



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

MARINA GONÇALVES DO AMARAL

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS
(FOXP3+) EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA
ORAL EM INDIVÍDUOS JOVENS E IDOSOS**

CAMPINA GRANDE – PB

2018

MARINA GONÇALVES DO AMARAL

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS
(FOXP3+) EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA
ORAL EM INDIVÍDUOS JOVENS E IDOSOS**

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.

Área de concentração: Patologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka

CAMPINA GRANDE – PB

2018

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.

A485a Amaral, Marina Gonçalves do.
Análise imunoistoquímica de células T regulatórias (FOXP3+) em carcinomas de células escamosas de língua oral em indivíduos jovens e idosos [manuscrito] : / Marina Gonçalves do Amaral. - 2018.
57 p.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.

"Orientação : Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka, Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Neoplasias. 3. Língua.

21. ed. CDD 616.994 31

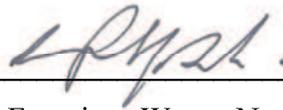
MARINA GONÇALVES DO AMARAL

**ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS (FOXP3+) EM
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA ORAL EM INDIVÍDUOS
JOVENS E IDOSOS**

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: 13 / 06 / 2018

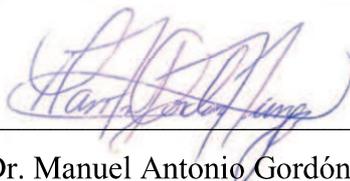
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

DEDICATÓRIA

A **Deus**, meu Pai celestial, refúgio e fortaleza para todas as horas, razão da minha existência, por me sustentar e me possibilitar chegar até aqui.

Aos meus pais, **Getúlio José do Amaral e Claudia Gonçalves de Medeiros**, pelo apoio, dedicação, esforço, compreensão, incentivo, cuidado, proteção e carinho, por serem meu exemplo de pessoas bondosas, dedicadas, honestas, perseverantes, incentivadoras e pacientes. Esse mérito é de vocês, e tudo que sou é por vocês, agradeço a Deus pelas suas vidas, e o seu amor incondicional. Muito obrigada por sonharem comigo, por sempre darem o melhor de si por mim, essa vitória eu dedico a vocês, os grandes amores da minha vida!

*“Ser feliz não é ter uma vida perfeita. Mas usar as lágrimas para irrigar a tolerância. Usar as pedras para refinar a paciência. Usar as falhas para esculpir a serenidade. Usar a dor para lapidar o prazer. Usar os obstáculos para abrir as janelas da inteligência. Quem não estiver preparado para perder o trivial não é digno de conquistar o essencial. E, se formos amigos da sabedoria , descobriremos que o essencial são as **pessoas que amamos...**”*

Augusto Cury

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, por ser uma inspiração pra mim, como ser humano e pesquisador, por despertar em mim a paixão pelo universo da patologia e me inserir no campo da iniciação científica, por ser um exemplo de responsabilidade, competência, paciência, dedicação e educação. Sou grata por todos os ensinamentos, incentivo e motivação. Seu exemplo, estímulo e auxílio foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui. Minhas palavras não são suficientes para exprimir tamanha gratidão por tê-lo como orientador, professor e amigo. Ao senhor, toda a minha admiração, carinho e gratidão!

À **Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves**, pela competência profissional, pelos ricos ensinamentos na sala de aula e pela pessoa singela, única, de brilho próprio que és. Desejo toda minha gratidão e admiração!

À **Profa. Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes**, por ter sido essa pessoa alegre, positiva, inteligente e um caminho de luz em minha vida, por despertar em mim o amor pela estomatologia em conjunto com a patologia. Desejo toda minha admiração, afeto e gratidão!

Ao **Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez**, por humildemente aceitar o convite de se fazer presente na banca, pelo empenho e dedicação na leitura deste trabalho e desde já, sou grata pelas suas valiosas contribuições, foi um enorme prazer tê-lo comigo!

A todos os professores que me acompanharam desde o Educandário Pequeno Polegar até o presente momento na Universidade Estadual da Paraíba. Sou grata por todos os ensinamentos, por participarem no meu crescimento e contribuírem para a realização desse sonho, especialmente à “Tia” **Edilene Rodrigues**, dona de um coração de ouro, **Professora Kennya Ferreira**, por toda paciência comigo, **Professor Iury Silva**, além de professor um amigo, grata pelo incentivo e motivação, **Professor Jailton Mendes**, por me fazer acreditar no meu potencial, **Prof. Dr. Alexandre Durval**, pelo dom de ensinar, **Prof. Dr. Marcelino Guedes**, pelo carinho, benevolência e todas as oportunidades de crescimento, **Prof. Dr. Amaro Lafayette**, pelo dom da paciência, **Prof. Dr. Diógenes Chaves e Profa. Dra. Denise Nóbrega**, pela humildade e carisma, **Prof. Dr. Sílvio Romero, Prof. Dr. Sérgio d’Ávila Cavalcanti, Profa. Dra. Ana Flávia Granville-Garcia, Profa. Dra. Darlene Ramos, Prof. Dr. Gustavo Godoy, Profa. Dra. Rosa Coury e Prof. Dra. Raquel Gomes.**

À minha avó, **Maria de Fátima Gonçalves de Medeiros**, por ser uma pessoa de coração enorme, que sempre me faz sorrir, e sempre cuidou tão bem de todos os que estão ao seu redor, obrigada pelo carinho e por sentir orgulho de mim.

