



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA**  
**CAMPUS I**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**CURSO DE GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**VANESSA ALVES DE MEDEIROS**

**REAÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS EM**  
**CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA ORAL: ESTUDO**  
**CLINICOPATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2020**

**VANESSA ALVES DE MEDEIROS**

**REAÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS EM  
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA ORAL: ESTUDO  
CLINICOPATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial à obtenção do título de  
Bacharel em Odontologia pelo Curso de  
Odontologia da Universidade Estadual da  
Paraíba – Campus I.

**Orientador:** Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka

**Coorientadora:** Profa. Dra. Hellen Bandeira de Pontes Santos

**CAMPINA GRANDE – PB**

**2020**

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

M488r Medeiros, Vanessa Alves de.

Reação de células gigantes multinucleadas em carcinomas de células escamosas de língua oral [manuscrito] : estudo clinicopatológico e imunoistoquímico / Vanessa Alves de Medeiros. - 2020.

56 p. : il. colorido.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2020.

"Orientação : Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, Departamento de Odontologia - CCBS."

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Língua. 3. Células gigantes. 4. Imuno-histoquímica. I. Título

21. ed. CDD 616.994 31

**VANESSA ALVES DE MEDEIROS**

**REAÇÃO DE CÉLULAS GIGANTES MULTINUCLEADAS EM  
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA ORAL: ESTUDO  
CLINICOPATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como requisito parcial para obtenção do título  
de Bacharel em Odontologia pelo Curso de  
Odontologia da Universidade Estadual da  
Paraíba – Campus I.

**Aprovado em: 16/12/2020**

**BANCA EXAMINADORA**



---

Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka (Orientador)  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



---

Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves  
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



---

Profa. Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro  
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

# DEDICATÓRIA

---

A **Deus** por me abençoar inúmeras vezes, permitindo com que eu realizasse esse sonho.

Ao meu pai **Valdir Viana de Medeiros**, razão da minha maior saudade, por ter sido um exemplo de garra, superação e resiliência. Guardarei com eterna gratidão todos os seus ensinamentos e conselhos em meu coração. À minha mãe **Judite Alves de Medeiros** por ser essa mulher guerreira, batalhadora e fiel que és. Agradeço por sempre acreditar no meu potencial, inspirar-me a alcançar os meus objetivos e pela dedicação incalculável para que a conclusão da minha caminhada acadêmica fosse alcançada. Compartilho essa conquista com os dois. Amo vocês!

Ao meu irmão **José Jardel Alves de Medeiros** por sempre estar presente em minha vida.

Agradeço por todo o apoio e encorajamento durante toda a minha trajetória.  
Amo muito você!

Ao meu namorado **Orleon Luiz Oliveira de Brito**, meu maior confidente, com quem compartilhei todos os desafios e conquistas durante esse período. Sou muito grata pelo companheirismo e parceria em todos esses anos.  
Te amo.

# AGRADECIMENTOS

---

Ao meu orientador **Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka** pela oportunidade e confiança depositadas em mim. Sou imensamente grata por todo o apoio e por cada palavra de incentivo e encorajamento dedicados a mim. Com orgulho, levarei seus ensinamentos, sua dedicação, sua amizade, seus conselhos, sua honestidade e, sobretudo, seu amor pelo o que faz como um exemplo que quero seguir. Meus sinceros agradecimentos por enriquecer minha formação de maneira grandiosa durante o período que convivemos.

A minha coorientadora **Dra. Hellen Bandeira de Pontes Santos** que me acolheu tão bem e não mediu esforços para me ajudar durante a construção desse trabalho. Agradeço por todo o tempo empenhado, além do zelo, carinho, simpatia e paciência direcionados a mim. No pouco tempo que convivemos pude perceber a pessoa maravilhosa que és. Muito obrigada!

As professoras **Dra. Pollianna Muniz Alves** e **Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro** por terem aceitado fazer parte da minha banca, fiquei muito honrada em tê-las como avaliadoras.

A todas as pessoas que fazem parte do Laboratório de Histopatologia Oral da UEPB, em especial a **Luana Samara, Emanuene Galdino, Allany Andrade, Daniella Lucena, Luan Éverton e Denize Nubia** pela convivência e parceria nos trabalhos desenvolvidos no laboratório.

A todos os professores do Departamento de Odontologia da UEPB que contribuíram para a minha formação acadêmica, em especial a professora **Dra. Renata Cardoso Rocha-Madruga** que me deu a primeira oportunidade na iniciação científica.

Aos meus amigos e colegas de turma, especialmente a minha dupla de clínica **Juliana Santos da Silva** e minha dupla acadêmica **Antares Silveira Santos** pela parceria durante a universidade. Sou muito grata por tê-las conhecido, bem como aos demais colegas de turma: **Cibele Prates, Camila Guimarães, Victor Vasconcelos, Paulo Rodrigues, Iuska Mariz, Allyson Martim, Amanda Pessoa, Yuri Lins, Juliana Castelo Branco, Diego Magalhães, Marcelo Gouveia, Bianca Vieira, Massimiliano Rodrigues, Sandryenne Rayanne, Larissa Tiany, Novélia Amaral, Gabriele Moura, Sara Diniz, Wallas Lins e Yasmin Schoitzar.**

Ao **Programa Institucional de Iniciação Científica (PIBIC) UEPB/ CNPq** que permitiu a realização desta pesquisa.

RESUMO

---

## RESUMO

A reação de células gigantes multinucleadas (CGM) tem sido relatada em carcinomas de células escamosas (CCE) que acometem diversas localizações anatômicas. No CCE de língua oral (CCELO), a natureza dessa reação e sua relação com o comportamento clínico e o prognóstico dessa neoplasia maligna não estão totalmente compreendidas. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a frequência e a distribuição da reação de CGMs no CCELO e verificar a associação desse achado microscópico com parâmetros clinicopatológicos (sexo, idade, tamanho/ extensão do tumor, metástase linfonodal regional e à distância, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade). Foi realizado um estudo observacional, analítico e com corte transversal, cuja amostra foi composta por 61 casos de CCELO obtidos do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB. Os dados clínicos foram coletados por meio de prontuários médicos. Sob microscopia de luz, dois avaliadores previamente treinados examinaram cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina para identificar a presença e distribuição da reação de CGMs em campos de grande aumento (*high power fields* - HPF). Com base na mediana de HPFs apresentando a reação de CGMs, os casos foram classificados como: distribuição focal ( $\leq 5$  HPF) ou distribuição difusa ( $> 5$  HPF). No estudo imunoistoquímico, o anticorpo anti-CD68 foi utilizado a fim de confirmar a natureza monocítica/ macrófágica das CGMs. Os testes do Qui-quadrado e exato de Fisher foram utilizados com o objetivo de analisar as possíveis associações entre a presença e a distribuição da reação de CGMs e os parâmetros clinicopatológicos. O nível de significância estabelecido foi de 5% ( $p < 0,05$ ). Vinte e um (34,4%) casos de CCELO apresentaram a reação de CGMs, com maior frequência do padrão de distribuição focal ( $n = 12$ ; 57,1%). A frequência da reação de CGMs foi 2,75 vezes maior nas neoplasias sem metástase nodal regional do que nas neoplasias com metástases linfonodais ( $p = 0,027$ ; RP: 2,75; 95% IC: 1,05-7,20). A ocorrência desse achado microscópico foi 3,37 e 3,36 vezes maior, respectivamente, nos CCELOs que se apresentavam em estágios clínicos iniciais ( $p = 0,006$ ; RP: 3,37; 95% IC: 1,28-8,85) e bem diferenciados ( $p = 0,001$ ; RP: 3,36; 95% IC: 1,51-7,48), quando comparados aos casos que se apresentavam em estágios clínicos avançados e moderadamente/pobremamente diferenciados. A presença da reação de CGMs não revelou associação estatisticamente significativa com o tamanho do tumor ( $p = 0,152$ ), a metástase à distância ( $p = 0,654$ ), o sexo ( $p = 0,547$ ) e a idade dos pacientes ( $p = 0,202$ ). Além disso, não foi constatada associação estatisticamente significativa entre a distribuição da reação de CGMs e os parâmetros clinicopatológicos analisados ( $p > 0,05$ ). Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem que a ausência da reação de CGMs pode constituir um indicador de comportamento biológico mais agressivo nos CCELOs. Além disso, a associação desse achado microscópico com o grau histopatológico de malignidade dos CCELOs sugere que o mesmo pode representar uma resposta do tipo corpo estranho à ceratina nessas neoplasias malignas.

