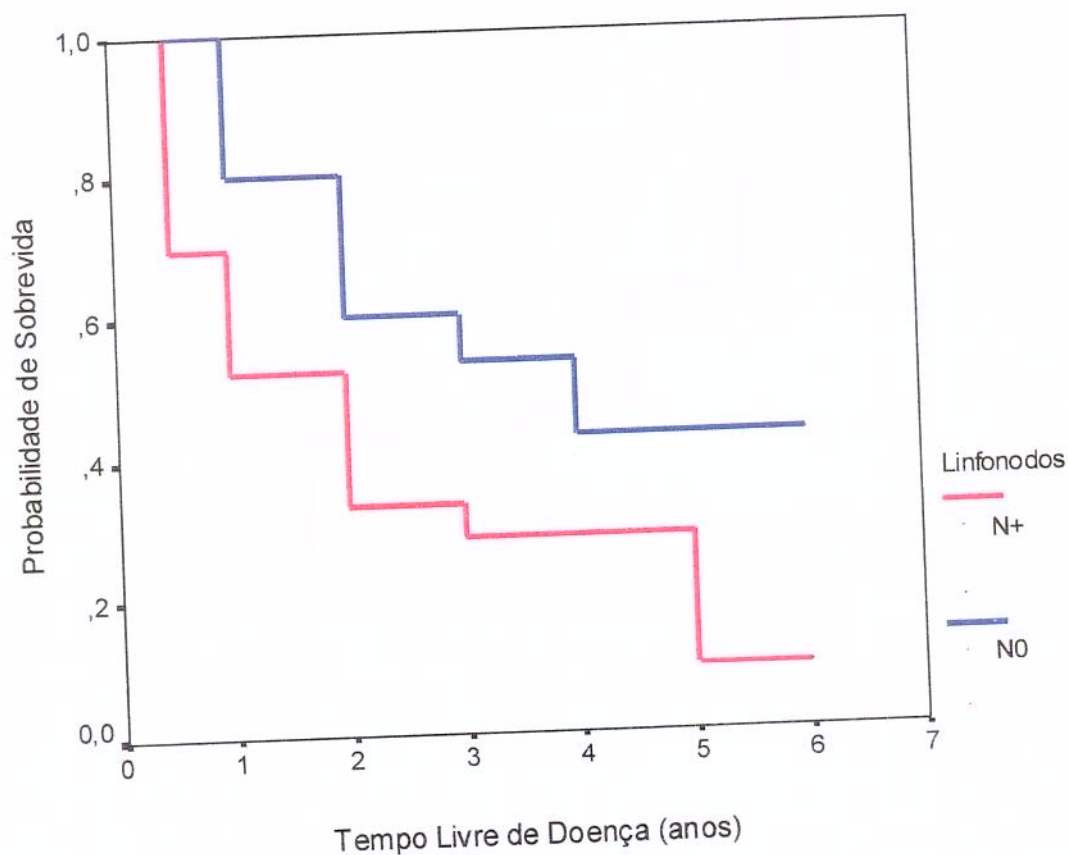


Gráfico 10: Análise da probabilidade de sobrevida, conforme a presença ou ausência de metástases cervicais (N0/N+), de 38 pacientes portadores de CEC de língua e soalho de boca, levantados no HCFCM da UNICAMP.

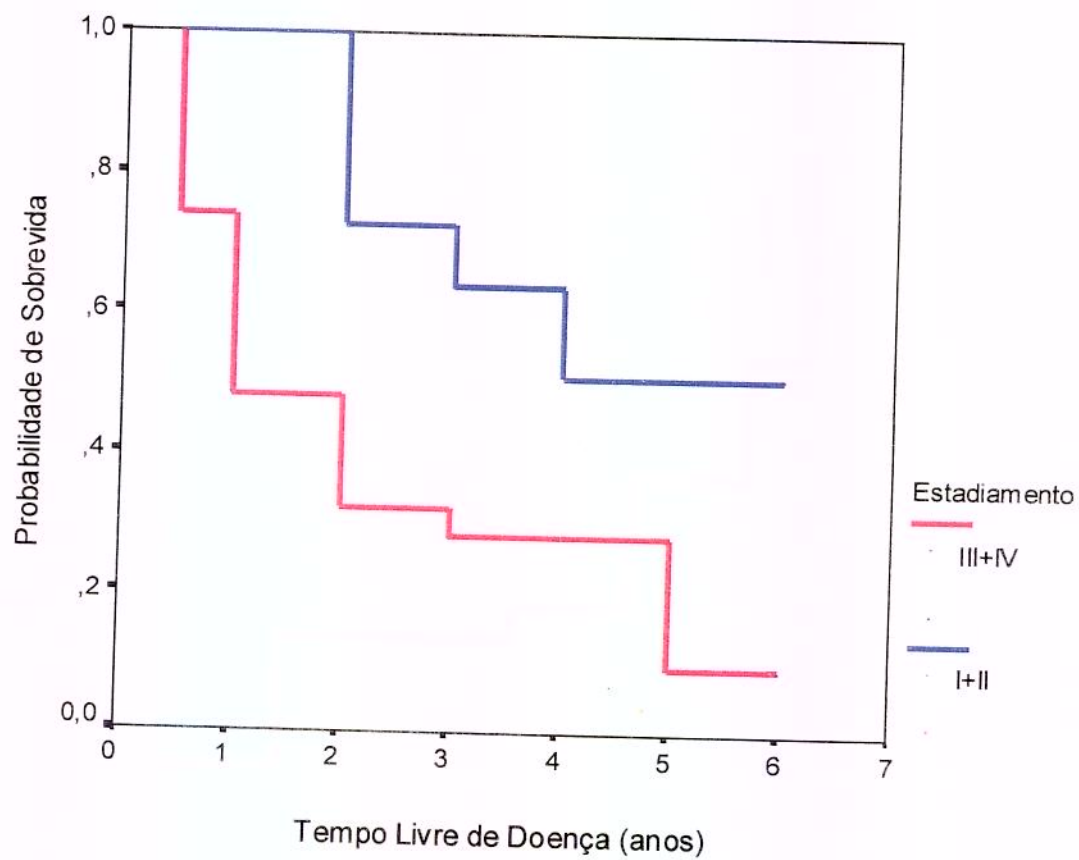
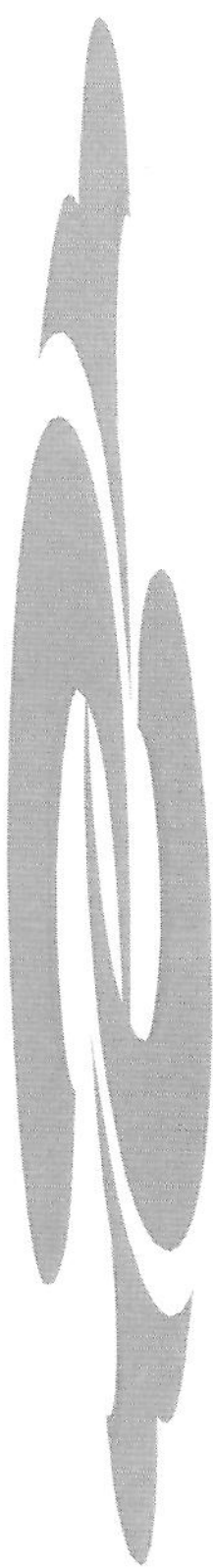


Gráfico 11: Análise da probabilidade de sobrevivência, conforme o estadiamento TNM, de 38 pacientes portadores de CEC de língua e soalho de boca, levantados no HCFCM da UNICAMP

- **Análise do grau de diferenciação e do modo de invasão**

O grau de diferenciação pôde ser analisado em 44 casos dos 46 estudados, sendo que a maioria foi classificada como moderadamente diferenciado (34 casos) e oito como pouco diferenciados. Em dois casos, o carcinoma era *in situ* no epitélio. Não houve casos de carcinomas bem diferenciados na amostra e dois pacientes não puderam ser analisados.