Aos meus avós, **José Francisco do Amaral** e **Marina Júlia do Amaral** (in memoriam), que embora fisicamente ausentes, merecem esse mérito, pelo exemplo de amor, honestidade, sinceridade e humildade que representam, carinho e doação para com os filhos, netos, bisnetos e tataranetos.

À toda minha família, tios, tias, primos e primas, pelo apoio, incentivo e muito amor.

Às minhas amigas de longas datas, **Laís Maria Lima Vilar**, **Lara Tavares**, **Stella Soares**, e amigos, **Pedro Caluête** e **Bruno Rufino**, por serem anjos em minha vida.

Aos amigos, mais que irmãos, que Deus colocou em minha vida, **Mirella Daniel**, **Kamila Bezerra** e **Hivisson Fred**, obrigada por toda força, carinho, momentos de alegria e de tristeza compartilhados, vocês são essenciais pra mim.

Ao presente advindo do exterior que a odontologia me deu, **Noêmia Anes**, obrigada pela amizade sincera, carinho e companheirismo, que nossa ligação perdure, você está no meu coração.

Às minhas duplas de clínica, **Thaynná Barboza** e **Nayara Paula**, pelas experiências e crescimento acadêmicos compartilhados, pelas pessoas generosas e sensíveis que são, por todo carinho e exemplo de vida que vocês tem, tenham certeza de que vocês marcaram minha vida.

À todos os amigos de sala, pelo carinho, momentos felizes, lembranças maravilhosas, momentos de aprendizado, e ajuda na superação de obstáculos, especialmente a **Izabel Marinho**, **Malena Queiroz**, **Ana Caroline costa**, **Salomão Medeiros**, **Vinícius Belfort**, **Gideone Calixto**, **David Lourenço**, **Natália Duarte**, **Jéssica Rodrigues**, **Herdesson Pereira**, **Fabryna Magno**, **Elizabeth Lima**, **Arlinson Feitosa**, **Eline Moura**, **Heloísa Raquel**, **Andersson Paixão**, **Lorena Simplício**, **Tiago Ribeiro**, **Bianca Cabral**, **Ana Maria Freire** e **Pâmela Medeiros**. Espero nos reencontrar novamente nessa caminhada da

vida, cada um de vocês deixaram um pouquinho em mim, levaram um pouquinho de mim, meu muito obrigada por serem anjos em muitos momentos!

Aos amigos do Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB, **Hellen Bandeira, Marayza Alves, Deyse Limeira, Diego Filipe Silva, Luan Barnabé e Vínicius Rodrigues**, pela troca de experiências, conhecimento e momentos salutareos, sou grata.

A **Luana Balduino**, por todo suporte e apoio, meu muito obrigado pelo seu carinho, incentivo, amizade sincera, momentos de alegria, você é uma pessoa muito especial na minha vida, incontáveis vezes foi anjo, sempre muito prestativa, estás no meu coração, e assim manterei pra sempre, essa conquista devo a você também!

Às técnicas do Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da UEPB, **Ana Luzia Araújo Batista e Denize Núbria Souza**, por toda disponibilidade e auxílio na execução deste trabalho.

A cada paciente que tive a oportunidade de atender nas Clínicas do Departamento de Odontologia da UEPB, que compartilharam suas dores, alegrias, vivências, que contribuíram para o meu crescimento como ser humano, sou grata, esse mérito também é de vocês.

Ao **Programa Institucional de Iniciação Científica (PIBIC) UEPB/ CNPq**.