**Palavras-chave:** Carcinoma de células escamosas; Língua; Células gigantes; Imuno-histoquímica.

# ABSTRACT

---

## ABSTRACT

The multinucleated giant cell (MGC) reaction has been reported in squamous cell carcinomas (SCC) from several anatomical locations. In oral tongue SCC (OTSCC), the nature of this reaction and its relationship with the clinical behavior and prognosis of this malignancy are not fully understood. Thus, this study evaluated the frequency and distribution of the MGCs reaction in OTSCC and verified the association of this microscopic finding with clinicopathological parameters (sex, age, tumor size/ extension, node metastasis, distant metastasis, clinical stage and histopathological grade of malignancy). An observational, analytical and cross-sectional study was carried out and the sample consisted of 61 cases of OTSCC obtained from the Pathological Anatomy Service of Napoleão Laureano Hospital/ João Pessoa - PB. Clinical data were collected through medical records. Under light microscopy, two previously trained evaluators examined the histological sections stained in hematoxylin and eosin to identify the presence and distribution of the MGCs reaction in high power fields (HPFs). Based on the median of HPFs presenting MGCs reaction, cases were classified as: focal distribution ( $\leq 5$  HPF) or diffuse distribution ( $> 5$  HPF). In the immunohistochemical study, the anti-CD68 antibody was used to confirm the monocytic/ macrophagic nature of the MGCs. The Chi-square and Fisher's exact tests were used to analyze possible associations between the presence and distribution of the MGCs reaction and the clinicopathological parameters. The level of significance was set at 5% ( $p < 0.05$ ). Twenty-one (34.4%) cases of OTSCC presented MGCs reaction, with higher frequency of focal distribution pattern ( $n = 12$ ; 57.1%). The frequency of MGCs reaction was 2.75 times higher in neoplasms without regional nodal metastasis than in neoplasms with lymph node metastases ( $p = 0.027$ ; PR: 2.75; 95% CI: 1.05-7.20). The occurrence of this microscopic finding in early clinical stages tumors and well differentiated cases was 3.37 and 3.36 times higher when compared to advanced clinical stages ( $p = 0.006$ ; PR: 3.37; 95% CI: 1.28-8.85) and moderately/poorly differentiated ( $p = 0.001$ ; PR: 3.36; 95% CI: 1.51-7.48), respectively. The presence of the MGCs reaction did not reveal a statistically significant association with the tumor size ( $p = 0.152$ ), distant metastasis ( $p = 0.654$ ), sex ( $p = 0.547$ ) and patients age ( $p = 0.202$ ). In addition, no statistically significant association was found between the distribution of the MGCs reaction and the clinicopathological parameters analyzed ( $p > 0.05$ ). In conclusion, the results of the present study suggest that the absence of MGCs reaction may constitute an indicator of a more aggressive biological behavior in OTSCCs. In addition, the association of this microscopic finding with the histopathological grade of malignancy in OTSCCs suggests that it may represent a foreign body reaction to keratin in these malignancies.

**Keywords:** Squamous cell carcinoma; Tongue; Giant cells; Immunohistochemistry.

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **AE1** Refere-se ao anticorpo monoclonal anticitoqueratina AE1.
- **AE3** Refere-se ao anticorpo monoclonal anticitoqueratina AE3.
- **CCE** Carcinoma de células escamosas.
- **CCELO** Carcinoma de células escamosas de língua oral.
- **CCEO** Carcinoma de células escamosas oral.
- **CCL2** Refere-se à quimiocina CCL2.
- **CD11-C** Do inglês *cluster of differentiation 11-C*, traduzido como grupamento de diferenciação 11-C.
- **CD36** Do inglês *cluster of differentiation 36*, traduzido como grupamento de diferenciação 36.
- **CD68** Do inglês *cluster of differentiation 68*, traduzido como grupamento de diferenciação 68.
- **CD163** Do inglês *cluster of differentiation 163*, traduzido como grupamento de diferenciação 163.
- **CD204** Do inglês *cluster of differentiation 204*, traduzido como grupamento de diferenciação 204.
- **CGM** Célula gigante multinucleada.
- **CPT** Carcinoma papilífero de tireoide.
- **DC-STAMP** Do inglês *dendritic-cell specific transmembrane protein*, traduzido como proteína transmembrana específica das células dendríticas.
- **HLA-DR** Do inglês *human leukocyte antigen-DR*, traduzido como antígeno leucocitário humano-DR.
- **HPF** Do inglês *high power field*, traduzido como campo de grande aumento.
- **IL-4** Do inglês *interleukin-4*, traduzido como interleucina 4.
- **IL-10** Do inglês *interleukin-10*, traduzido como interleucina 10.
- **IL-12** Do inglês *interleukin-12*, traduzido como interleucina 12.
- **IL-13** Do inglês *interleukin-13*, traduzido como interleucina 13.
- **IL-23** Do inglês *interleukin-23*, traduzido como interleucina 23.
- **M1** Macrófago tipo 1.
- **M2** Macrófago tipo 2.
- **MMP** Do inglês *matrix metalloproteinase*, traduzido como metaloproteinase de

matriz.

- **MMP-9** Do inglês *matrix metalloproteinase-9*, traduzido como metaloproteinase de matriz-9.
  - **MMP-12** Do inglês *matrix metalloproteinase-12*, traduzido como metaloproteinase de matriz-12.
  - **RANK** Do inglês *receptor activator of nuclear factor kappa-B*, traduzido como receptor ativador do fator nuclear kappa-B.
  - **RANK-L** Do inglês *receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*, traduzido como ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa-B.
  - **STAT6** Do inglês *signal transducer and activator of transcription 6*, traduzido como transdutor de sinal e ativador de transcrição 6.
  - **TRAP** Do inglês *tartrate-resistant acid phosphatase*, traduzido como fosfatase ácida resistente ao tartarato.
  - **TREM2** Do inglês *triggering receptor expressed on myeloid cells 2*, traduzido como receptor de disparo expresso nas células mieloides 2.
  - **TGF- $\beta$**  Do inglês *transforming growth factor beta*, traduzido como fator transformante de crescimento beta.
  - **VEGF** Do inglês *vascular endothelial growth factor*, traduzido como fator de crescimento endotelial vascular.
  - **VEGF-C** Do inglês *vascular endothelial growth factor-C*, traduzido como fator de crescimento endotelial vascular-C.
-

# LISTA DE ILUSTRAÇÕES

---

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	<b>Página</b>
<b>Quadro 1.</b> Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.....	25
<b>Quadro 2.</b> Elenco de variáveis dependentes analisadas no estudo.....	26
<b>Quadro 3.</b> Sistema de estadiamento clínico TNM para o CCE oral, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).....	26
<b>Quadro 4.</b> Categorias de estadiamento clínico TNM para o CCE oral, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).....	27
<b>Quadro 5.</b> Especificidade, nº do catálogo, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação do anticorpo primário utilizado no estudo.....	30
<b>Figura 1.</b> Aspectos histopatológicos e imunoistoquímico da reação de CGMs em CCELO. A) Fotomicrografia em menor aumento exibindo CCELO com intenso infiltrado inflamatório e reação de CGMs em proximidade com o parênquima tumoral (Hematoxilina e eosina, escala = 200 µm). B-C) CGMs em íntima associação com a ceratina e as células neoplásicas de CCELO bem diferenciado (Hematoxilina e eosina, escala = 100 µm). (D) Forte imunorreatividade citoplasmática para CD68 em CGMs (Reveal, 50 µm).....	37

---

## LISTA DE TABELAS

---

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Distribuição dos casos de CCELO de acordo com os parâmetros clinicopatológicos.....	34
<b>Tabela 2.</b> Distribuição dos casos de CCELO de acordo com a presença de CGMs e os parâmetros clinicopatológicos.....	35
<b>Tabela 3.</b> Distribuição dos casos de CCELO de acordo com a distribuição da CGMs e os parâmetros clinicopatológicos .....	36

# SUMÁRIO

---

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b> 20
<b>2</b>	<b>METODOLOGIA.....</b> 23
2.1	ASPECTOS ÉTICOS..... 24
2.2	TIPO DE ESTUDO..... 24
2.3	POPULAÇÃO..... 24
2.4	AMOSTRA..... 24
<b>2.4.1</b>	<b>Critérios de inclusão.....</b> 24
<b>2.4.2</b>	<b>Critérios de exclusão.....</b> 25
2.5	VARIÁVEIS..... 25
2.6	ESTUDO CLÍNICO..... 26
2.7	ESTUDO MORFOLÓGICO..... 28
2.8	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO..... 29
<b>2.8.1</b>	<b>Método imunoistoquímico.....</b> 29
<b>2.8.2</b>	<b>Análise imunoistoquímica.....</b> 30
2.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 31
<b>3</b>	<b>RESULTADOS.....</b> 32
<b>4</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b> 38
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b> 43
	<b>REFERÊNCIAS.....</b> 45
	<b>ANEXO.....</b> 50
	<b>APÊNDICES.....</b> 53

# INTRODUÇÃO

---

## 1 INTRODUÇÃO

Com incidência de 200.000 novos casos por ano em todo o mundo (SHIELD *et al.*, 2017), o carcinoma de células escamosas (CCE) é a neoplasia maligna mais frequente da cavidade oral. O CCE oral (CCEO), que exhibe etiologia multifatorial associada ao uso do tabaco e álcool (SURESH *et al.*, 2019), é usualmente diagnosticado em homens na sexta década de vida e afeta a língua com maior frequência (PIRES *et al.*, 2013; FENG *et al.*, 2017; BUCHAKJIAN *et al.*, 2018). Registros de câncer em todo o mundo revelam um aumento na incidência do CCE de língua oral (CCELO), variando de 0,4% a 3,3% ao ano (NG *et al.*, 2017). Além disso, apesar dos avanços no tratamento dos pacientes com CCELO, estudos revelam taxas de sobrevivência em cinco anos inferiores a 54% (NÓBREGA *et al.*, 2018; MUKDAD *et al.*, 2019).