O modo de invasão foi analisado nos fragmentos das biópsias, sendo que a maioria foi classificada como de cordões grossos em 34 casos (77%), oito como cordões finos (18%) e dois como infiltração em células isoladas (5%).



5. DISCUSSÃO

A avaliação dos parâmetros do infiltrado inflamatório estudados, não foi possível em todos os casos da amostra, por causa de insuficiência de tecido nas biópsias, perda do material fixado à lâmina ou problemas na técnica imuno-histoquímica que não permitiram a identificação das áreas ou das células a serem analisadas.

Dos 46 casos estudados, em 44, obteve-se a análise qualitativa do infiltrado inflamatório geral intratumoral, que se apresentou como leve (+) na maioria, ou seja, em 29 casos. Esse infiltrado mostrou-se constituído predominantemente por linfócitos e encontrava-se no tecido conjuntivo que permeava os blocos tumorais. Esses achados são semelhantes aos de RABIN *et al.* (1984); WOLF *et al.* (1986); GUO *et al.* (1987); HIROTA *et al.* (1990); THOMAS *et al.* (1995).

Em 28 casos obteve-se a avaliação do infiltrado inflamatório geral peritumoral que se mostrou leve (+) em 2 casos, moderado em 9 casos (+ +) e intenso (+ + +) em 17 casos. Esse infiltrado era constituído predominantemente por linfócitos, sendo que plasmócitos e neutrófilos polimorfonucleares também estavam presentes em menor quantidade, a não ser em áreas adjacentes a focos de necrose, onde a quantidade de neutrófilos predominava, de acordo com o que relataram outros autores (BONCINELLI *et al.* 1978; ANNEROTH *et al.* 1987; WOLF *et al.* 1986). A intensidade do infiltrado inflamatório geral peritumoral era nitidamente superior à intensidade do infiltrado inflamatório intratumoral em todos os casos, semelhante ao encontrado por RABIN *et al.* (1984) e por HIROTA *et al.* (1990). A análise do infiltrado peritumoral foi possível em uma quantidade menor de casos, em relação à análise intratumoral, pelo fato de que em várias biópsias obteve-se, apenas, amostra do tumor, sem representação da sua periferia.

O infiltrado inflamatório geral foi também analisado no epitélio normal adjacente ao tumor e nas áreas de displasia, sendo que tais avaliações foram possíveis em 20 e em 6 casos, respectivamente. Observou-se que ao nível do epitélio normal, 12 casos tinham infiltrado leve (+) enquanto que, ao nível do epitélio displásico, todos os casos apresentavam infiltrado moderado (+ +) ou intenso (+ + +). As células predominantes nesses infiltrados também eram linfócitos. Tais dados corroboram os achados de MIGLIORATI *et al.* (1986).

A diferenciação semiquantitativa entre linfócitos T e linfócitos B mostrou predominância dos linfócitos T, tanto dentro do tumor, como ao redor do mesmo, da mesma forma que relataram HIRATSUKA *et al.* (1984); RABIN *et al.* (1984) e HIROTA *et al.* (1990).

A avaliação quantitativa dos subtipos de linfócitos mostrou um discreto predomínio de linfócitos CD8+ nas áreas intratumorais, achado semelhante ao encontrado por WOLF *et al.* (1986) que descreveram uma proporção maior de linfócitos CD8+ intraparenquimatosos. Apesar dessa preponderância, segundo WOLF *et al.* (1986), tais células não teriam atividade citotóxica efetiva (mediada pela produção de interleucina-2) que dependeria da presença e da função normal de linfócitos CD4+. Encontrou-se um discreto predomínio de linfócitos CD4+ nas áreas peritumorais, enquanto WOLF *et al.* (1986) relataram um equilíbrio. GUO *et al.* (1987) e HIROTA *et al.* (1990) encontraram os subtipos de linfócitos CD4+ e CD8+, mais freqüentemente, no tecido peritumoral do que no intratumoral.

A implicação prognóstica dos parâmetros do infiltrado inflamatório foi analisada através de tabelas de dados cruzados que permitiram cálculos estatísticos.

Assim como foi relatado por HIRATSUKA *et al.* (1984), as correlações entre a avaliação qualitativa do infiltrado inflamatório geral e a presença de metástases cervicais (N+) mostraram nível de significância ($p < 0,05$), quando analisamos as áreas intratumorais, que foram aquelas que nos permitiram um maior número de casos para análise. Quanto menor a intensidade do infiltrado, maior a chance de comprometimento neoplásico do pescoço. Esse mesmo parâmetro apresentou significância, quando correlacionado com o estadiamento TNM em que foram confrontados 10 casos em estágio I e II e 34 casos em estágio III e IV. Dentre os pacientes com infiltrado leve (+), 10,34% apresentavam-se no estágio I ou II enquanto que, 89,66% encontravam-se no estágio III ou IV. Tais achados estão de acordo com os de HIRATSUKA *et al.* (1984) e são semelhantes aos descritos por GUO *et al.* (1987) e HIROTA *et al.* (1990).

De acordo com o estudo de SARIOGLU *et al.* (1994), também não se observou significância estatística nas análises da intensidade do infiltrado linfocitário peritumoral, embora HIRATSUKA *et al.* (1984), tenham demonstrado relação inversa entre o tamanho do tumor (T) e a intensidade desse infiltrado.

A avaliação semiquantitativa do infiltrado linfocitário B intratumoral mostrou significância ($p < 0,05$), quando confrontada com a presença de linfonodos cervicais comprometidos (N+) nos 44 casos em que esse parâmetro foi estudado. Assim, entre os casos que tinham infiltrado nulo, 82,61% apresentavam metástases cervicais, enquanto que, entre aqueles que apresentavam infiltrado leve ou moderado, somente 42,86% eram N+. Tais achados contradizem a pouca importância dada ao infiltrado de linfócitos B nas neoplasias malignas, uma vez que não se encontraram achados semelhantes na literatura. Sabe-se que ocorre um aumento nas concentrações séricas de IgA em pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço (SCULLY, 1981), indicando que, talvez, a resposta imune humoral possa desempenhar algum papel nesses tumores.

Os outros parâmetros de infiltrado inflamatório estudados não apresentaram graus de significância estatística, quando confrontados com os grupos de N0, N+, I+II e III+IV, embora, em determinados resultados, observaram-se algumas tendências que, talvez, devido ao número de casos insuficientes não mereceram confirmação estatística.

Assim, notou-se uma quantidade menor de linfócitos CD4+ intratumorais nos casos mais avançados da doença, conforme relatam WOLF *et al.* (1986). Sabendo-se do pior prognóstico desses casos, os autores sugerem que isso pode refletir um importante defeito na resposta imune ao tumor, explicando que a função intacta dos linfócitos CD4+ é necessária para a ativação dos linfócitos CD8+ citotóxicos.

Não se observou aumento significativo nas taxas de metástases linfonodais cervicais, quando a proporção de linfócitos CD4/CD8 era maior que 1, conforme relataram SNYDERMAN (1989).

HIROTA *et al.* (1990) descreveram um aumento na proporção CD4/CD8 nos casos avançados, sendo que, neste estudo, também pôde-se constatar uma quantidade relativamente maior de casos avançados, quando a razão CD4/CD8 era maior que um, tanto na área intratumoral, quanto na área peritumoral, mas tal observação não obteve significância estatística.

A análise da probabilidade de sobrevida foi possível em 38 pacientes estudados. O período de acompanhamento variou de 3 a 6 anos. Para fins de construção das curvas de Kaplan-Meyer, atribuíram-se valores que variaram de 0,5 a 6, de acordo com o número de anos de sobrevida, a partir do momento da primeira consulta. Os pacientes que apresentaram recidiva da doença foram considerados no mesmo grupo dos que foram a óbito, para efeito de análise estatística.