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”
Antoine de Saint-Exupéry

RESUMO

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CCE) de língua oral é uma das neoplasias malignas mais comuns da região de cabeça e pescoço. Embora tipicamente diagnosticada em indivíduos entre a quinta e sétima décadas de vida, estudos têm destacado um aumento importante no número de casos dessa neoplasia em indivíduos mais jovens, com idades abaixo de 45 anos. Diversas pesquisas têm sugerido a existência de diferenças significativas na patogênese e no comportamento biológico do CCE oral entre indivíduos jovens e idosos, mas os achados ainda são conflitantes. No contexto do desenvolvimento e progressão dos CCEs orais, estudos têm revelado um papel importante para as células T regulatórias (Treg). Por atuarem na supressão da atividade de diversas células do sistema imune, as células Treg podem contribuir para a progressão tumoral e para o comportamento biológico mais agressivo dessas neoplasias. Apesar dessas evidências, investigações a respeito da presença de células Treg em CCEs de língua oral são escassas, especialmente em indivíduos jovens. Dessa forma, este estudo se propôs a analisar, por meio de imunohistoquímica, as células Treg (FoxP3+) no microambiente tumoral de CCEs de língua oral em indivíduos jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos), e correlacionar os achados com parâmetros clinicopatológicos (sexo, tamanho/ extensão do tumor, metástase linfonodal regional e à distância, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade). A amostra foi constituída por 48 casos de CCE de língua oral, 24 deles diagnosticados em indivíduos jovens (≤ 45 anos) e 24 em indivíduos idosos (≥ 60 anos). Os dados clínicos foram obtidos a partir dos prontuários médicos dos pacientes e o grau histopatológico de malignidade das lesões foi avaliado no *front* de invasão tumoral (BRYNE et al., 1992). No estudo imunohistoquímico, foram quantificados, em 10 áreas do *front* de invasão tumoral, os linfócitos exibindo positividade nuclear para o FoxP3 e, em seguida, determinada a média de células Treg para cada caso. As comparações das medianas das células Treg de acordo com os grupos etários e demais parâmetros clinicopatológicos foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância estabelecido foi de 5% ($p < 0,05$). Linfócitos FoxP3+ foram observados em todos os CCEs de língua oral avaliados, com tendência para menor quantidade em indivíduos jovens (mediana: 31,70) quando comparados aos idosos (mediana: 53,60) ($p = 0,055$). Nos indivíduos idosos, foi constatada tendência para maior quantidade de células Treg em CCEs de menor tamanho ($p = 0,079$). A análise isolada de CCEs em indivíduos do sexo masculino e em estágios iniciais revelou maior mediana de células Treg no grupo de idosos em relação aos jovens ($p < 0,05$). Tumores com intenso infiltrado inflamatório revelaram maiores quantidades de linfócitos FoxP3+, tanto em indivíduos jovens ($p = 0,099$) quanto em idosos ($p = 0,005$). Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem uma maior participação das células Treg na modulação das respostas imunoinflamatórias no microambiente dos CCEs de língua oral em indivíduos idosos, particularmente em homens e em estágios iniciais.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas; Neoplasias; Língua; Células T regulatórias; Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

ABSTRACT

Oral tongue squamous cell carcinoma (SCC) is one of the most common malignant neoplasms of the head and neck region. Although, typically diagnosed in individuals between the fifth and seventh decades of life, studies have highlighted a significant increase in the number of cases of this neoplasm in younger individuals, aged under 45 years. Several researches have suggested the existence of significant differences in the pathogenesis and biological behavior of oral SCC among young and elderly individuals, but the findings still being conflicting. In the context of the development and progression of SCCs, studies have revealed an important role for regulatory T cells (Treg). These ones may contribute to the tumor progression and to the more aggressive biological behavior of these neoplasms because they act in the suppression of the activity of several cells of the immune system. Despite these evidences, investigations regarding the presence of Treg cells in oral SCCs are scarce, especially in young individuals. In this way, this study aimed to analyze, through immunohistochemistry, Treg cells (FoxP3 +) in the tumor microenvironment of oral SCC in younger individuals (≤ 45 years) and elderly ones (≥ 60 years) and correlate the findings with clinicopathological parameters (sex, tumor size / extent, regional and distant lymph node metastasis, clinical stage and histopathological grade of malignancy). The sample consisted of 48 cases of oral SCC, 24 of them diagnosed in young individuals (≤ 45 years) and 24 in elderly individuals (≥ 60 years). The clinical data were obtained from the patients' medical records and the histopathological grade of malignancy of the lesions was evaluated on the front of the tumor invasion (BRYNE et al., 1992). In the immunohistochemical study, the lymphocytes exhibiting nuclear positivity for FoxP3, were quantified in 10 areas of the front of the tumor invasion, and then determined the average Treg cells for each case. The comparisons of the medians of the Treg cells according to the age groups and other clinicopathological parameters were performed through the non-parametric Mann-Whitney test. The established level of significance was 5% ($p < 0.05$). FoxP3 + lymphocytes were observed in all oral tongue SCCs evaluated, with a trend to smaller amount in younger individuals (median: 31.70) when compared to the elderly ones (median: 53.60) ($p = 0.055$). In elderly individuals, a trend was observed for a larger number of Treg cells in smaller SCCs ($p = 0.079$). The isolated analysis of SCCs in males individuals and in the early stages, revealed a higher median Treg cell in the elderly group compared to the young ($p < 0.05$). Tumors with intense inflammatory infiltrate revealed greater amounts of FoxP3 + lymphocytes in both Young ($p = 0.099$) and elderly individuals ($p = 0.005$). In conclusion, the results of the present study suggest a greater participation of Treg cells in the modulation of immunoinflammatory responses in the microenvironment of oral tongue SCCs in older patients, particularly in males and in early stages.