Interações entre células do sistema imune e células neoplásicas, no microambiente tumoral, têm sido alvo de investigações para o desenvolvimento de imunoterapias contra os CCEs (JIN; QIN, 2020). Dentre as células inflamatórias existentes nesse microambiente, destacam-se os macrófagos (ESSA *et al.*, 2014; ESSA *et al.*, 2016; WU; DAI, 2017). Essas células, derivadas dos monócitos circulantes do sangue ou da proliferação local de macrófagos teciduais (LEITE *et al.*, 2015; RUBIO *et al.*, 2019), possuem ampla plasticidade funcional e são capazes de se polarizarem em dois fenótipos principais: macrófagos classicamente ativados (M1) e macrófagos ativados de forma alternativa (M2) (LEITE *et al.*, 2015; SCUTTI *et al.*, 2016; SÁNCHEZ-ROMERO *et al.*, 2018).

Os macrófagos também são capazes de realizar fusão e dar origem a células gigantes multinucleadas (CGMs) (ANDERSON, 2000; VIGNERY, 2005; BRODBECK; ANDERSON, 2009; PATIL; RAO; GAVANI, 2013; ARAMIN *et al.*, 2019). Esse processo, modulado por combinações de diversas citocinas, receptores, moléculas de adesão e mediadores químicos, incluindo interleucina-4 (IL-4), interleucina-13 (IL-13), quimiocina CCL2, DC-STAMP, STAT6, E-caderina, CD36 e TREM-2 (DEFIFE *et al.*, 1997; KYRIAKIDES *et al.*, 2004; MORENO *et al.*, 2007; HELMING; GORDON, 2009), pode resultar na formação de CGMs com diferentes fenótipos, a exemplo das CGMs do tipo corpo estranho, do tipo Langhans e semelhantes a osteoclastos (ARAMIN *et al.*, 2019). A considerável variação fenotípica desses tipos celulares, que estão envolvidos em processos biológicos diversos, é suportada por diferenças nos perfis imunistoquímicos dos vários tipos de CGMs (ARAMIN *et al.*, 2019). Embora apresentem importantes variações nos perfis de imunexpressão, CGMs de origem

monocítica/ macrofágica compartilham a positividade ao anticorpo anti-CD68 (SHISHIDO-HARA *et al.*, 2010; MOGHADDAM *et al.*, 2018; ARAMIN *et al.*, 2019).

A reação de CGMs tem sido reportada em CCEs que acometem diversas localizações anatômicas, como pulmão, colo uterino, pele, vesícula, mama, fígado, tireoide e esôfago (AKATSU *et al.*, 2006; BROOKS *et al.*, 2009; SHISHIDO-HARA *et al.*, 2010; YOZU; GLENGARRY; AHMED, 2011; YU *et al.*, 2014; DIOSCORIDI; BISOGNI; FRESCHI, 2015; KONG *et al.*, 2015; LEE, 2016). Embora a natureza dessa reação permaneça em discussão na literatura, alguns estudos indicam um caráter reativo de provável fenótipo osteoclástico (EMANUEL; SHIM; PHELPS, 2007; ALEMAN-MÉZA *et al.*, 2014). Além disso, há evidências de que a reação de CGMs pode desempenhar funções pró-tumorais (SHISHIDO-HARA *et al.*, 2010; HATANO *et al.*, 2014) e, adicionalmente, contribuir para um comportamento mais agressivo dos CCEs (BROOKS *et al.*, 2009; DIOSCORIDI; BISOGNI; FRESCHI, 2015; CHUNG *et al.*, 2016; MOGHADDAM *et al.*, 2018).

Estudos sobre a reação de CGMs em CCEOs são escassos (BURKHARDT; GEBBERS, 1977; BRANDWEIN; GENSLER, 2005; PATIL; RAO; GAVANI, 2013; ESSA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2017; SÁNCHEZ-ROMERO *et al.*, 2018) e, neste sentido, seu potencial envolvimento na progressão e no comportamento biológico dessas lesões permanece pouco compreendido. Além disso, a natureza dessas CGMs no CCEO tem sido caracterizada ora como uma reação com fenótipo osteoclástico (SÁNCHEZ-ROMERO *et al.*, 2018), ora como uma reação do tipo corpo estranho em resposta à ceratina produzida pelas células neoplásicas (PATIL; RAO; GAVANI, 2013; ESSA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2017).

Até o presente momento, não há estudos que tenham avaliado a relação entre a presença da reação de CGMs e o comportamento biológico dos CCEOs (*Pubmed DataBase*, acesso em 30/11/2020). Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a frequência e a distribuição da reação de CGMs em CCEOs e relacionar esse achado microscópico com parâmetros clinicopatológicos (sexo, idade, tamanho/ extensão do tumor, metástase linfonodal regional e à distância, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade). Pretendeu-se, com esta pesquisa, contribuir para um melhor entendimento sobre a influência da reação de CGMs na progressão tumoral dos CCEOs.

# METODOLOGIA

---

## **2 METODOLOGIA**

### **2.1 ASPECTOS ÉTICOS**

Em consonância com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, a presente pesquisa foi cadastrada na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil) e submetida à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Conforme parecer nº 24294813.9.0000.5187 (ANEXO A), seu protocolo foi aprovado.

### **2.2 TIPO DE ESTUDO**

Tratou-se de um estudo observacional, analítico e com corte transversal, caracterizado pela avaliação da frequência, distribuição e das características imunoistoquímicas (CD68) da reação de CGMs em casos de CCELO. Ademais, foram estabelecidas relações com parâmetros clinicopatológicos (sexo, idade, tamanho/ extensão do tumor, metástase em linfonodos regionais, metástase à distância, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade) dos casos.

### **2.3 POPULAÇÃO**

A população do presente estudo foi constituída por todos os casos de CCELO diagnosticados e arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB, no período de Janeiro de 2000 a Setembro de 2015.

### **2.4 AMOSTRA**

Por meio da técnica de amostragem do tipo não probabilística, por conveniência, foram selecionados 61 casos de CCELO. Todas as amostras estavam emblocadas em parafina e foram advindas do serviço anteriormente citado.

#### **2.4.1 Critérios de inclusão**

Foram incluídos na amostra, apenas os casos de CCELO tratados por excisão cirúrgica,

os quais possibilitaram a avaliação do *front* de invasão tumoral. Além disso, só foram incluídos na pesquisa os casos cujos prontuários continham informações relativas ao sexo e idade dos pacientes, bem como à localização anatômica da lesão, tamanho/ extensão do tumor, metástase linfonodal regional, metástase à distância e estágio clínico.

#### 2.4.2 Critérios de exclusão

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

#### 2.5 VARIÁVEIS

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

**Quadro 1.** Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Sexo	Sexo do paciente	Feminino Masculino
Idade	Idade do paciente (em anos)	-
Tamanho do tumor	Tamanho/ extensão do tumor primário	T1 T2 T3 T4
Metástase linfonodal regional	Metástase em linfonodos regionais	N0 N1 N2 N3
Metástase à distância	Metástase à distância	M0 M1
Estágio clínico	Classificação da lesão considerando o tamanho do tumor (T), a metástase regional (N) e a metástase à distância (M)	Estágio I Estágio II Estágio III

		Estágio IV
Grau histopatológico de malignidade proposto pela OMS (CARDESA <i>et al.</i> , 2005; SLOAN <i>et al.</i> , 2017)	Classificação histopatológica do tumor considerando o grau de diferenciação celular	Bem diferenciado Moderadamente diferenciado Pobrememente diferenciado

**Quadro 2.** Elenco de variáveis dependentes analisadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA
Frequência da reação de CGM	Presença ou ausência da reação de CGM	Presente Ausente
Distribuição da reação de CGM	Número de HPF (400×) contendo reação de CGM	Distribuição focal ( $\leq 5$ HPF) Distribuição difusa ( $> 5$ HPF)

## 2.6 ESTUDO CLÍNICO

Por meio de prontuários médicos, foram coletados dados relativos à idade e ao sexo dos pacientes. Considerando os parâmetros apresentados na sexta edição da Classificação TNM dos Tumores Malignos (SOBIN; WITTEKIND, 2002), apresentados nos Quadros 3 e 4, foram obtidas informações sobre a localização da lesão, o tamanho do tumor, a presença de metástase em linfonodos regionais e à distância e ao estágio clínico. Os dados recolhidos foram anotados em uma ficha específica (APÊNDICE A).