A curva de sobrevida global dos 38 pacientes mostrou uma probabilidade de 20% de se estar vivo, após um período de 6 anos de acompanhamento. Esse índice global, incluindo todos os estádios da doença, é semelhante ao da literatura para os estádios avançados que apontam uma taxa de sobrevida de 20 a 30% em cinco anos para as lesões avançadas (CARVALHO 2000) e entre 10 e 65% para os estádios III e IV (SHAH 1996), sendo que, tais dados da literatura, consideraram todas as áreas anatômicas da boca e não somente a língua e o soalho, como foi considerado neste estudo.

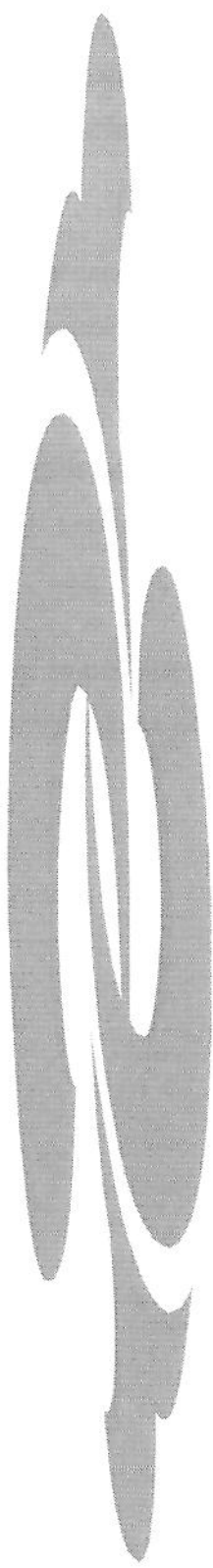
A análise das curvas de probabilidade de sobrevida, conforme os parâmetros do infiltrado inflamatório estudados, não mostrou diferenças significativas entre si. Deve-se considerar que a construção de tais curvas foi dificultada em razão da natureza do estudo em questão, ou seja, um estudo retrospectivo, que não foi delineado para o acompanhamento de grupos de doentes. Além disso, tais curvas de sobrevida foram consideradas para pacientes em diferentes estádios de doença, o que pode confundir a implicação real do valor prognóstico dos parâmetros estudados.

Quanto ao grau de diferenciação do tumor, mostrou-se moderado em 34 casos. Oito biópsias foram classificadas como CEC pouco diferenciados, sendo que nesse grupo observaram-se seis pacientes em estádios avançados III ou IV e seis evoluíram para o óbito. Esses dados não puderam ser analisados do ponto de vista estatístico, pois o número

de casos foi insuficiente, mas mostraram uma forte tendência de pior prognóstico para esse grau de diferenciação histológica (pouco diferenciado), denotando que o grau de diferenciação pode ser um fator prognóstico, ao contrário do que relatam BYERS, (1997) e também GLUCKMAN *et al.*, (1998). Observa-se que 87,5% desses pacientes apresentaram uma proporção CD4/CD8 intratumoral menor ou igual a 1.

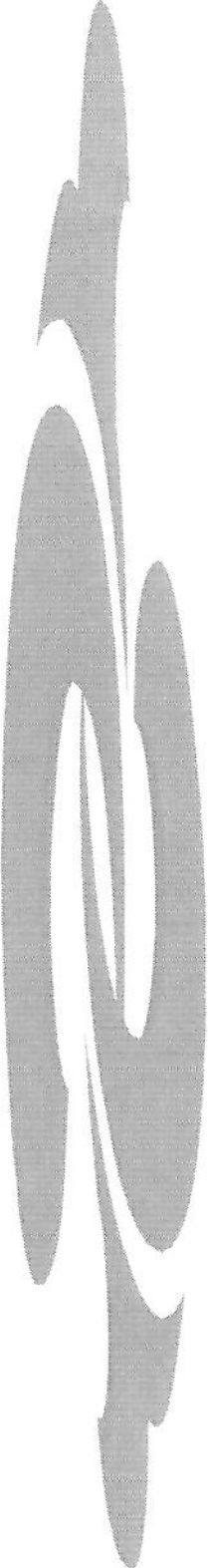
O modo ou padrão de invasão encontrado com maior frequência (34 casos) foi o de cordões grossos, infiltrando os tecidos vizinhos, conforme cita ANNEROTH *et al.*, (1987) em sua graduação de malignidade do CEC da cavidade oral, ao qual chama padrão de invasão tipo 2. Oito casos foram classificados como tipo 3, ou seja, pequenos agrupamentos de células tumorais infiltrativos (cordões finos) e dois casos como tipo 4, ou seja, células individuais e espalhadas (células isoladas ou padrão sarcomatóide). Dos dez casos classificados nesses dois grupos (tipos 3 e 4), oito encontravam-se em estádios avançados da doença (III ou IV) e sete foram a óbito. Observamos que, nesse grupo, 80% dos casos apresentavam a proporção CD4/CD8 intratumoral menor ou igual a 1 e podem representar um grupo de pior prognóstico.

O principal achado desse estudo é que os linfócitos T constituem o principal componente do infiltrado inflamatório do estroma e do parênquima dos carcinomas espinocelulares da cavidade oral, como evidenciado em outras neoplasias malignas. Ao lado de estudos anteriores da resposta imunológica no câncer da cavidade oral, nos quais foram demonstradas deficiências nas funções dos linfócitos (WOLF *et al.* 1980), a análise das subpopulações de linfócitos sugerem que o crescimento progressivo do tumor pode estar associado a falhas na função, regulação ou migração de subtipos de linfócitos, como por exemplo, os linfócitos CD4+, ou mesmo os linfócitos B, no local do tumor. Portanto, o estudo do infiltrado inflamatório que se estabelece no tecido tumoral e peritumoral, pode fornecer dados importantes para o prognóstico e para o tratamento do câncer da cavidade oral, recomendando-se estudos prospectivos com peças cirúrgicas, para a adequada avaliação das áreas intra e peritumorais.



6. CONCLUSÕES

- O linfócito T foi o principal componente da resposta inflamatória (intra e peritumoral) ao CEC da língua e do soalho da boca, sendo que não houve diferença significativa entre a proporção de linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+.
- A intensidade do infiltrado inflamatório intratumoral (sem discriminar entre linfócitos T ou B) apresentou correlação inversa, estatisticamente significativa, com metástases cervicais e com o estadiamento da doença.
- A ausência de linfócitos B na região intratumoral apresentou correlação, estatisticamente significativa, com o comprometimento metastático do pescoço.
- Não houve diferenças estatisticamente significativas, entre as curvas de sobrevida analisadas para os diferentes parâmetros de infiltrado inflamatório, nos casos estudados.



7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Objetivo

Avaliar as características do infiltrado linfocitário em biópsias de CEC de língua e soalho da boca, associando os achados a índices de prognóstico conhecidos (metástases cervicais e estadiamento TNM) e a sobrevida.

As características avaliadas foram as seguintes:

- Infiltrado inflamatório geral nas regiões intra e peritumoral, displasia e epitélio normal.
- Infiltrado de linfócitos T (CD45RO+) nas regiões intra e peritumoral, displasia e epitélio normal.
- Infiltrado de linfócitos B (CD20+) nas regiões intra e peritumoral, displasia e epitélio normal.
- Quantidade de linfócitos T CD4+ nas regiões intra e peritumoral.
- Quantidade de linfócitos T CD8+ nas regiões intra e peritumoral
- Razão CD4/CD8 nas regiões intra e peritumoral.

Os índices de prognóstico a serem confrontados com os dados do infiltrado inflamatório foram agrupados da seguinte forma:

- Ausência ou presença de metástases cervicais (N0 ou N+).
- Estadiamento TNM da doença (Estádio I+II ou estágio III+IV).
- Sobrevida dos pacientes (SED-sem evidência de doença e CED-com evidência de doença ou óbito).

Análise dos Dados

Com o objetivo de se avaliar a associação dos parâmetros do infiltrado inflamatório estudados com o prognóstico, os dados foram analisados através de tabelas cruzadas, sendo utilizado o Teste Qui-Quadrado, quando válido, e o Teste Exato de Fisher, com exceção das análises do CD4 e CD8, para as quais foi utilizado o Teste Não-Paramétrico de Wilcoxon.