Keywords: Carcinoma, Squamous Cell; Neoplasms; Tongue; T-Lymphocytes, Regulatory; Immunohistochemistry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- **CCE** Carcinoma de células escamosas.
- **CD4** Do inglês *cluster of differentiation 4*, traduzido como grupamento de diferenciação 4.
- **CD8** Do inglês *cluster of differentiation 8*, traduzido como grupamento de diferenciação 8.
- **CD25** Do inglês *cluster of differentiation 25*, traduzido como grupamento de diferenciação 25
- **CTLA-4** Do inglês *cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4*, traduzido como linfócito T citotóxico associado a proteína 4.
- **FoxP3** Do inglês *forkhead box P3*, refere-se ao fator de transcrição FoxP3.
- **HPV** Do inglês *human papilloma virus*, traduzido como vírus do papiloma humano.
- **IL-10** Do inglês *interleukin-10*, traduzido como interleucina 10.
- **IL-35** Do inglês *interleukin-35*, traduzido como interleucina 35.
- **MATs** Macrófagos associados a tumores.
- **M2** Macrófago tipo 2.
- **PGE2** Prostaglandina E tipo 2.
- **TGF- β** Do inglês *transforming growth factor beta*, traduzido como fator transformante de crescimento β .
- **VEGF-C** Do inglês *vascular endothelial growth factor C*, traduzido como fator de crescimento vascular endotelial-C.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | Página |
|--|---------------|
| Quadro 1. Elenco de variáveis independentes analisadas no estudo..... | 26 |
| Quadro 2. Variável dependente analisada no estudo..... | 27 |
| Quadro 3. Sistema de estadiamento clínico TNM para o CCE oral, preconizado por Sobin e Wittekind (2002)..... | 28 |
| Quadro 4. Categorias de estadiamento clínico TNM para o CCE oral, preconizado por Sobin e Wittekind (2002)..... | 29 |
| Quadro 5. Sistema de gradação histopatológica de malignidade no <i>front</i> de invasão, proposto por Bryne et al. (1992)..... | 30 |
| Quadro 6. Especificidade, nº do catálogo, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação do anticorpo primário utilizado no estudo..... | 32 |
| Figura 1. (A) Numerosos linfócitos FoxP3+ (setas) no <i>front</i> de invasão de CCE de língua oral de baixo grau de malignidade em indivíduo idoso, exibindo intenso infiltrado inflamatório (Reveal, 400×). (B) Escassos linfócitos FoxP3+ (setas) no <i>front</i> de invasão de CCE de língua oral de alto grau de malignidade em indivíduo jovem, exibindo escasso infiltrado inflamatório (Reveal, 400×)..... | 38 |
| Figura 2. Gráficos box-plot da quantidade de linfócitos FoxP3+ em CCEs de língua oral em indivíduos jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos) de acordo com o sexo dos pacientes, tamanho do tumor, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade..... | 39 |
| Figura 3. Gráficos box-plot da quantidade de linfócitos FoxP3+ em CCEs de língua oral em indivíduos jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos) de acordo com o grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e intensidade do infiltrado inflamatório..... | 40 |

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

| | Página |
|--|---------------|
| Tabela 1. Distribuição absoluta e relativa dos casos de CCE de língua oral de acordo com o grupo etário e os parâmetros clinicopatológicos..... | 35 |

SUMÁRIO

SUMÁRIO

| | Página |
|------------|--|
| 1 | INTRODUÇÃO..... 22 |
| 2 | METODOLOGIA..... 25 |
| 2.1 | Aspectos éticos..... 25 |
| 2.2 | Tipo de estudo..... 25 |
| 2.3 | População..... 25 |
| 2.4 | Amostra..... 25 |
| 2.4.1 | Critérios de inclusão..... 25 |
| 2.4.2 | Critérios de exclusão..... 26 |
| 2.5 | Variáveis..... 26 |
| 2.6 | Estudo clínico..... 28 |
| 2.7 | Estudo morfológico..... 29 |
| 2.8 | Estudo imunoistoquímico..... 30 |
| 2.8.1 | Método imunoistoquímico..... 30 |
| 2.8.2 | Análise imunoistoquímica..... 32 |
| 2.9 | Análise estatística..... 32 |
| 3 | RESULTADOS..... 35 |
| 4 | DISCUSSÃO..... 42 |
| 5 | CONCLUSÃO..... 46 |
| | REFERÊNCIAS..... 48 |
| | ANEXO..... 52 |
| | APÊNDICES..... 54 |

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas (CCE) é a neoplasia maligna mais frequente em cavidade oral, correspondendo a 200 mil novos casos por ano no mundo (TROIANO et al., 2018) e no Brasil, estimam-se 11.200 casos novos em homens e 3.500 em mulheres para cada ano do biênio (2018-2019) (INCA, 2018). Esta lesão é tipicamente diagnosticada em indivíduos do sexo masculino, entre a quinta e sétima décadas de vida, e tem o tabaco e o álcool como principais fatores de risco para seu desenvolvimento (BUNGET et al., 2013; BODNER et al., 2014; MOURA et al., 2016). Dentre os diversos sítios anatômicos em cavidade oral, a língua é acometida com maior frequência (BODNER et al., 2014).