**Quadro 3.** Sistema de estadiamento clínico TNM para o CCE oral, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).

TAMANHO/ EXTENSÃO DO TUMOR PRIMÁRIO (T)	
<b>TX</b>	O tumor primário não pode ser avaliado
<b>T0</b>	Não há evidência de tumor primário
<b>Tis</b>	Carcinoma in situ
<b>T1</b>	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
<b>T2</b>	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
<b>T3</b>	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão
<b>T4a</b>	Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/ extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face

<b>T4b</b>	Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigoides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna
<b>ENVOLVIMENTO DE LINFONODO REGIONAL (N)</b>	
<b>NX</b>	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
<b>N0</b>	Ausência de metástase em linfonodos regionais
<b>N1</b>	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão
<b>N2</b>	N2a – Metástase em um único linfonodo homolateral com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão N2b – Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão N2c – Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
<b>N3</b>	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão
<b>ENVOLVIMENTO POR METÁSTASES DISTANTES (M)</b>	
<b>MX</b>	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
<b>M0</b>	Ausência de metástase à distância
<b>M1</b>	Metástase à distância

**Quadro 4.** Categorias de estadiamento clínico TNM para o CCE oral, preconizado por Sobin e Wittekind (2002).

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

## 2.7 ESTUDO MORFOLÓGICO

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 5µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro e, posteriormente, submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Dois examinadores previamente treinados analisaram a presença ou ausência da reação de CGMs sob microscopia óptica (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE). Critérios histológicos para caracterizar a morfologia de uma CGM foram empregados por meio da adaptação da metodologia proposta por Brooks *et al.* (2009). Assim, para serem consideradas CGMs, as células deviam: estar localizadas no interior ou adjacente às ilhas/células neoplásicas, apresentar citoplasma densamente eosinofílico e ter, pelo menos, três núcleos regularmente dispersos no citoplasma.

Para a análise da distribuição da reação de CGMs, adaptou-se a metodologia utilizada no estudo de Brandwein-Gensler *et al.* (2005). Dessa forma, foram contabilizados os HPF (400×) em que as CGMs estavam presentes e, com base no valor da mediana da quantidade de HPF contendo CGMs, duas categorias referentes à distribuição foram estabelecidas: focal ( $\leq 5$  HPF) e difusa ( $> 5$  HPF). As informações obtidas foram transcritas para uma ficha específica (APÊNDICE B).

O grau histopatológico de malignidade dos CCELOs foi analisado com base no sistema da Organização Mundial de Saúde (OMS) (CARDESA *et al.*, 2005; SLOAN *et al.*, 2017). Para isso, toda a extensão do tumor foi avaliada e as lesões foram classificadas em: bem, moderadamente e pobremente diferenciadas. Segundo esse sistema, lesões bem diferenciadas se assemelham ao epitélio escamoso normal, enquanto lesões moderadamente diferenciadas demonstram pleomorfismo nuclear distinto e atividade mitótica, incluindo mitoses atípicas, além de menor ceratinização. Nos carcinomas pobremente diferenciados, células imaturas são predominantes, com numerosas mitoses típicas e atípicas, bem como mínima ceratinização (CARDESA *et al.*, 2005). Os dados obtidos com esta avaliação foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE C).

Ressalta-se que, além do desconhecimento dos dados clínicos relacionados aos casos por parte dos examinadores durante a análise da reação de CGMs e do grau histopatológico de malignidade dos CCELOs, os casos discordantes foram resolvidos por consenso pelos examinadores.

## 2.8 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

### 2.8.1 Método imunoistoquímico

A análise imunoistoquímica foi realizada apenas com os casos contendo reação de CGMs, anteriormente selecionados na análise morfológica. Sendo assim, a amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro devidamente preparadas com adesivo à base de organossilano (3-aminopropiltriétoxissilano, Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA). Em seguida, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*Reveal<sup>TM</sup>*, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA), utilizando o anticorpo monoclonal anti-CD68 (QUADRO 5). Cortes histológicos de granuloma periapical foram usados como controle positivo para o anticorpo anti-CD68. O controle negativo consistiu na omissão do anticorpo primário no protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Departamento de Odontologia da UEPB descrito a seguir:

- Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (15 minutos cada);
- Reidratação em cadeia descendente de etanóis:
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
  - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
  - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos)
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Recuperação antigênica (QUADRO 5);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);

- Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação dos cortes com anticorpo primário, em solução diluente (*Antibody diluent*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), a 4°C em câmara úmida;
- Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação com anticorpo secundário (*Complement*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- Passagens rápidas em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (2 trocas);
- Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*HRP Conjugated*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), a 4°C em câmara úmida (30 minutos);
- Duas passagens em solução de TRIS-HCl Tween pH 7,4 (5 minutos cada);
- Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*DAB Substrate system*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA) (10 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (8 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Desidratação em álcool absoluto:
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- Montagem em polímero de acrilatos (*Entellan® new*, Merck KGaA, Darmstadt, DE).

**Quadro 5.** Especificidade, nº do catálogo, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação do anticorpo primário utilizado no estudo.

Especificidade	Nº catálogo	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
CD68	PG-M1	Dako	1:1500	Citrato, pH 6,0 <i>Steamer</i> , 90°C, 30 min	60 minutos

### 2.8.2 Análise imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, os

espécimes foram analisados, sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), por dois examinadores previamente treinados. A análise imunoistoquímica foi realizada a fim de verificar a imunorreatividade ao anticorpo anti-CD68, confirmando, assim, a natureza monocítica/ macrofágica das CGMs.

## 2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com as análises clínicas e morfológicas foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA).

Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os testes do Qui-quadrado e exato de Fisher, dependendo da distribuição dos casos nas tabelas de contingência, foram utilizados para analisar as possíveis associações entre a presença e a distribuição da reação de CGMs e os parâmetros clinicopatológicos (sexo, idade, tamanho/ extensão do tumor, metástase em linfonodos regionais, metástase à distância, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade).

Para todos os testes da presente pesquisa, foi considerado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## RESULTADOS

---

### 3 RESULTADOS

Na presente amostra, foi observada uma maior frequência de casos de CCELO em indivíduos do sexo masculino ( $n = 38$ ; 62,3%), com uma proporção homem:mulher de 1,65:1. A idade dos pacientes variou de 30 a 91 anos, com média de  $65,02 \pm 14,84$  anos. Em relação ao tamanho do tumor, constatou-se maior frequência de casos classificados como T2 ( $n = 28$ ; 45,9%). Ausência de metástase linfonodal regional foi observada em maior frequência ( $n = 37$ ; 60,7%). Por sua vez, a presença de metástase à distância foi constatada em apenas seis casos (9,8%). A análise do estadiamento clínico revelou maior frequência dos casos classificados como estágio I ( $n = 17$ ; 27,9%) e II ( $n = 17$ ; 27,9%) (Tabela 1).

Em relação ao grau histopatológico de malignidade, verificou-se uma maior frequência dos casos moderadamente diferenciados ( $n = 30$ ; 49,2%) (Tabela 1). A reação de CGMs foi identificada em 21 (34,4%) dos 61 casos de CCELO (Figura 1) (Tabela 1). Nesses casos, a quantidade de HPFs variou de 1 a 27 (mediana = 5). Os casos com  $\leq 5$  HPFs contendo a reação de CGMs foram classificados como uma distribuição focal de CGMs e aqueles com  $> 5$  HPFs como uma distribuição difusa. Doze (57,1%) casos apresentaram distribuição focal (Tabela 1). Ressalta-se que, em todos os casos, as CGMs exibiram positividade citoplasmática para CD68 (Figura 1D).

Não foram constatadas associações estatisticamente significativas entre a presença/ausência da reação de CGMs e o sexo ( $p = 0,547$ ) e a idade dos pacientes ( $p = 0,202$ ) (Tabela 2). Em relação às características clínicas dos CCELOs, foi observada associação significativa entre a ausência da reação de CGMs e a presença de metástases linfonodais regionais ( $p = 0,027$ ) e estágios clínicos avançados ( $p = 0,006$ ) (Tabela 2). Não foram constatadas associações estatisticamente significativas entre a presença/ausência da reação de CGMs e o tamanho do tumor ( $p = 0,152$ ) e a metástase à distância ( $p = 0,654$ ). Em relação ao grau histopatológico de malignidade, houve forte associação entre a ausência de reação das CGMs e os tumores moderadamente / pobremente diferenciados ( $p = 0,001$ ) (Tabela 2).

A frequência da reação de CGMs foi 2,75 vezes maior nos tumores sem metástase nodal regional do que nos tumores com presença de metástases linfonodais (RP: 2,75; IC 95%: 1,05-7,20). Ademais, a ocorrência desse achado microscópico foi 3,37 e 3,36 vezes maior, respectivamente, nos CCELOs que se apresentavam em estágios clínicos iniciais (RP: 3,37; 95% IC: 1,28-8,85) e bem diferenciados (RP: 3,36; 95% IC: 1,51-7,48), quando comparados aos casos que se apresentavam em estágios clínicos avançados e moderadamente/pobremente diferenciados (Tabela 2).