O teste Qui-quadrado buscou responder à seguinte pergunta, por exemplo:

- É real (significativo) que a presença de metástase linfonodal (N+) depende da quantidade de infiltrado inflamatório intratumoral da biópsia ?

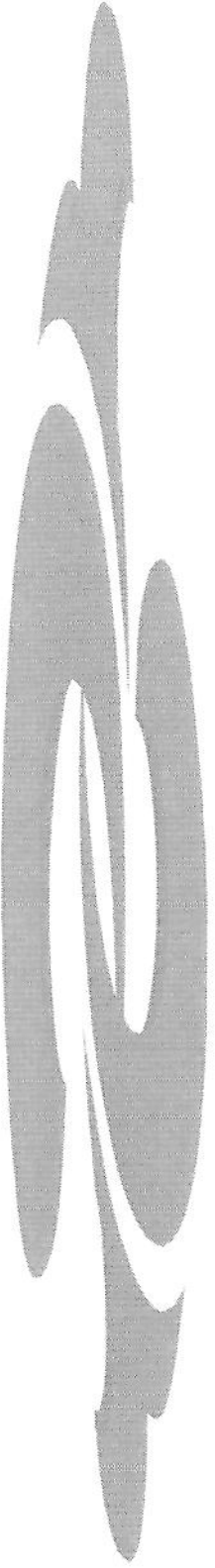
As hipóteses testadas pelo teste Qui-quadrado nesse estudo foram as seguintes:

- H_0 (hipótese nula): a presença de metástase linfonodal (N+) independe da quantidade de infiltrado inflamatório intratumoral.
- H_A (hipótese alternativa): a presença de metástase linfonodal (N+) depende da quantidade de infiltrado inflamatório intratumoral.

A conclusão do teste Qui-quadrado, decidindo-se por uma alternativa ou pela outra é baseada no valor da estatística χ^2 e no seu correspondente valor de p (p-valor). O resultado do p-valor mede a força da evidência de que as diferenças observadas nos resultados sejam devidas a variações aleatórias da amostra. Dessa forma, pequenos valores de p ($p < 0,05$) indicam haver nível de significância, ou seja, evidências de que os resultados (as diferenças) encontrados não são devidos ao acaso e assim, levam a optar pela hipótese alternativa, isto é, dependendo da quantidade de infiltrado inflamatório intratumoral que os pacientes apresentam, existe um maior ou menor percentual de pessoas que apresenta metástases linfonodais.

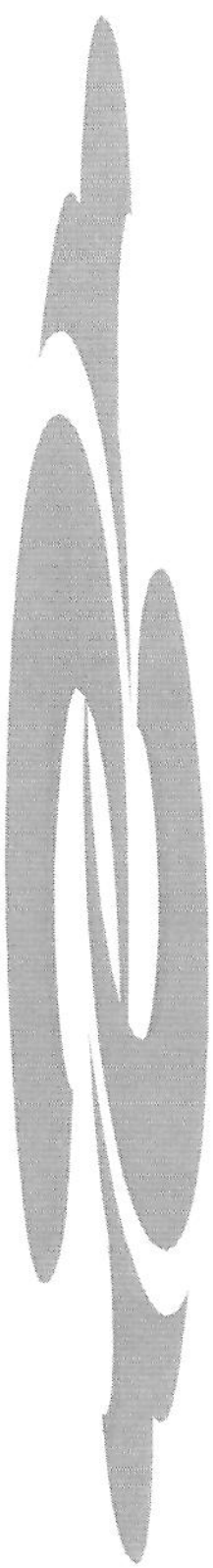
O teste de Wilcoxon buscou verificar a hipótese de existir uma diferença significativa na distribuição CD4 e CD8 para os dois grupos de variáveis de prognóstico, ou seja, presença ou ausência de metástases linfonodais e estadiamento I+II ou III+IV. Foi utilizado um valor de “p”, da mesma forma que os testes Qui-quadrado e de Fisher, para se concluir a respeito das hipóteses nula ou alternativa de haver evidência de diferença significativa entre os grupos, levando-se em conta o valor das medianas.

Para se avaliar a probabilidade de sobrevida foram construídas curvas de Kaplan-Meier comparadas pelo teste log-rank, em que o resultado p-valor fornecido, refere-se à comparação da igualdade das curvas.



8. SUMMARY

Inflammatory infiltration has been considered as a likely prognostic factor in malign neoplasms. The aim of this work is to characterize, by immuno-histochemical technique, the lymphocytic inflammatory infiltration in epidermoid carcinomas biopsies of the tongue and floor of the mouth. Analyse its prognostic value by correlating the results with the data of TNM staging system and with the probability of survival. It was studied 46 biopsies of non-treated patients with epidermoid carcinoma of the tongue and floor of the mouth in wich was analysed the following inflammatory infiltration parameters: general inflammatory infiltration intensity, T and B lymphocytes infiltration intensity in relation to the general inflammatory infiltration in tumor parenchyma, stroma region, displasia and normal epithelium, amount of CD4+ lymphocytes, amount of CD8+ lymphocytes and CD4/CD8 ratio in tumor parenchyma and stroma. Both the general inflammatory infiltration and T and B lymphocytes infiltration were more intense in the stromal than in the parenchymal tumor. In both sites the T lymphocytes were found more frequently than the B lymphocytes. The CD4/CD8 ratio didn't show expressive difference between stroma and parenchyma tumor. It was seen a significant inverse correlation between parenchymal inflammatory infiltration intensity and presence of neck metastases and also with TNM staging. There was significant correlation between lack in B lymphocytes infiltration of the parenchyma tumor and presence of neck metastases. It wasn't found any correlation between survival and inflammatory infiltration parameters related to epidermoid carcinomas in this study. It was concluded that the analisis of inflammatory infiltration found in biopsies could aid information to the prognostic evaluation in patientes with epidermoid carcinomas of the mouth.



9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-SALAM, M.; MAYALL, B.H.; CHEW, K.; SILVERMAN, S.; GREENSPAN, J.S. – Which oral white lesions will become malignant ? An image cytometric study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 69: 345-50, 1990.
- AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. **Manual for staging of cancer**, 3. ed. Philadelphia, JB Lippincott, 1988.
- ANNEROTH, G. & HANSEN, L.S. – A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. **Scand J Dent Res** 92: 448-68, 1984.
- ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J.; LUNA, M. – Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand J Dent Res** 95: 229-49, 1987.
- ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J.G.; LUNA, M. – Malignancy grading of squamous cell carcinoma in the floor of the mouth related to clinical evaluation. **Scand J Dent Res** 94: 347-58, 1986.
- BAILEY, B.J. – Beyond the “new” TNM classification. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 117: 369-370, 1991.
- BALDWIN, R. W.; EMBLETON, M.J.; PRICE, M.R. – Inhibition of lymphocyte cytotoxicity for human colon carcinoma by treatment with solubilized tumour membrane fractions. **Int J Cancer** 12: 84-92, 1973.
- BALDWIN, R.W.; PRICE, M.R.; ROBINS, R. – Blocking of lymphocyte-mediated cytotoxicity for rat hepatoma cells by tumour-specific antigen-antibody complexes. **Nature New Biology** 238: 185, 1972.
- BARCLAY, A.N.; BIRKELAND, M.L.; BROWN, M.H.; BEYERS, A.D.; DAVIS, S.J.; SOMOZA, C. – **The leucocyte antigen factsbook**. London, Academic Press, 1994.