Embora o CCE oral seja pouco comum em indivíduos abaixo dos 40 anos (FALAKI et al., 2011; KAPILA; NATARAJAN; BOAZ, 2017), estudos vêm indicando uma mudança significativa na tendência demográfica dessa lesão, com um aumento importante no número de casos em indivíduos mais jovens (18 – 45 anos) (MAJCHRZAK et al., 2014; KAPILA; NATARAJAN; BOAZ, 2017). Além disso, embora pesquisas sugiram a existência de diferenças importantes nas bases moleculares e no comportamento biológico do CCE oral entre indivíduos jovens e idosos, os achados ainda são conflitantes (BENEVENUTO et al., 2012; BODNER et al., 2014; MAJCHRZAK et al., 2014; DOS SANTOS COSTA et al., 2017). Alguns estudos têm destacado um curso clínico mais agressivo do CCE oral em indivíduos mais jovens, ao passo que outras investigações não observaram diferenças significativas relacionadas à idade no comportamento biológico dessas neoplasias (ADDURI et al., 2014; BODNER et al., 2014; MAJCHRZAK et al., 2014; KAPILA; NATARAJAN; BOAZ, 2017).

Interações entre células neoplásicas e células do sistema imune, presentes no microambiente tumoral, são capazes de modular a progressão e o desenvolvimento do tumor (SIMONSON; ALLISON, 2011). Neste contexto, por meio de moléculas como o fator transformante de crescimento β (TGF- β), as células neoplásicas podem recrutar diferentes tipos celulares capazes de suprimir a resposta imune no microambiente tumoral, com destaque para as células supressoras derivadas de células mieloides, macrófagos associados a tumores (MATs) com perfil M2 e células T regulatórias (Treg) (DURAY et al., 2010; SIMONSON; ALLISON, 2011). Estas últimas são derivadas da linhagem de linfócitos que expressam constitutivamente CD4, CD25 e o fator de transcrição nuclear *forkhead box P3* (FoxP3). Estudos têm destacado que o FoxP3 é necessário para a diferenciação dos linfócitos T em células Treg, bem como para a ativação de suas funções, além de ser um dos melhores

marcadores para identificação desse tipo celular (SIMONSON; ALLINSON, 2011; HANAKAWA et al., 2014).

As células Treg podem suprimir a ação de diversas células do sistema imune, como linfócitos B, células *Natural Killer*, linfócitos T CD4 e T CD8, monócitos e células dendríticas (GAUR et al., 2012; SCHMIDT; OBERLE; KRAMMER, 2012). Tais ações são desempenhadas por diversos mecanismos, os quais envolvem a liberação de citocinas inibitórias, citólise, modulação da função celular apresentadora de antígeno (por meio da molécula CTLA-4) e interrupção metabólica (SCHMIDT; OBERLE; KRAMMER, 2012). Embora as células Treg possivelmente utilizem vários desses mecanismos simultaneamente, a síntese e secreção de moléculas inibitórias, como TGF- β , prostaglandina E2 (PGE2), interleucina-10 (IL-10) e IL-35, tem sido considerada um dos principais mecanismos de supressão utilizados por esses tipos celulares (WORKMAN et al., 2009; SCHMIDT; OBERLE; KRAMMER, 2012; GAUR et al., 2012).

Em decorrência de suas atividades imunossupressoras, estudos têm destacado uma relação entre a grande quantidade de células Treg no microambiente de neoplasias malignas e um pior prognóstico (SIMONSON; ALLINSON, 2011; HANAKAWA, et al., 2014; AGGARWAL; SHARMA; DAS, 2017). Em CCEs de cavidade oral, um maior número de células Treg no microambiente tumoral tem sido associado com a presença de metástase linfonodal regional, estadiamento clínico avançado, baixa sobrevida global e sobrevida livre de doença, além de resultados desfavoráveis à imunoterapia (GAUR et al., 2012; AGGARWAL; SHARMA; DAS, 2017). Em contrapartida, outras investigações sugerem uma associação entre o alto número de células Treg e um melhor prognóstico em CCEs de cavidade oral, bem como ao melhor controle locorregional em carcinoma de cabeça e pescoço (LIM et al., 2014; WOLF et al., 2015). Apesar desses importantes achados, até o momento, pouco se sabe sobre a presença de células Treg no microambiente de CCEs de língua oral em indivíduos jovens.

Portanto, o objetivo deste estudo foi analisar por meio da imunoistoquímica, as células Treg (FoxP3+) no microambiente tumoral de CCEs de língua oral em indivíduos jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos), e correlacionar os achados com parâmetros clinicopatológicos (sexo, tamanho/ extensão do tumor, metástase linfonodal regional e a distância, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade). Com esta pesquisa, pretendeu-se contribuir com mais esclarecimentos a respeito das diferenças descritas na literatura sobre o comportamento biológico dessas neoplasias malignas nesses grupos etários.

METODOLOGIA

2 METODOLOGIA

2.1 ASPECTOS ÉTICOS

A presente pesquisa foi cadastrada na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil), de acordo com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, e submetida à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB). Conforme parecer nº 39076214.4.0000.5187 (ANEXO A), seu protocolo foi aprovado.