Na avaliação da distribuição da reação de CGMs nos CCELOs, a análise estatística revelou ausência de associação significativa com o sexo ( $p = 0,087$ ) e a idade ( $p = 1,000$ ) dos pacientes (Tabela 3). De forma similar, não foram constatadas associações estatisticamente significativas entre a distribuição da reação de CGMs e o tamanho/ extensão do tumor ( $p = 1,000$ ), a metástase linfonodal regional ( $p = 0,603$ ), a metástase à distância ( $p = 0,429$ ), o estágio clínico ( $p = 0,603$ ) e o grau histopatológico de malignidade ( $p = 0,523$ ) das lesões (Tabela 3).

**Tabela 1.** Distribuição dos casos de CCELO de acordo com os parâmetros clinicopatológicos.

<b>Parâmetros clinicopatológicos</b>	<b>n (%)</b>
<b>Sexo</b>	
Masculino	38 (62,3)
Feminino	23 (37,7)
<b>Tamanho do tumor</b>	
T1	19 (31,1)
T2	28 (45,9)
T3	8 (13,1)
T4	6 (9,8)
<b>Metástase regional</b>	
N0	37 (60,7)
N1	13 (21,3)
N2	6 (9,8)
N3	5 (8,2)
<b>Metástase à distância</b>	
M0	55 (90,2)
M1	6 (9,8)
<b>Estágio clínico</b>	
Estágio I	17 (27,9)
Estágio II	17 (27,9)
Estágio III	15 (24,6)
Estágio IV	12 (19,7)
<b>Grau Histopatológico</b>	
Bem diferenciado	26 (42,6)
Moderadamente diferenciado	30 (49,2)
Pobremente diferenciado	5 (8,2)
<b>Reação de CGMs</b>	

Presente	21 (34,4)
Ausente	40 (65,6)
<b>Quantidade de HPFs com reação de CGMs</b>	
≤ 5 HPFs	12 (57,1)
> 5 HPFs	9 (42,9)

**Tabela 2.** Distribuição dos casos de CCELO de acordo com a presença de CGMs e os parâmetros clinicopatológicos.

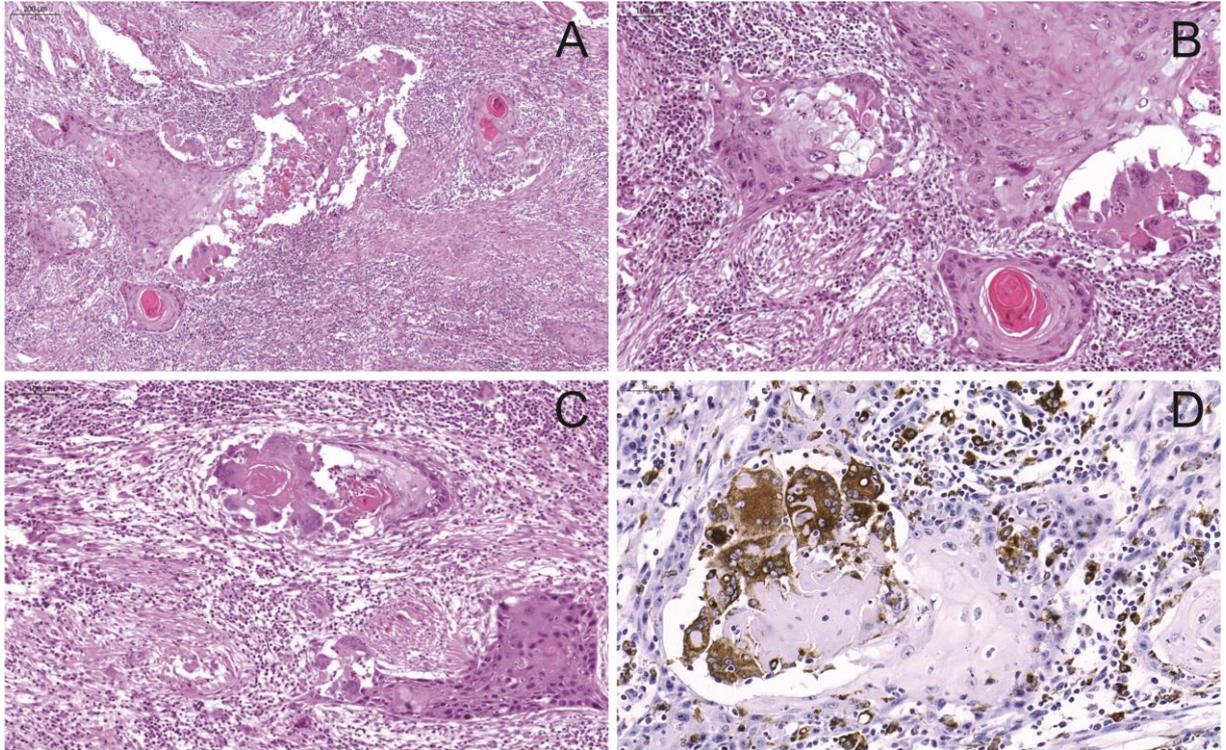
Parâmetros clinicopatológicos	Reação de CGMs		P	IC 95%
	Presente n (%)	Ausente n (%)		
<b>Sexo</b>				
Masculino	12 (31,6)	26 (68,4)	0,547*	0,80 (0,40-1,61)
Feminino	9 (39,1)	14 (60,9)		
<b>Idade</b>				
Até 67 anos	9 (27,3)	24 (72,7)	0,202*	0,63 (0,31-1,28)
Acima de 67 anos	12 (42,9)	16 (57,1)		
<b>Tamanho do tumor</b>				
T1	9 (47,4)	10 (52,6)	0,152*	1,65 (0,84-3,25)
T2 – T4	12 (28,6)	30 (71,4)		
<b>Metástase regional</b>				
N0	17 (45,9)	20 (54,1)	<b>0,027**</b>	<b>2,75 (1,05-7,20)</b>
N1 – N3	4 (16,7)	20 (83,3)		
<b>Metástase à distância</b>				
M0	20 (36,4)	35 (63,6)	0,654**	2,18 (0,35-13,50)
M1	1 (16,7)	5 (83,3)		
<b>Estágio clínico</b>				
I – II	17 (50,0)	17 (50,0)	<b>0,006**</b>	<b>3,37 (1,28-8,85)</b>
III – IV	4 (14,8)	23 (85,2)		
<b>Grau Histopatológico</b>				
Bem diferenciado	15 (57,7)	11 (42,3)	<b>0,001*</b>	<b>3,36 (1,51-7,48)</b>
Moderadamente/pobrememente diferenciado	6 (17,1)	29 (82,9)		

\*Teste Qui-quadrado \*\*Teste exato de Fisher.

**Tabela 3.** Distribuição dos casos de CCELO de acordo com a distribuição da CGMs e os parâmetros clinicopatológicos.

Parâmetros clinicopatológicos	Reação de CGMs		P	IC 95%
	≤ 5 HPFs n (%)	> 5 HPFs n (%)		
<b>Sexo</b>				
Masculino	9 (75,0)	3 (25,0)	0,087*	0,37 (0,12-1,10)
Feminino	3 (33,3)	6 (66,7)		
<b>Idade</b>				
Até 67 anos	5 (55,6)	4 (44,4)	1,000*	1,06 (0,39-2,87)
Acima de 67 anos	7 (58,3)	5 (41,7)		
<b>Tamanho do tumor</b>				
T1	5 (55,6)	4 (44,4)	1,000*	0,95 (0,44-2,02)
T2 – T4	7 (58,3)	5 (41,7)		
<b>Metástase regional</b>				
N0	9 (52,9)	8 (47,1)	0,603*	0,70 (0,34-1,45)
N1 – N3	3 (75,0)	1 (25,0)		
<b>Metástase à distância</b>				
M0	12 (60,0)	8 (40,0)	0,429*	-
M1	0 (0,0)	1 (100,0)		
<b>Estágio clínico</b>				
I – II	9 (52,9)	8 (47,1)	0,603*	0,70 (0,34-1,45)
III – IV	3 (75,0)	1 (25,0)		
<b>Grau histopatológico</b>				
Bem diferenciado	9 (60,0)	6 (40,0)	0,523*	1,20 (0,48-2,95)
Moderadamente/pobrememente diferenciado	3 (50,0)	3 (50,0)		

\*Teste exato de Fisher.



**Figura 1.** Aspectos histopatológicos e imunoistoquímico da reação de CGMs em CCELO. A) Fotomicrografia em menor aumento exibindo CCELO com intenso infiltrado inflamatório e reação de CGMs em proximidade com o parênquima tumoral (Hematoxilina e eosina, escala = 200  $\mu$ m). B-C) CGMs em íntima associação com a ceratina e as células neoplásicas de CCELO bem diferenciado (Hematoxilina e eosina, escala = 100  $\mu$ m). (D) Forte imunorreatividade citoplasmática para CD68 em CGMs (Reveal, 50  $\mu$ m).