- BENNETT, S.H.; FUTRELL, J.S.; ROTH, J.A.; HOYE, R.C.; KETCHAM, A.S. – Prognostic significance of histologic host response in cancer of the larynx or hypopharynx. **Cancer** 28: 1255-56, 1971.
- BILLINGHAM, R.E.; BRENT, L.; MEDAWAR, P.B. – Quantitative studies on tissue transplantation immunity. **Proc R Soc Lond** 143(B): 58, 1954.
- BISHOP, J.M. – Molecular themes in oncogenesis. **Cell** 64: 235-48, 1991.
- BONCINELLI, U.; FORNIERI, C.; MUSCATELLO, U. – Relationship between leukocytes and tumor cells in precancerous and cancerous lesions of the lip: A possible expression of immune reaction. **Journal of Investigative Dermatology** 71: 407-411, 1978.
- BOURNE, J.A. – **Manual de Coloração pela Imunoperoxidase**. Dinamarca, Laboratório de Imunoquímica da DAKO Co.®, 1997.
- BOYLE, P. & SCULLY, C. – Epidemiological aspects of oral cancer. **Acta Stomatologica Internationalia**. 3: 193, 1982
- BRANDÃO, L.G. & CAVALHEIRO, B.G. – Câncer da Cavidade Oral. In: Araújo Filho, V.J.F.; Brandão, L.G.; Ferraz, A.R. **Manual do Residente de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**. São Paulo, Editora Keila & Rosenfeld, 1999.
- BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Ministério da Saúde. Rio de Janeiro. **A Epidemiologia do Câncer**, 1997.
- BROCKER, E.B. – What's new in the local response in cancer ? – **Path Res Pract** 185: 529-32, 1989.
- BRODERS, A.C. – Squamous-cell epithelioma of the lip. **J Am Med Assoc** 74: 656-64, 1920.

- BROEMAL, T.L.; BECKER, W.M.; OTTO, H.F. – Identification of inflammatory cell phenotypes in human oral carcinomas by means of monoclonal antibodies. **Arch Oral Biol** 28: 1093-100, 1983.
- BROWN, D.C. & GATTER, K.C. – Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. **Histopathology** 17: 489-503, 1990.
- BRYNE, M. – Prognostic factors of various molecular and cellular features in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 20: 413-20, 1991.
- BRYNE, M.; KOPPANG, H.S.; LILLEG, R.; STENE, T.; BANG, G.; DABELSTEEN, E. – New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med** 18: 432-37, 1989.
- BRYNE, M.; REIBEL, J.; MANDEL, U.; DABELSTEEN, E. – Expression of mucin type carbohydrates may supplement histological diagnosis in oral premalignant lesions. **J Oral Pathol Med** 20: 120-25, 1991a.
- BRYNE, M.; THRANE, P.S.; DABELSTEEN, E. – Loss of expression of blood group antigen H is associated with cellular invasion and spread of oral squamous cell carcinomas. **Cancer** 67: 613-18, 1991b.
- BYERS, R.M. – The therapeutic implications of prognostic factors in oral cancer. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço** 21(1/2): 17-20, 1997.
- CALICH, V.L.G. & VAZ, C.A.C. – **Imunologia Básica**. São Paulo, Editora Artes Médicas Ltda, 1989.
- CARVALHO, M.B. – Evolução das Curvas de Controle Local e Sobrevida do Câncer de Boca. In: Parise Jr., O. **Câncer de Boca – Aspectos Básicos e Terapêuticos**. São Paulo, Ed. Sarvier, 2000 – 256 p.
- CLOSE, L.G.; MERKEL, M.; VUITTCH, M.F.; REISCH, J.; SCHAEFER, S.D. – Computed tomographic evaluation of regional lymph node involvement in cancer of the oral cavity and oropharynx. **Head Neck** 11: 309-17, 1989.

- COHN, S.L.; LINCOLN, S.T.; ROSEN, S.T. - Present status of serum tumor markers in diagnosis, prognosis and evaluation of therapy. **Cancer Invest** 4: 305-27, 1986.
- CRISSMAN, J.D.; GLUCKMAN, J.; WHITELEY, J.; QUANELLE, O. - Squamous cell carcinoma of the floor of mouth. **Head Neck Surg** 3: 2-7, 1980.
- CRISSMAN, J.D.; LIU, W.Y.; GLUCKMAN, J.L.; CUMMINGS, G. - Prognostic value of histopathologic parameters in squamous cell carcinoma of the oropharynx. **Cancer** 54: 2995-3001, 1984.
- CURRIE, G. & MCELWAIN, T.J. - Active Immunotherapy as an adjunct to chemotherapy in the treatment of dissiminated malignant melanoma: a pilot study. **Br J Cancer** 31: 143-56, 1975.
- DIB, L.L.; PINTO, D.S.; SANVITTO, L.C.; CONTESINI, H.; LOMBARDO, V.; FRANCO, E. - Determinantes de sobrevida em câncer de boca: fatores sócio-demográficos e anatômicos. **Rev Bras Cir Cab Pesc** 14: 1-9, 1990.
- EHRlich, P. - Euber-die Specifischen Granulations des Blut. **Arch Anat Physiol** 3: 571-79, 1879.
- EILBER, F.R. & MORTON, D.L. - Impaired immunologic reactivity and recurrence following cancer surgery. **Cancer** 25(1): 362-67, 1970.
- FERRINI, S. & MORETTA, L. - Immunotherapy and immunity to cancer: cellular mechanisms. **Current Opinion in Immunology**. 2: 683-88, 1990.
- FRANZEN, G.; KLINTENBERG, C.; OLOFSSON, J.; RISBERG, B. - DNA measurement - An objective predictor of response to irradiation? A review of 24 squamous cell carcinomas of the oral cavity. **Br J Cancer** 53: 643- 51, 1986.
- FRIEDMAN, M.; MAFEE, M.; PACELLA, B.L.; STRORIGL, T.L.; DEW, L.L.; TORIUMI, D.M. - Rationale for elective neck dissection. **Laryngoscope** 100: 54-9, 1990.

- FURUSAKA, T. – T lymphocytes in cancer tissues of head and neck regions – na imunohistochemical investigation. **Nippon Jibiinkoka Gakkai Kaiho** 85: 557-66, 1982.
- GAZE, M.N. & WILSON, J.A. – Head and neck tumor immunology. **Clin Otolaryngol** 13: 495-99, 1988.
- GLUCKMAN, J.L.; GLEICH, L.; WILSON, K.; MANN, W.; WELKOBORSKY, H.J. – Prognostic indicators for early squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço** 22(3): 51- 4, 1998.
- GOEDEGEBUURE, P.S. & EBERLEIN, T.J. – The role of CD4+ tumor- infiltrating lymphocytes in human solid tumors. **Immunol Res** 14(2): 119-31, 1995.
- GOLDSMITH, M.M.; CRESSON, D.H.; ARNOLD, L.A.; POSTMA, D.S.; ASKIN, F.B.; PILLSBURY, H.C. – DNA flow cytometry as a prognostic indicator in head and neck cancer. **Otolaryngol Head Neck Surg** 96: 307-18, 1987.
- GUESDOM, J.L.; TERNYNCK, T.; AVRAMEAS, S. – The use of avidin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques. **J Histochem Cytochem** 27: 1131-139, 1979.
- GUIMARÃES, P.F. & ALTEMANI, A.M.A.M. – Metástases ganglionares cervicais em carcinoma oral: importância dos parâmetros histológicos. Campinas, 1999. [Dissertação de Mestrado – Universidade Estadual de Campinas].
- GUNDERSEN, H.J.G.; BENDTSEN, T.F.; KORBO, L. – Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis. **APMIS** 96: 379-94, 1988.
- GUO, M.; RABIN, B.S.; JOHNSON, J.T.; PARADIS, I.L. – Lymphocyte phenotypes at tumor margins in patients with head and neck cancer. **Head and Neck Surg** 9: 265-71, 1987.
- HAMBRAEUS, G.M.; MERCKE, C.E.; WILLEN, R. – Prognostic factors influencing survival in combined radiotherapy and surgery of squamous cell carcinoma of the esophagus with special reference to a histopathologic grading system. **Cancer** 62: 895-904, 1988.