2.2 TIPO DE ESTUDO

O estudo desenvolvido consistiu em uma pesquisa transversal, observacional e analítica, caracterizada pela avaliação quantitativa das células Treg, por meio da imunistoquímica, em CCEs de língua oral em indivíduos jovens e idosos. Foram estabelecidas, adicionalmente, relações com parâmetros clinicopatológicos (sexo dos pacientes, tamanho/ extensão do tumor, metástase em linfonodos regionais, metástase à distância, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade) das lesões.

2.3 POPULAÇÃO

A população objeto do presente estudo foi constituída por todos os casos de CCEs de língua oral diagnosticados e arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB, no período de 2002 a 2016.

2.4 AMOSTRA

Por meio de técnica de amostragem do tipo não probabilística, por conveniência, foram selecionados 48 casos de CCE de língua oral, 24 deles diagnosticados em indivíduos jovens (≤ 45 anos) e 24 em indivíduos idosos (≥ 60 anos), todos emblocados em parafina.

2.4.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra, apenas os casos de CCEs de língua oral provenientes de ressecção cirúrgica, os quais possibilitaram a avaliação do *front* de invasão tumoral. Além disso, só foram incluídos no estudo os casos cujos prontuários continham informações relativas ao sexo e idade dos pacientes, bem como à localização anatômica da lesão, tamanho 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.

| VARIAVEL | DEFINIÇÃO | CATEGORIA |
|--------------------------|---|--|
| Idade | Idade do paciente (em anos) | Jovem (≤ 45 anos) Idoso (≥ 60 anos) |
| Tamanho do tumor | Tamanho/ extensão do tumor primário | T1 T2 T3 T4 |
| Metástase nodal regional | Metástase em linfonodos regionais | N0 N1 N2 N3 |
| Metástase à distância | Presença de tumor secundário à distância do tumor primário | M0 M1 |
| Estágio clínico | Classificação da lesão considerando o tamanho do tumor (T), a metástase | Estágio I Estágio II |

| | | |
|-------------------------------------|--|--|
| | regional (N) e a metástase à distância (M) | Estágio III Estágio IV |
| Grau histopatológico de malignidade | Classificação histopatológica do tumor considerando o grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório | Baixo grau de malignidade Alto grau de malignidade |
| Grau de ceratinização | Grau de ceratinização das células tumorais | Alto Moderado Baixo Ausente |
| Pleomorfismo nuclear | Grau de pleomorfismo nuclear das células tumorais | Pouco Moderado Intenso Extremo |
| Padrão de invasão | Padrão de invasão das células tumorais | Bordas bem delimitadas Cordões, bandas e/ ou trabéculas infiltrativas Pequenos grupos / cordões de células infiltrativas (n>15) Infiltração em pequenos grupos celulares e/ ou células individuais (n<15) |
| Infiltrado inflamatório | Intensidade do infiltrado inflamatório | Intenso Moderado Escasso Ausente |

Quadro 2. Variável dependente analisada no estudo.

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

2.6 ESTUDO CLÍNICO

A partir de prontuários médicos, foram obtidas informações relativas ao sexo e idade dos pacientes, bem como sobre a localização anatômica das lesões. Com base nos parâmetros descritos na sexta edição da Classificação TNM dos Tumores Malignos (SOBIN; WITTEKIND, 2002), apresentados nos Quadros 3 e 4, foram coletadas informações sobre o tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástase à distância e estágio clínico. Os dados coletados foram transcritos para 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) | |
|--|---|
| TX | O tumor primário não pode ser avaliado |
| T0 | Não há evidência de tumor primário |
| Tis | Carcinoma in situ |
| T1 | Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão |
| T2 | Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão |
| T3 | Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão |
| T4a | Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/ extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face |
| T4b | Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigoides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna |
| ENVOLVIMENTO DE LINFONODO REGIONAL (N) | |
| NX | Os linfonodos regionais não podem ser avaliados |
| N0 | Ausência de metástase em linfonodos regionais |
| N1 | Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão |
| N2 | N2a – Metástase em um único linfonodo homolateral com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão N2b – Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão N2c – Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão |
| N3 | Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão |
| ENVOLVIMENTO POR METÁSTASES DISTANTES (M) | |

| | |
|-----------|---|
| MX | A presença de metástase à distância não pode ser avaliada |
| M0 | Ausência de metástase à distância |
| M1 | Metástase à distância |

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

| ESTÁGIO | CLASSIFICAÇÃO TNM |
|----------------|---------------------------------------|
| 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. Sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), dois examinadores previamente calibrados realizaram a análise morfológica das lesões.

A análise do grau histopatológico de malignidade dos CCEs foi realizada no *front* de invasão tumoral, de acordo com o sistema proposto por Bryne et al. (1992) (QUADRO 5). Os escores obtidos em cada um dos parâmetros foram somados, obtendo-se o escore final de malignidade do caso. As lesões com escore final menor ou igual a oito foram classificadas como de baixo grau de malignidade. Por sua vez, os tumores com escore final igual ou superior a nove foram classificados como de alto grau de malignidade (SILVEIRA et al., 2007). Os dados obtidos foram transcritos para uma ficha específica (APÊNDICE B).