DISCUSSÃO

---

## 4 DISCUSSÃO

A reação de CGMs tem sido investigada em diversas neoplasias intra e extraorais (BROOKS *et al.*, 2009; SHISHIDO-HARA *et al.*, 2010; DIOSCORIDI; BISOGNI; FRESCHI, 2015; BRANDWEIN; GENSLER, 2005; PATIL; RAO; GAVANI, 2013; SANTOS *et al.*, 2017; SÁNCHEZ-ROMERO *et al.*, 2018). Este estudo avaliou a frequência e distribuição da reação de CGMs em CCELOs e a relação desse achado histopatológico com parâmetros clinicopatológicos. Os resultados sugerem que a ausência dessa reação está associada com a progressão tumoral e o comportamento biológico mais agressivo dessas neoplasias. Além disso, sugere-se que a presença desse achado microscópico representa uma resposta do tipo corpo estranho à ceratina, em virtude de sua associação com o grau histopatológico de malignidade dos CCELOs.

Estudos que tenham avaliado a frequência da reação de CGMs em CCEOs são escassos (BRANDWEIN; GENSLER, 2005; SANTOS *et al.*, 2017). Em um estudo que avaliou 292 casos de CCEO, incluindo amostras de CCELOs, Brandwein-Gensler *et al.* (2005) identificaram a presença da reação de CGMs em 21% (n = 62) dos casos analisados. Nesse contexto, Santos *et al.* (2017), ao analisarem a frequência e a distribuição da reação em CCEs de lábio inferior, observaram a existência da reação de CGMs em 39,6% (n = 36) dos 91 casos examinados. Este estudo identificou a presença da reação de CGMs em 34,4% (n = 21) nos 61 casos de CCELO investigados. Desse modo, os achados da presente pesquisa, em conjunto com os reportados por outros estudos, demonstram que a reação de CGMs é um achado microscópico relativamente comum em CCEOs e de lábio inferior.

Até o presente momento, os significados clínico e biológico da reação de CGMs em CCEOs não são bem compreendidos. Brandwein-Gensler *et al.* (2005) observaram que não houve associação estatística da reação de CGMs em CCEOs com a sobrevida geral e recorrência local. De forma similar, um estudo em CCEs de lábio inferior também observou ausência de associação significativa desse achado microscópico com os parâmetros clínicos avaliados (SANTOS *et al.*, 2017). Em contrapartida, a presente pesquisa revelou associação significativa entre a ausência da reação de CGMs em CCELOs e presença de metástase linfonodal regional ( $p = 0,027$ ), estágios clínicos mais avançados ( $p = 0,006$ ) e tumores moderadamente/pobrememente diferenciados ( $p = 0,001$ ). Em conjunto, tais resultados sugerem que a ausência da reação de CGMs pode constituir um indicador de maior agressividade nos CCELOs.

Alguns estudos têm demonstrado que, em carcinomas extraorais, a presença da reação de CGMs pode estar associada a um comportamento biológico mais agressivo (RYDER *et al.*, 2008; BROOKS *et al.*, 2009; GULUBOVA; IVANOVA, 2019). Em um estudo com carcinoma papilífero da tireoide (CPT), Brooks *et al.* (2009) demonstraram que neoplasias com maior quantidade de CGMs ( $\geq 3$  células) eram mais propensas a ter extensão extratireoidiana ( $p = 0,028$ ) e maior tamanho (2,5 cm) ( $p = 0,0025$ ) que casos com pouca ou nenhuma CGM. De forma semelhante, Gulubova e Ivanova (2019) observaram que CPTs com maior densidade de CGMs ( $\geq 3$  células) estavam associados a estágios clínicos mais avançados ( $p = 0,013$ ). As razões para os papéis aparentemente divergentes da reação de CGMs em carcinomas extraorais e CCEOs ainda são desconhecidas, mas podem estar relacionadas à ampla plasticidade funcional destes tipos celulares.

A maior ocorrência da reação de CGMs em CCEOs bem diferenciados, reportada neste estudo, pode sugerir que estas células representem uma resposta do tipo corpo estranho à ceratina produzida pela neoplasia, assim como relatado em outras investigações com CCEOs (PATIL; RAO; GAVANI, 2013) e CCEs de lábio inferior (SANTOS *et al.*, 2017). A ceratina produzida no estroma tumoral é considerada um corpo estranho e sua presença pode desencadear uma inflamação granulomatosa (PATIL; RAO; GAVANI, 2013). Em virtude da ineficiência dos macrófagos mononucleares para a digestão da ceratina, estas células são levadas a se fusionarem para finalizar o processo de degradação (SANTOS *et al.*, 2017). Por outro lado, Sánchez-Romero *et al.* (2018) identificaram, por meio de imunopositividade para citoqueratinas AE1/AE3, células epiteliais neoplásicas no citoplasma de CGMs em um caso de CCELO. De acordo com esses autores, a presença de células epiteliais fagocitadas, sem aparente ceratinização ou apoptose, no interior de CGMs, sugere que essa reação não esteja associada à ceratina extracelular no microambiente tumoral (SÁNCHEZ-ROMERO *et al.*, 2018).

Investigações anteriores demonstraram evidências da origem monocítica da reação de CGMs em neoplasias malignas ao exibirem positividade ao CD68 em todos os casos (BROOKS *et al.*, 2009; PATIL; RAO; GAVANI, 2013; ESSA *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2017; MOGHADDAM *et al.*, 2018; SÁNCHEZ-ROMERO *et al.*, 2018). No que diz respeito ao perfil de polarização destas células, um estudo sobre CGMs em CCEs de lábio inferior sugeriu a existência do fenótipo M1 ao observarem maior expressão do HLA-DR em comparação com o CD163, nestas células, pela técnica de imunistoquímica (SANTOS *et al.*, 2017). Nesse contexto, Sánchez-Romero *et al.* (2018) também indicaram o mesmo perfil de polarização em um relato de CCELO ao detectarem que essas células exibiam positividade ao marcador CD11-

C, que é comumente utilizado para caracterizar o fenótipo M1 (ALVES; DIEL; LAMERS, 2018). Esse fenótipo é relacionado a atividades antitumorais, com produção de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio e citocinas pró-inflamatórias, como interleucina-12 (IL-12) e interleucina-23 (IL-23) (FUNES *et al.*, 2018).

Ao analisarem 30 casos de CCEOs, Essa *et al.* (2014) observaram que as CGMs eram CD68<sup>+</sup>, CD204<sup>+</sup> e CD163<sup>-</sup>. O mesmo perfil imunoistoquímico foi constatado por Essa *et al.* (2016), em cocultura direta de CGMs com células ZK-1 (linhagem celular derivada de CCE de língua), sugerindo uma diferenciação parcial para o fenótipo M2. Comumente, esse perfil de polarização é associado a mecanismos pró-tumorais, incluindo a síntese de fatores pró-angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), metaloproteinases de matriz (MMPs) e citocinas anti-inflamatórias, tais como a interleucina-10 (IL-10) e o fator transformante de crescimento beta (TGF- $\beta$ ) (LASKIN *et al.*, 2011; LEITE *et al.*, 2015; SCUTTI *et al.*, 2016; EDHOLM; RHOO; ROBERT, 2017).

No caso de CCELO reportado por Sánchez-Romero *et al.* (2018), os autores observaram um perfil fenotípico peculiar para a reação de CGMs. A análise imunoistoquímica revelou positividade dessas células para o receptor ativador do fator nuclear kappa-B (RANK) e seu ligante (RANK-L), sugerindo um possível fenótipo osteoclástico. Por outro lado, na pesquisa realizada por Santos *et al.* (2017), a maioria das CGMs no microambiente de CCEs de lábio inferior apresentaram positividade para HLA-DR, sugerindo ausência de um fenótipo antigênico osteoclástico. Escassos estudos com carcinomas que acometem outras localizações anatômicas, como fígado e mama, também têm sugerido um possível fenótipo osteoclástico para as CGMs (SHISHIDO-HARA *et al.*, 2010; DIOSCORIDI; BISOGNI; FRESCHI, 2015). Nesse contexto, uma análise imunoistoquímica em dois casos de carcinoma de mama revelou expressão de marcadores osteoclásticos (MMP-9, MMP-12, VEGF, fosfatase ácida resistente ao tartarato [TRAP] e catepsina K), mas não de HLA-DR, em CGMs (SHISHIDO-HARA *et al.*, 2010). Resultados de estudo *in vitro* e em modelo xenográfico *in vivo* sugerem que CGMs com fenótipo osteoclástico podem desempenhar atividades pró-tumorais, contribuindo para o crescimento neoplásico por estimularem a linfangiogênese através da secreção do fator de crescimento vascular endotelial-C (VEGF-C) (HATANO *et al.*, 2014).