- HANDLEY, W.S. – The pathology of melanotic growths in relation to their operative treatment. **Lancet** 1: 927-96, 1907.
- HARABUCHI, Y.; YAMANAKA, N.; KATAURA, A. – Identification of lymphocyte subsets and natural killer cells in head and neck cancers. An immunohistological study using monoclonal antibodies. **Arch Otorhinolaryngol** 242(1): 89-97, 1985.
- HELLSTRÖM, K.E. & HELLSTRÖM, I. – Immunological enhancement as studied by cell culture techniques. **Annual Review of Microbiology** 24: 373-98, 1970.
- HIRATSUKA, H.; IMAMURA, M.; ISHII, Y.; KOHAMA, G.; KIKUCHI, K. – Immunohistologic detection of lymphocyte subpopulations infiltrating in human oral cancer with special reference to its clinical significance. **Cancer** 53(11): 2456-66, 1984.
- HIROTA, J.; UETA, E.; OSAKI, T.; OGAWA, Y. – Immunohistologic study of mononuclear cell infiltrates in oral squamous cell carcinomas. **Head Neck** 12: 118-25, 1990.
- HOLMES, E.C. – Immunology of tumor infiltrating lymphocytes. **Ann Surg** 201: 158-63, 1985.
- HSU, M.S.; RAINE, L.; FANGER, H. – Use of Avidin-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) and Unlabeled Antibody (PAP) Procedures. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry** 29: 577-80, 1981.
- HUNTER, T. – Cooperation between oncogenes. **Cell** 64: 249-70, 1991.
- IOACHIM, H.L. – The stromal reaction of tumours: an expression of immune surveillance. **J Nat Cancer Inst** 57: 465-75, 1976.
- ISAAC, L. – Células do Sistema Imune. In: CALICH, V.L.G. & VAZ, C.A.C. **Imunologia Básica**, São Paulo. Ed. Artes Médicas, 1989, 376 p.

- JACOBSSON, P.A.; ENEROTH, C.M.; KILLANDER, D.; MOBERGER, G.; MARTENSON, B. – Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx (a pilot study). **Acta Radiol Ther Phys Biol** 12: 1-8, 1973.
- JONES, J.H. & COYLE, J.I. – Squamous carcinoma of the lip: a study of the interface between neoplastic epithelium and the underlying mesenchym. **J Dent Res** 48: 702-08, 1969.
- JONES, K.R.; LODGE-RIGAL, R.D.; REDDICK, R.L.; TUDOR, G.E.; SHOCKLEY W.W. – Prognostic factors in the recurrence of Stage I and II squamous cell cancer of the oral cavity. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 118: 483-85, 1992.
- KEARSLEY, J.H.; FULONG, K.L.; WATERS, M.J. – An immunohistochemical assessment of cellular proliferation markers in head and neck squamous cell cancers. **Br J Cancer** 61: 821-27, 1990.
- KOKAL, W.A.; GARDINE, R.L.; SHEIBAM, K. – Tumor DNA content as a prognostic indicator in squamous cell carcinoma of the head and neck region. **Am J Surg** 156: 276-80, 1988.
- KOWALSKI, L.P. & RIERA, C. – Carcinoma da Boca: Epidemiologia, Prevenção e Detecção Precoce. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, 15 (1/2/3): 8-15, 1991.
- KREIDER, J.W.; BARTLETT, G.L.; BUTKIEWICZ, B.L. – Relationship of tumor leucocytic infiltration to host defense mechanisms and prognosis. **Cancer Metastasis Rev** 3: 53-74, 1984.
- LA VECCHIA, C.; TAVANI, A.; FRANCESCHI, S.; LEVI, F.; CORRAO, G.; NEGRI, E.; - Epidemiology and Prevention of Oral Cancer. **Oral Oncology**, 33(5): 302-12, 1997.
- LAAD, A.; KODE, J.; CHAVAN, S.; RAO, R.; FAKIH, A.R.; CHIPLUNKAR, S. – Limiting dilution analysis of proliferating and cytotoxic lymphocytes in the peripheral blood and tumours of oral cancer patients. **Eur J Cancer B Oral Oncol** 32B(5): 337-42, 1996.

- LANDSTEINER, K. & CHASE, M.W. – Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. **Proc Soc Exp Biol Med** 49: 688-90, 1942.
- LEHNER, T.; WILTON, J.M.A.; SHILLITOE, E.J.; IVANYI L. – Cell-mediated immunity and antibodies to *herpesvirus hominis* type 1 in oral leukoplakia and carcinoma. **British Journal of Cancer** 27: 351-61, 1973.
- LETESSIER, E.M.; HEO, D.S.; OKARMA, T.; JOHNSON, J.T.; HERBERMAN, R.B. – Enrichment in tumor-reactive CD8+ T-lymphocytes by positive selection from the blood and lymphnodes of patients with head and neck cancer. **Cancer Research** 51: 3891-99, 1991.
- LEWIN, B. – Oncogenic conversion by regulatory changes in transcription factors. **Cell** 64: 303-12, 1991.
- LIAVAAG, P.G.; JOHANNESSEN, A.C.; NILSEN, R.; JONSSON, R. – Analysis of T-cell receptor expressing lymphocytes infiltrating squamous cell carcinomas of the upper aerodigestive tract. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 251(8): 452-6, 1994.
- LIMA, G.M.C.; ABARAHAMSOHN, I.A. – Imunidade celular. In: CALICH, V.L.G. & VAZ, C.A.C. **Imunologia Básica**. São Paulo Ed. Artes Médicas, 1989, 376 p.
- LIOTTA, L.A. – Tumor invasion and metastases – role of the extracellular matrix. **Cancer Res** 46: 1-7, 1986.
- LIOTTA, L.A.; STEEG, P.S.; STETLER-STEVENSON, W.G. - Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation. **Cell** 64: 327-36, 1991.
- LÖNING, T.; IKENBERG, H.; BECKER, J.; GISSMAN, L.; HOEPFER, I.; ZUR HAUSEN, H. – Analysis of Oral Papillomas, Leukoplakias and Invasive Carcinomas for Human Papillomavirus Type Related DNA. **The Journal of Investigative Dermatology**, 84: 417-20, 1985.

- MACIEJEWSKI, B.; LANGE, B.; MAJEWSKI, S.; SKALSKA-VORBRD, J.; SWIATNICKA, J. – Prognostic value of hemoglobin level in radiotherapy for larynx and oropharynx cancer. **J Cancer Res Clin Oncol** 116: 694, 1990.
- MADISON, M.T.; REMLEY, K.B.; LATCHAW, R.E.; MITCHELL, S.L. – Radiologic diagnosis and staging of squamous cell carcinoma. **Radiol Clin North Am** 32: 163-81, 1994.
- MIGLIORATI, C.A.; MIGLIORATI, E.K.J.; SILVERMAN, S. GREENSPAN Jr., D.; GREENSPAN, J.S. – Phenotypic identification of mononuclear cells in oral premalignant lesions and cancer by monoclonal antibodies. **J Oral Pathol** 15: 352-8, 1986.
- MITCHISON, N.A. – Passive transfer of transplantation immunity. **Proc R Soc Lond** 142(B): 72-87, 1954.
- MIWA, H. – Identification and prognostic implications of tumor infiltrating lymphocytes. A review. **Acta Med. Okayama** 38(3): 215-8, 1984.
- MORAES, M.F.; SOUZA FILHO, O.S.; MACHADO, J.C. – Introdução e Princípios da Cirurgia Oncológica. In: Colégio Brasileiro de Cirurgiões. **Clínica Brasileira de Cirurgia**. Rio de Janeiro, Editora Atheneu, 1996, 336 p.
- NICOLSON, G.L. – Tumor cell instability, diversification and progression to the metastatic phenotype: from oncogene to oncofetal expression. **Cancer Res** 47: 1473-87, 1987.
- NOWELL, P. C. – Chromosomal and molecular clues to tumor progression. **Semin Oncol** 16: 116-27, 1989.
- PAAVOLAINEN, M.; TARKKANEN, J.; SAKSELA, E. – Stromal reactions as prognostic factors in epidermoid carcinoma of the tongue. **Acta Otolaryngologica** 75: 316-7 , 1973.
- PICCIRILLO, J.F. – Purposes, problems and proposals for purposes in cancer staging. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 121: 145-9, 1995.