Quadro 5. Sistema de gradação histopatológica de malignidade no *front* de invasão, proposto por Bryne et al. (1992).

| Aspectos morfológicos | Escores de malignidade | | | |
|--------------------------------|--------------------------------------|--|--|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Grau de Ceratinização | Alto (> 50% das células) | Moderado (20-50% das células) | Baixo (>5<20% das células) | Ausente (0-5% das células) |
| Pleomorfismo Nuclear | Pouco (>75% de células maduras) | Moderado (50 a 75% de células maduras) | Intenso (>25< 50% de células maduras) | Extremo (0 a 25% de células maduras) |
| Padrão de Invasão | Bordas Infiltrativas bem delimitadas | Cordões, bandas e/ ou trabéculas sólidas infiltrativas | Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (n>15) | Infiltração difusa e pronunciada, em pequenos grupos celulares e/ ou células individuais (n<15) |
| Infiltrado Inflamatório | Intenso | Moderado | Escasso | Ausente |

2.8 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

2.8.1 Método imunoistoquímico

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 preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropiltriétoxisilano, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Em seguida, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (*RevealTM*, Spring Bioscience Corp., Pleasanton, CA, USA), utilizando anticorpo primário monoclonal anti-FoxP3. Cortes histológicos de tonsila foram empregados como controle positivo. 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 6);
- 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 resina *Permount*® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

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

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

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. Ressalta-se que a análise imunoistoquímica foi realizada sem que os examinadores tivessem conhecimento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos.

A análise das células Treg (FoxP3+) foi realizada de forma quantitativa, adaptando-se a metodologia utilizada por Schwarz et al. (2008). Sob aumento de 100×, foram selecionadas dez áreas de maior imunorreatividade ao anticorpo anti-FoxP3 no *front* de invasão tumoral. Em sequência, sob aumento de 400×, cada uma dessas áreas foi fotomicrografada (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. Por meio do programa ImageJ® (Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Mental Health, Bethesda, MD, USA), em cada um dos campos fotomicrografados, foi realizada a contagem dos linfócitos exibindo imunomarcção nuclear para FoxP3, independente da intensidade da coloração acastanhada. O número total de linfócitos FoxP3+ foi estabelecido por meio da soma dos valores obtidos em cada um desses campos. Com esse último dado, foi calculada a média de células Treg para cada caso. Os dados obtidos foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE C).

2.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com as análises clínicas, morfológicas e imunoistoquímicas

foram submetidos à análise estatística com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA). Estatística descritiva foi utilizada para caracterização da amostra. Os dados obtidos com a contagem dos linfócitos FoxP3+ foram submetidos à análise de distribuição, por meio do teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Assim, as comparações das medianas das células Treg de acordo com os grupos (jovens x idosos) e os demais parâmetros clinicopatológicos foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

3 RESULTADOS

3.1 ANÁLISES CLÍNICAS E MORFOLÓGICAS

Na presente amostra, foi observada uma maior frequência de casos de CCE de língua oral em indivíduos do sexo masculino, tanto para o grupo de jovens (n = 15; 62,5%) como para o de idosos (n = 13; 54,2%). Em relação ao tamanho do tumor, foi constatada maior frequência de casos classificados como T1 (n = 10; 41,7%) em indivíduos jovens e como T2 (n = 13; 54,2%) em indivíduos idosos. Ausência de metástase linfonodal regional foi observada com maior frequência no grupo de indivíduos idosos (n = 21; 87,5%). Por sua vez, foi constatado um marcante predomínio de casos sem metástase à distância, tanto para o grupo de jovens (n = 23; 95,8%) como para o grupo de idosos (n = 23; 95,8%). A análise do estadiamento clínico revelou maior frequência de casos no estágio II, no grupo de idosos (n = 11; 45,8%), e nos estágios I (n = 8; 33,3%) e IV (n = 8; 33,3%), no grupo de jovens. Em relação ao grau histopatológico de malignidade, foi observado um predomínio de lesões de alto grau, tanto em indivíduos jovens (n = 18; 75,0%) como em indivíduos idosos (n = 17; 70,8%) (TABELA 1).

Tabela 1. Distribuição absoluta e relativa dos casos de CCE de língua oral de acordo com o grupo etário e os parâmetros clinicopatológicos.

| Parâmetros clinicopatológicos | Indivíduos jovens | Indivíduos idosos |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|
| | n (%) | n (%) |
| <i>Sexo</i> | | |
| Masculino | 15 (62,5) | 13 (54,2) |
| Feminino | 9 (37,5) | 11 (45,8) |
| <i>Tamanho do tumor</i> | | |
| T1 | 10 (41,7) | 10 (41,7) |
| T2 | 6 (25,0) | 13 (54,2) |
| T3 | 3 (12,5) | 1 (4,2) |
| T4 | 5 (20,8) | 0 (0,0) |
| <i>Metástase nodal regional</i> | | |
| N0 | 13 (54,2) | 21 (87,5) |
| N1 | 5 (20,8) | 2 (8,3) |
| N2 | 2 (8,3) | 1 (4,2) |
| N3 | 4 (16,7) | 0 (0,0) |
| <i>Metástase à distância</i> | | |
| M0 | 23 (95,8) | 23 (95,8) |

| | | |
|--|-----------|-----------|
| M1 | 1 (4,2) | 1 (4,2) |
| <i>Estágio clínico</i> | | |
| Estágio I | 8 (33,3) | 10 (41,7) |
| Estágio II | 4 (16,7) | 11 (45,8) |
| Estágio III | 4 (16,7) | 2 (8,3) |
| Estágio IV | 8 (33,3) | 1 (4,2) |
| <i>Grau histopatológico de malignidade</i> | | |
| Baixo grau | 6 (25,0) | 7 (29,2) |
| Alto grau | 18 (75,0) | 17 (70,8) |