Em conjunto, os resultados do presente estudo e os achados imunoistoquímicos reportados por Santos *et al.* (2017) e Sánchez-Romero *et al.* (2018) sugerem um predomínio de CGMs com perfil de polarização M1 no microambiente dos CCELOS. Dessa forma, nessas neoplasias malignas, as CGMs poderiam desempenhar atividades predominantemente antitumorais. Ressalta-se, no entanto, a necessidade de estudos para confirmar o perfil de

polarização das CGMs, bem como investigar um possível fenótipo osteoclástico dessas células no microambiente dos CCELOs. Essas iniciativas seriam importantes para esclarecer os significados clínico e biológico da reação de CGMs nessas neoplasias malignas.

Apesar dos importantes achados desta pesquisa, algumas limitações devem ser consideradas. Em particular, deve-se ressaltar o tamanho relativamente pequeno da amostra de CCELOs e a ausência de dados referentes à sobrevida dos pacientes. Essas observações destacam a necessidade de novas investigações para uma melhor compreensão do papel da reação de CGMs na progressão dos CCELOs, bem como sua possível influência no prognóstico destas lesões.

Em conclusão, os achados deste estudo sugerem que ausência da reação de CGMs pode constituir um indicador de comportamento biológico mais agressivo nos CCELOs. No microambiente dessas neoplasias, a presença desse achado microscópico pode representar uma resposta do tipo corpo estranho à ceratina produzida pelas células neoplásicas. Ademais, os resultados desta pesquisa alicerçam a realização de estudos que avaliem um potencial emprego da reação de CGMs como indicador prognóstico nos CCELOs.

CONCLUSÃO

---

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem que a ausência da reação de CGMs pode constituir um indicador de comportamento biológico mais agressivo nos CCELOs. Além disso, a associação desse achado microscópico com o grau histopatológico de malignidade dos CCELOs sugere que o mesmo pode representar uma resposta do tipo corpo estranho à ceratina nessas neoplasias malignas. Os achados desta pesquisa, em conjunto com os resultados provenientes de estudos com CCEO, alicerçam a realização de novas investigações que esclareçam as funções das reações de CGMs no microambiente tumoral dos CCELOs, bem como que possam avaliar sua potencial aplicação como indicador prognóstico em pacientes com essas neoplasias malignas.

## REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

- AKATSU, T. *et al.* Gallbladder carcinoma with osteoclast-like giant cells. **J Gastroenterol.**, v. 41, n. 1, p. 83-7, 2006.
- ALEMÁN-MEZA, L. *et al.* Osteoclastic giant cell rich squamous cell carcinoma of the uterine cervix: A case report and review of the literature. **Case Rep Pathol.**, v. 2014, p.415328, 2014.
- ALVES, A. M.; DIEL, L. F.; LAMERS, M. L. Macrophages and prognosis of oral squamous cell carcinoma: a systematic review. **J Oral Pathol Med.**, v. 47, n. 5, p. 460-7, 2018.
- ANDERSON, J. M. Multinucleated giant cells. **Curr Opin Hematol.**, v. 7, n. 1, p. 40-7, 2000.
- ARAMIN, H. *et al.* Skin and superficial soft tissue neoplasms with multinucleated giant cells: Clinical, histologic, phenotypic, and molecular differentiating features. **Ann Diagn Pathol.**, v. 42, p. 18-32, 2019.
- BRANDWEIN-GENSLER, M. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: Histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease free and overall survival. **Am J Surg Pathol.**, v. 29, n. 2, p. 167-78, 2005.
- BROOKS, E. *et al.* Multinucleated giant cells' incidence, immune markers, and significance: a study of 172 cases of papillary thyroid carcinoma. **Head Neck Pathol.**, v. 3, n. 2, p. 95-9, 2009.
- BRODBECK, W. G. ANDERSON, J. M. Giant cell formation and function. **Curr Opin Hematol.**, v.16, n. 1, p. 53-7, 2009.
- BUCHAKJIAN, M. R. *et al.* Independent predictors of prognosis based on oral cavity squamous cell carcinoma surgical margins. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, v. 159, n. 4, p. 675-82, 2018.
- BURKHARDT, A.; GEBBERS, J. O. Giant cell stromal reaction in squamous cell carcinomata. Electronmicroscopic and ultrahistochemical observations on the genesis and functional activity of multinucleated giant cells in bleomycin-induced tumor regression. **Virchows Arch A Pathol Anat Histol.**, v. 375, n. 4, p. 263-80, 1977.
- CARDESA, A. *et al.* Squamous cell carcinoma. In: Barnes, L. *et al.* **World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of head and neck tumors.** Lyon: IARC Press; 2005. p. 118-21.
- CHUNG, H. J. *et al.* Squamous cell carcinoma with osteoclast-like giant cells: A morphologically heterologous group including carcinosarcoma and squamous cell carcinoma with stromal changes. **J Cutan Pathol.**, v. 43, n. 2, p. 148-57, 2016.
- DEFIFE, K. M. *et al.* Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression. **J Immunol.**, v. 158, n. 7, p. 3385-90, 1997.

DIOSCORIDI, L.; BISOGNI, D.; FRESCHI, G. Hepatocellular carcinoma with osteoclast-like giant cells: report of the seventh case in the literature. **Case Rep Surg.**, v. 2015, p. 836105, 2015.

EDHOLM, E. S.; RHOON, K. H.; ROBERT, J. Evolutionary aspects of macrophages polarization. **Results Probl Cell Differ.**, v. 62, n. 1, p. 3-22, 2017.

EMANUEL, P. O.; SHIM, H.; PHELPS, R. G. Poorly differentiated squamous cell carcinoma with osteoclastic giant-cell-like proliferation. **J Cutan Pathol.**, v. 34, n. 12, p. 930-3, 2007.

ESSA, A. A. *et al.* Keratin pearl degradation in oral squamous cell carcinoma: Reciprocal roles of neutrophils and macrophages. **J Oral Pathol Med.**, v. 43, n. 10, p. 778-84, 2014.

\_\_\_\_\_. Tumour-associated macrophages are recruited and differentiated in the neoplastic stroma of oral squamous cell carcinoma. **Pathology.**, v.48, n. 3, p. 219-27, 2016.

FENG, Z. *et al.* Clinicopathological features, management and outcome of patients with poorly-differentiated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **J Craniomaxillofac Surg.**, v. 45, n. 9, p. 1478-85, 2017.

FUNES, S. C. *et al.* Implications of macrophage polarization in autoimmunity. **Immunology.**, v. 154, n. 2, p. 186-95, 2018.

GULUBOVA, M. V.; IVANOVA, K. V. The expression of tumor-associated macrophages and multinucleated giant cells in papillary thyroid carcinoma. **Open Access Maced J Med Sci.**, v. 7, n. 23, p. 3944-49, 2019.

HATANO, Y. *et al.* Tumor associated osteoclast-like giant cells promote tumor growth and lymphangiogenesis by secreting vascular endothelial growth factor-C. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 446, n. 1, p. 149-54, 2014.

HELMING, L.; GORDON, S. Molecular mediators of macrophage fusion. **Trends Cell Biol.**, v. 19, n. 10, p. 514-22, 2009.

JIN, Y; QIN, X. Profiles of immune cell infiltration and their clinical significance in head and neck squamous cell carcinoma. **Int Immunopharmacol.**, v. 82, n. 1, 2020.

KYRIAKIDES, T. R. *et al.* The CC chemokine ligand, CCL2/MCP1, participates in macrophage fusion and foreign body giant cell formation. **Am J Pathol.**, v. 165, n. 6, p. 2157-66, 2004.

KONG, L. *et al.* Squamous cell carcinoma of lung associated with osteoclast-like giant cells: report of a case. **Int J Clin Exp Pathol.**, v. 8, n. 9, p. 11823-25, 2015.

LASKIN, D. L. *et al.* Macrophages and tissue injury: Agents of defense or destruction? **Annu Rev Pharmacol Toxicol.**, v. 51, n. 1, p. 267-88, 2011.

LEE, D. Acantholytic squamous cell carcinoma of the oesophagus with prevalent single isolated tumour cells including signet ring cells and many osteoclast-like giant cells. **Pathology**, v. 48, n. 3, p. 281-3, 2016.

LEITE, R. B. *et al.* Macrófagos e sua relação com o carcinoma de células escamosas oral. **Rev Faculdade Odontol Lins.**, v. 25, n. 1, p. 37-46, 2015.

MOGHADDAM, P. A. *et al.* Poorly differentiated osteoclast –like giant cell variant of cutaneous squamous cell carcinoma: Uncovering its mutational landscape through massive parallel sequencing. **Pathol Res Pract.**, v. 214, n.11, p. 1898-03, 2018.

MORENO, J. L. *et al.* IL-4 promotes the formation of multinucleated giant cells from macrophage precursors by a STAT6-dependent, homotypic mechanism: contribution of E-cadherin. **J Leukoc Biol.**, v. 82, n. 6, p. 1542-53, 2007

MUKDAD, L. *et al.* Oral tongue squamous cell carcinoma survival as stratified by age and sex: A surveillance, epidemiology, and end results analysis. **Laryngoscope.**, v. 129, n. 9. p. 2076-81, 2019.