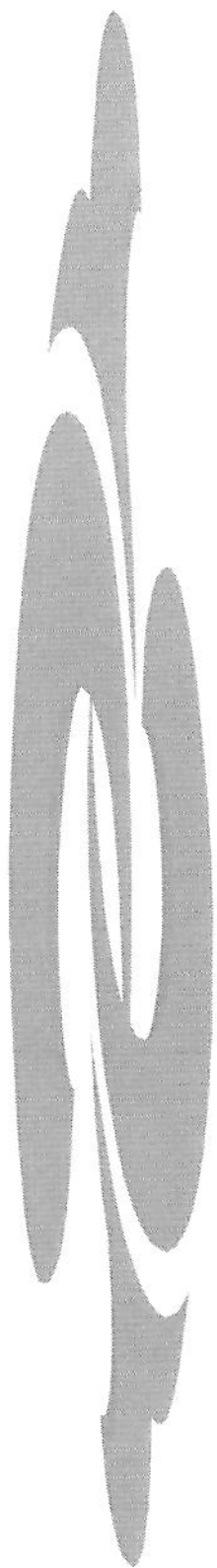
- PREHN, R.T. & MAIN, J.M. – Immunity to Methylcholanthrene-Induced Sarcomas. **Journal of the National Cancer Institute** 18(6): 769- 78, 1957.
- PREHN, R.T. & PREHN, L.M. – The autoimmune nature of cancer. **Cancer Res** 47: 927-32, 1987.
- RABIN, B.S.; JOHNSON, J.; CLAASSEN, D. – Identification of subsets of lymphocytes infiltrating head and neck tumor tissue: a preliminary report. **Laryngoscope** 94: 688-90, 1984.
- RESTIFO, N.P. & WUNDERLICH, J.R. – Essentials of Immunology. In: DEVITA, V.T.; HELLMAN S.; ROSENBERG S.A. **Cancer Principles and Practice of Oncology**. Philadelphia, 5. ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997, 1539 p.
- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. – Células Envolvidas nas Respostas Imunes. In: ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. **Imunologia**. São Paulo, Ed. Manole Ltda. 1999, 423 p.
- SABBAGA, J. - Oncogenes e Antioncogenes. In: PARISE JR., O. **Câncer de Boca – Aspectos Básicos e Terapêuticos**. São Paulo, Ed. Sarvier, 2000, 256 p.
- SARIOGLU, T.; YILMAZ, T.; SUNGUR, A.; GÜRSEL, B. – The effect of lymphocytic infiltration on clinical survival in cancer of the tongue. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 251(6): 366-9, 1994.
- SCHANTZ, S.T.; LIU, F.J.; TAYLOR, D.; BEDDINGFIELD, N.; WEBER, R.S. - The relationship of circulating IgA to cellular immunity in head and neck cancer patients. **Laryngoscope** 98: 671-8, 1988.
- SCHANTZ, S.P.; SAVAGE, H.E.; BROWN, B.W. – Significance of Clq-binding macromolecules within the head and neck cancer patient. **Cancer Res** 50: 4349-54, 1990.
- SCHANTZ, S.P.; HARRISON, L.B.; FORASTIERE, A.A. – Tumors of the Nasal Cavity and Paranasal Sinuses, Nasopharynx, Oral Cavity and Oropharynx. In: DEVITA JR. V.T.; HELLMAN S.; ROSENBERG S.A. **Cancer, Principles & Pactice of Oncology**. Philadelphia, 5. ed., Lippincott-Raven, 1997.

- SCULLY, C. – Immunological abnormalities in oral carcinoma and oral keratosis. **Journal of Maxilo-Facial Surgery** 10: 113-5 , 1981.
- SCULLY, C. – The immunology of cancer of the head and neck with particular reference to oral cancer. **Oral Surg** 53: 157-69, 1982.
- SCULLY, C. Immunology and oral cancer. **Br J Oral Surg** 21: 136-46, 1983.
- SHAH, J.P. – Oral Cavity and Oropharynx. In: SHAH, J.P. **Head and Neck Surgery**. New York, 2. Ed.. Mosby-Wolfe, 1996, 640 p.
- SHILLITOE, E.J. – The role of immunology in the diagnosis, prognosis and treatment planning of oral cancer. **Proc Royal Soc Med** 69(10): 747-9, 1976.
- SLOOTWEG, P.J.; de PAGTER, M.; de WEGER, R.A.; de WILDE, P.C. – Lymphocytes at tumor margins in patients with head and neck cancer. Relationship with tumor size, human lymphocyte antigen molecules and metastasis. **Int J Oral Maxillofac Surg** 23(5): 286-9, 1994.
- SNYDERMAN, C.H. – T-cell markers in tumor-infiltrating lymphocytes of head and neck cancer. **Head Neck** 11(4): 331-6, 1989.
- SOM, P.M. – Detection of metastasis in cervical lymph nodes: CT and MR criteria and differential diagnosis. **AJR** 158: 961-9 , 1992.
- SPITZ, M.R.; FUERGER, J.J.; GOEPFERT, H.; HONG, W.K.; NEWELL, G.R. – Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: a case comparison analysis. **Cancer** 61: 203-8, 1988.
- STELL, P.M. – Prognosis in mouth cancer: host factors. **Journal of Laryngology and Otology** 106: 399-402, 1992.
- STEPHENS, M.; LIM, K.; STEPHENS, P.; THOMAS, D.W.; LIM, S.H. – Molecular characterisation of tumour infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Immunol Immunother** 46(1): 34-40, 1998.

- SVENNEVIG, J.L.; CLOSS, O.; HARBOE, M.; SVAAR, H. – Characterization of lymphocytes isolated from non-lymphoid human malignant tumours. **Scand J Immunol** 7: 487-93, 1978.
- THOMAS, D.W.; MATTHEWS, J.B.; PATEL, V.; GAME, S.M.; PRIME, S.S. – Inflammatory cell infiltrate associated with primary and transplanted tumours in an inbred model of oral carcinogenesis. **J Oral Pathol Med** 24: 23-31, 1995.
- THURIN, J. – Characterization and molecular biology of tumor-associated antigens. **Current Opinion in Immunology** 2: 702-702, 1990.
- TOSI, P.; COTTIER, H. – What's new in quantitative pathology ? **Pathol Res Pract** 184: 652-5, 1989.
- TOTO, P.D.; BROMBERG, M.J.; TOTO, M. – Immunologic reaction to oral cancer. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 52(3): 327-32, 1981.
- TOTO, P.D.; NADIMI, H.; MAYWOOD, M.S. – Coexpression of cytokeratins, involucrin and blood group antigens in oral squamous cell carcinomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 70: 75-80, 1990.
- TUBIANA, M. & COURDI, A. – Cell proliferation kinetics in human solid tumors: relation to probability of metastatic dissemination and long-term survival. **Radiother Oncol** 15: 1-18, 1989.
- TYTOR, M.; FRANZEN, G.; OLOFSSON, J.; BRUNK, U.; NORDENSKJÖLD, B. – DNA content, malignancy grading and prognosis in T1 and T2 oral cavity carcinomas. **Br J Cancer** 56: 647-52, 1987.
- TYTOR, M.; OLOFSSON, J.; LEDIN, T.; BRUNK, U.; KLINTENBERG, C. – Squamous cell carcinoma of the oral cavity. A review of 176 cases with application of malignancy grading and DNA measurements. **Clin Otolaryngol** 15: 235-51, 1990.