NG, J. H. *et al.* Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: a global study. **Head Neck**, v. 39, n. 2, p. 297-304, 2017.

NÓBREGA, T. D. *et al.* Clinicopathological evaluation and survival of patients with squamous cell carcinoma of the tongue. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.**, v. 23, n. 5, p. 579-87, 2018.

PATIL, S.; RAO, R. S.; GANAVI, B. S. A foreigner in squamous cell carcinoma! **J Int Oral Health.**, v. 5, n. 5, p. 147-50, 2013.

PIRES, F. R. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: Clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. **J Appl Oral Sci.**, v. 21, n. 5, p. 460-7, 2013.

RUBIO, C. *et al.* Macrophage polarization as a novel weapon in conditioning tumor microenvironment for bladder cancer: can we turn demons into gods? **Clin Transl Oncol.**, v. 21, n. 4, p. 391-403, 2019.

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

SÁNCHEZ-ROMERO, C. *et al.* Unusual multinucleated giant cell reaction in a tongue squamous cell carcinoma: Histopathological and immunohistochemical features. **Head Neck Pathol.**, v. 12, n. 4, p. 580-6, 2018.

SANTOS, H. B. P. *et al.* Multinucleated giant cell reaction in lower lip squamous cell carcinoma: A clinical, morphological, and immunohistochemical study. **J Oral Pathol Med.**, v. 46, n. 9, p. 773-9, 2017.

- SCUTTI, J. A. B. *et al.* Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC): desvendando os mistérios do microambiente tumoral. **Rev Assoc Paul Cir Dent.**, v. 70, n. 2, p. 156-63, 2016.
- SHIELD, K. D. *et al.* The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. **CA Cancer J Clin.**, v. 67, n. 1, p. 51-64, 2017.
- SHISHIDO-HARA, Y. *et al.* Two cases of breast carcinoma with osteoclast giant cells: are the osteoclast giant cells pro-tumoural differentiation of macrophages? **Diagn Pathol.**, v. 5, p. 55, 2010.
- SLOAN, P. *et al.* **Malignant surface epithelial tumours.** In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. WHO classification of head and neck tumours. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017. p.109-11.
- SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumors.** 6th edition. New Jersey: John Wiley & Sons; 2002. 264p.
- SURESH, G.M. *et al.* Prognostic indicators of oral squamous cell carcinoma. **Ann Maxillofac Surg.**, v. 9, n. 2, p. 364-70, 2019.
- VIGNERY, A. Macrophage fusion: The making of osteoclasts and giant cells. **J Exp Med.**, v. 202, n. 3, p. 337-40, 2005.
- YOZU, M.; GLENGARRY, J.; AHMED, S. S. Cutaneous squamous cell carcinoma associated with proliferation of osteoclast-like giant cells. **J Pak Med Assoc.**, v. 61, n. 9, p. 922-5, 2011.
- YU, G. *et al.* Squamous cell carcinoma of the uterine cervix associated with osteoclast-like giant cells: A case report and review of the literature. **Oncol Lett.**, v. 8, n. 4, p. 1595-8, 2014.
- WU, T.; DAI, Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. **Cancer Lett.**, v. 387, n. 1, p. 61-8, 2017.

ANEXO

---

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

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



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

Profª Dra. Doralúcia Pedrosa de Araújo  
 Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

**PARECER DO RELATOR**

Número do Protocolo: 24294813.9.0000.5187

Data da 1ª relatoria PARECER DO AVALIADOR: 05/02/2014

Pesquisador(a) Responsável: CASSIANO FRANCISCO WEEGE NONAKA

Situação do parecer: Aprovado

**Apresentação do Projeto:** O projeto é intitulado: ***“ESTUDOS MORFOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO DAS REAÇÕES DE CÉLULAS GIGANTES SEMELHANTES A OSTEOCLASTOS EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS”***. O presente estudo se propõe a avaliar a frequência das reações de células gigantes semelhante a osteoclastos (CGSO), bem como suas características imunoistoquímicas (CD68, CD163 e HLA-DR), em uma série de casos de carcinomas de células escamosas orais, e relacioná-las com parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase em linfonodos regionais, metástase à distância e estágio clínico) e grau histopatológico de malignidade dos tumores. A amostra será constituída por 70 casos de carcinoma de células escamosas oral (35 destes localizados em lábio inferior e 35 oriundos de sítios intraorais) com metástase linfonodal regional e 70 casos sem metástase (35 localizados em lábio inferior e 35 localizados em sítios intraorais). Informações a respeito da presença de metástase linfonodal regional e do estadiamento clínico (TNM) serão coletadas nos prontuários médicos dos pacientes. Para o estudo morfológico, serão realizados cortes com 5µm de espessura no material biológico emblocado em parafina, os quais serão estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz, dois examinadores previamente treinados realizarão a análise das reações de CGSO, considerando a presença/ausência, localização (*front* de invasão/ cório tumoral) e distribuição (focal/ difusa) desses tipos celulares. Além disso, será determinado o grau histopatológico de malignidade das lesões, utilizando os sistemas propostos por Bryne (1998) e pela OMS (CARDESA et al., 2005). Para avaliação do perfil imunoistoquímico das reações de CGSO, serão utilizados os anticorpos anti-CD163, anti-CD68 e anti-HLA-DR, em sistema de dupla-marcação. Em sequência, em 5 campos de maior imunorreatividade aos anticorpos, serão quantificadas as células positivas, estabelecendo-se as médias de CGSO com perfil M1 (CD68/HLA-DR) e M2 (CD68/CD163). Possíveis associações entre os achados morfológicos, os parâmetros clínicos e os graus histopatológicos de malignidade serão avaliadas por meio do teste do Qui-quadrado ou do teste exato de Fisher. Após a análise da distribuição de dados, as comparações das quantidades de CGSO M1 e M2, de acordo com os parâmetros clínicos e histopatológicos, serão realizadas por testes paramétricos (t de Student e Anova ONE-Way) ou não paramétricos (Mann-Whitney e Kruskal-Wallis). O nível de significância será estabelecido em 5% ( $p < 0,05$ ). Espera-se encontrar associação da grande quantidade e do perfil imunoistoquímico da reação de CGSO M1, nos carcinomas de células escamosas orais, com o pequeno tamanho dos tumores, com a ausência de metástase em linfonodos regionais e à distância e com o estadiamento da doença em estágios iniciais. Com este trabalho, pretende-se contribuir para o esclarecimento da natureza das reações de CGSO nos carcinomas de células escamosas orais e verificar uma possível relação das mesmas com o comportamento biológico dos tumores.

**Objetivo da Pesquisa:** Tem como Objetivo Geral: avaliar a frequência das reações de CGSO, bem como suas características imunoistoquímicas (CD68, CD163 e HLA-DR), em uma série de casos de carcinomas de células escamosas orais, com o intuito de verificar uma possível relação destas reações com o comportamento biológico do tumor e objetivos específicos: 1- Relacionar a presença das reações de CGSO com parâmetros clínicos (tamanho do tumor primário, envolvimento de linfonodos regionais, envolvimento por metástases distantes e estágio clínico); 2 - Relacionar a presença das reações de CGSO com o grau histopatológico de malignidade dos carcinomas de células escamosas orais; 3 - Relacionar o perfil imunoistoquímico das CGSO, por meio da imunorreatividade aos anticorpos anti-CD68, anti-CD163 e anti-HLA-DR, com parâmetros clínicos (tamanho do tumor primário, envolvimento de linfonodos regionais, envolvimento por metástases distantes e estágio clínico); 4 - Relacionar o perfil imunoistoquímico das CGSO, por meio da imunorreatividade aos anticorpos anti-CD68, anti-CD163 e anti-HLA-DR, com o grau histopatológico de malignidade dos carcinomas de células escamosas orais.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios: Riscos:** Não existem riscos inerentes a esta pesquisa, uma vez que a coleta de dados será em fichas clínicas e utilizará lâminas histológicas e espécimes biológicos mantidos em arquivo, os riscos potenciais implicados na participação nesta pesquisa não estão ao alcance de percepções.

**Benefícios:** contribuir para a identificação de possíveis indicadores de agressividade tumoral em carcinomas de células escamosas orais.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:** O estudo encontra-se com uma fundamentação teórica estruturada atendendo as exigências protocolares do CEP-UEPB mediante a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde e RESOLUÇÃO/UEPB/CONSEPE/10/2001 que rege e disciplina este CEP.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória e Parecer do Avaliador:** Encontram-se anexados os termos de autorização necessários para o estudo. Diante do exposto, somos pela aprovação do referido projeto. Salvo melhor juízo.

**Recomendações:** Atende a todas as exigências protocolares do CEP mediante Avaliador e Colegiado. Diante do exposto, não necessita de recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:** O presente estudo encontra-se sem pendências, devendo o mesmo prosseguir com a execução na íntegra de seu cronograma de atividades.

**Situação do parecer: Aprovado**

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



Profª Dra. Doralúcia Pedrosa de Araújo  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

## APÊNDICES

---