- VALENTE, G.; DE STEFANI, A.; JEMMA, C.; GIOVARELLI, M.; GEUNA, M.; CORTESINA, G.; FORNI, G.; PALESTRO, G. – Infiltrating leukocyte populations and T-lymphocyte subsets in head and neck squamous cell carcinomas from patients receiving perilymphatic injections of recombinant interleukin 2. A pathologic and immunophenotypic study. **Mod Pathol** 3(6): 702-8, 1990.
- VAN DEN BREKEL, M.W.M.; CASTELIJNS, J.A.; CROLL, G.A. - Magnetic resonance versus palpation of cervical lymph node metastasis. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 117: 666-73 , 1991a.
- VAN DEN BREKEL, M.W.M.; STEL, H.V.; CASTELIJNS, J.A.; CROLL, G.J.; SNOW, G.B. – Lymph node staging in patients with clinically negative neck examinations by ultrasound and ultrasound-guided aspiration cytology. **Am J Surg** 162: 362-6 , 1991b.
- VAN NAGELL, J.R.; DONALDSON, E.S.; WOOD, E.G.; PARKER JR., J.C. – The significance of vascular invasion and lymphocytic infiltration in invasive cervical cancer. **Cancer** 41: 228-34, 1978.
- VIGNESWARAN, N.; PETERS, K.P.; HORNSTEIN, O.P.; HANEKE, E. – Comparison of cytokeratin, filagrin and involucrin profiles in oral leukoplakias and carcinomas. **J Oral Pathol Med** 18: 377-90, 1989.
- VOSE, B.M. & MOORE, M. – Supressor cell activity of lymphocytes infiltrating human lung and breast tumors. **Int J Cancer** 24: 579-85, 1979.
- WEINBERG, R.A. – Oncogenes, antioncogenes and the molecular basis of multistep carcinogenesis. **Cancer Res** 49: 3713-21, 1989.
- WOLF, G.T.; CAREY, T.E.; HAYASHIDA, D.J.S. – Monoclonal antibodies as prognostic indicators in patients with squamous cancer of the oral cavity and oral pharynx. **Acta Otolaryngol** 449: 229-34, 1988.

- WOLF, G.T.; HUDSON, J.L.; PETERSON, K.A. – Lymphocyte subpopulations infiltrating squamous carcinoma of the head and neck: Correlation with extent of tumor and prognosis. **Otolaryngol Head Neck Surg** 95: 142-51, 1986.
- WOLF, G.T.; KERNEY, S.E.; CHRETIEN, P.B. – Improvement of impaired leukocyte migration inhibition by thymosin in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **The American Journal of Surgery** 140: 531-7, 1980.
- WOLF, G.T.; SCHMALTZ, S.; HUDSON, J. – Alterations in T-lymphocyte subpopulations in patients with head and neck cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 113: 1200-6, 1987.
- YOUNG, M.R.; WRIGHT, M.A.; LOZANO, Y.; MATTHEWS, J.P.; BENEFIELD, J.; PRECHEL, M.M. – Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: influence on the immune infiltrate of the cancer. **Int J Cancer** 67(3): 333-8, 1996.



10. ANEXOS

Relação de pacientes que fizeram parte do estudo

Caso	Nome	Bloco	Prontuário	Idade	Sexo	Tabagismo	Etilismo	Aspecto da lesão	TNM	pTNM	Sobrevida (anos)
1	IV	7986	6056350	64	m	4+	1+	u/i	T2N0M0	T2N+M0	3
2	ACS	8289	6055845	50	f	1+	sim	u/i	T4N2bM0		1
3	LM	3034	3105237	56	m	sim	não	u/i	T3N1M0		0,5
4	MFR	12623	2839902	36	m	4+	não	u/i	T3N+M0		0,5
5	JB	1861	5838294	50	m	4+	2+	V	T2N0M0	idem	3
6	ICM	681	5315901	40	m	4+	4+	u/i	T3N2cM0		0,5
7	DP	7156	5554468	49	m	4+	4+	u/i	T3N2M0		0,5
8	JB	10690	4153825	64	m	1+	2+	Leucopl.	T1N0M0		6
9	ST	4276	4460919	59	m	4+	1+	u/v	T1N0M0		4
10	JMN	8595	4635837	55	m	4+	2+	u/v	T2N0M0	T2N+M0	6
11	EDC	5101	4494841	48	m	?	?	u/i	T1N0M0		6
12	CB	12190	2672289	80	m	4+	2+	u/i	T2N0M0	T2N0M0	3
13	SLFM	9732	5580592	54	f	sim	sim	u/v	T4N3M0		1
14	CP	11909	31811411	37	m	4+	4+	u/i	T2N0M0	T2N+M0	1
15	IMS	5866	2034380	42	m	4+	3+	u/i	T1N0M0	T1N+M0	5
16	AG	1927	2619348	43	m	4+	2+	V	T3N2aM0		5
17	MEB	943	4300569	51	m	sim	não	u/i	T4N0M0		1
18	AM	5336	5489352	69	m	4+	3+	u/i	T3N0M0		1
19	CB	10306	4698982	49	m	4+	2+	u/i	T4N2bM0		3
20	RF	5699	4972013	42	m	4+	4+	u/i	T3N1M0		2
21	OBC	11264	4699001	47	m	3+	3+	U	T3N0M0		?
22	JAD	11061	4690689	46	m	4+	sim	u/i	T3N1M0		2
23	EO	1936	4162042	54	m	2+	2+	u/v	T3N2bM0		?
24	SD	1372	850455	64	m	2+	4+	u/i	T3N0M0		3 *
25	JAO	12572	3370046	51	m	4+	4+	V	T3N1M0		1
26	HS	12573	4780349	47	m	4+	3+	U	T4N3M0		1
27	AA	149	4247993	59	m	2+	sim	U	T2N0M0		2
28	AAS	4571	2251732	63	m	4+	não	U	T2N0M0		2
29	SLS	12114	5730789	58	m	4+	2+	V	T4N1M0		0,5
30	AFD	1681	4860834	55	f	1+	não	u/i	T3N2M0		0,5
31	OS	8031	4613027	68	m	1+	3+	u/v	T3N0M0		?
32	PA	8040	4104367	52	m	1+	4+	Leucopl.	T1N0M0		6
33	RFJ	6472	4547838	49	m	4+	3+	u/i	T3N0M0	T3N+M0	?
34	JB	8375	4153825	65	m	3+	sim	U	T1N0M0		?
35	VC	10802	4717201	76	f	1+	2+	U	T3N0M0		1
36	PT	1383	4846909	70	m	4+	3+	u/i	T4N1M0		?
37	SC	12300	4771039	65	m	sim	sim	u/i	T4N2M0		?
38	SM	5016	4879899	65	m	2+	1+	u/i	T3N1M0		?
39	OP	11507	4745319	52	m	4+	2+	u/v	T1N0M0		4
40	JMN	2854	2287107	64	m	4+	3+	u/v	T2N0M0	T2N+M0	2
41	ACG	1202	4781272	60	m	4+	2+	u/i	T3N3M0		0,5
42	OSF	7054	6022232	51	m	4+	não	Eritropl.	T1N3M0		2
43	PB	5212	5949172	66	m	sim	sim	V	T1N0M0		3
44	JS	4129	4448913	44	m	2+	2+	U	T1N0M0		2
45	NSA	6148	5514474	52	m	4+	não	V	T2N1M0		4
46	JON	5057	5478977	37	m	2+	3+	u/v	T4N3M0		4



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

☒ Caixa Postal 611
13083-970 Campinas-S.P.
☎ 0 _ 19 7888936
fax 0 _ 19 7888925
☐ cep@head.fcm.unicamp.br

PARECER PROJETO 113/2000

I- IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "CARACTERIZAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO INFILTRADO
LINFOCITÁRIO EM BIÓPSIAS DE CARCINOMAS ESPINOCELULARES DA
CAVIDADE ORAL E SUA IMPLICAÇÃO PROGNÓSTICA."

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Alina M. A. M. Altamari

INSTITUIÇÃO: Departamento de Anatomia Patológica/FCM/UNICAMP

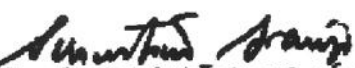
APRESENTAÇÃO AO CEP: 06/04/2000

II- PARECER CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas do UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

III- HOMOLOGAÇÃO

A ser homologado na V Reunião Ordinária de 13 de junho de 2000.


Prof. Dr. SEBASTIÃO ARAÚJO
VICE-PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