3.2 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Linfócitos FoxP3+ foram observados no *front* de invasão em todos os CCEs de língua oral avaliados (FIGURAS 1A e 1B), com tendência para menor quantidade em indivíduos jovens (mediana: 31,70; variação: 4,90 – 75,20) quando comparados aos idosos (mediana 53,60; variação: 14,90 – 97,10) ($p = 0,055$). Em relação ao sexo dos pacientes, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas na quantidade de linfócitos FoxP3+ nos CCEs de língua oral, tanto para o grupo de jovens como para o de idosos ($p > 0,05$; Figura 2A). Por outro lado, quando comparados os tumores de indivíduos do sexo masculino, pôde-se constatar maior mediana de linfócitos FoxP3+ no grupo de idosos em relação aos jovens ($p = 0,020$; Figura 2A).

A análise dos linfócitos FoxP3+ em relação ao tamanho dos tumores evidenciou quantidades relativamente semelhantes entre lesões T1 e T2 – T4 em indivíduos jovens ($p > 0,05$; Figura 2B). No grupo dos indivíduos idosos, foi observada tendência de maior quantidade de células Treg em lesões classificadas como T1 quando comparadas a lesões T2 – T4, mas sem diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$; Figura 2B). Quando comparadas apenas as lesões classificadas como T1, pôde-se constatar uma tendência para maior quantidade de linfócitos FoxP3+ no grupo de idosos em relação aos jovens ($p = 0,059$; Figura 2B).

Em relação à metástase linfonodal regional, o teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou ausência de diferença estatisticamente significativa na quantidade de linfócitos FoxP3+ no grupo de indivíduos jovens ($p = 0,505$). Para o grupo de indivíduos idosos, possíveis diferenças na quantidade de células Treg em relação a este parâmetro clínico não foram avaliadas em decorrência do pequeno número de casos com metástase linfonodal regional. De forma similar, o reduzido número de casos com metástase à distância, tanto no

grupo de jovens como no de idosos, impossibilitou a realização de comparações nas quantidades de células Treg em relação a este parâmetro clínico.

A análise dos linfócitos FoxP3+ em relação ao estadiamento clínico, no grupo de indivíduos jovens, revelou discreta tendência para menor quantidade destes tipos celulares em lesões em estágio I, quando comparadas às lesões em estágios II – IV ($p = 0,178$; Figura 2C). Por outro lado, no grupo dos indivíduos idosos, foi observada tendência para maior quantidade de células Treg em lesões em estágio I, quando comparadas às lesões em estágios II – IV, mas sem diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,079$; Figura 2C). Quando comparadas apenas as lesões em estágio I, pôde-se constatar uma maior quantidade de linfócitos FoxP3+ no grupo de idosos em relação aos jovens ($p = 0,010$; Figura 2C).

Considerando o grau histopatológico de malignidade, o teste não paramétrico de Mann-Whitney revelou ausência de diferença estatisticamente significativa na quantidade de linfócitos FoxP3+ entre CCEs de baixo e alto grau de malignidade, tanto para indivíduos jovens como para idosos ($p > 0,05$; Figura 2D). Considerando os parâmetros individuais do sistema de gradação, foi constatada ausência de diferença estatisticamente significativa na quantidade de células Treg em relação ao grau de ceratinização e ao pleomorfismo nuclear, tanto no grupo de indivíduos jovens como no de idosos ($p > 0,05$; Figuras 3A e 3B).

Ao avaliar o padrão de invasão, CCEs exibindo arranjos em pequenos grupos celulares ou exibindo infiltração difusa revelaram maiores quantidades de linfócitos FoxP3+ quando comparados aos tumores com bordas infiltrativas bem definidas ou arranjos em cordões, bandas ou lesões sólidas, tanto para o grupo de indivíduos idosos como para o de jovens, com tendência à significância estatística neste último ($p = 0,052$; Figura 3C). Foram observadas maiores medianas de linfócitos FoxP3+ em CCEs com intenso infiltrado inflamatório, tanto no grupo de indivíduos jovens como no de idosos, com diferença estatisticamente significativa neste último ($p = 0,005$; Figura 3D). Adicionalmente, considerando apenas as lesões com intenso infiltrado inflamatório, CCEs de indivíduos idosos revelaram maior quantidade de células Treg em relação aos CCEs de indivíduos jovens ($p = 0,034$; Figura 3D).

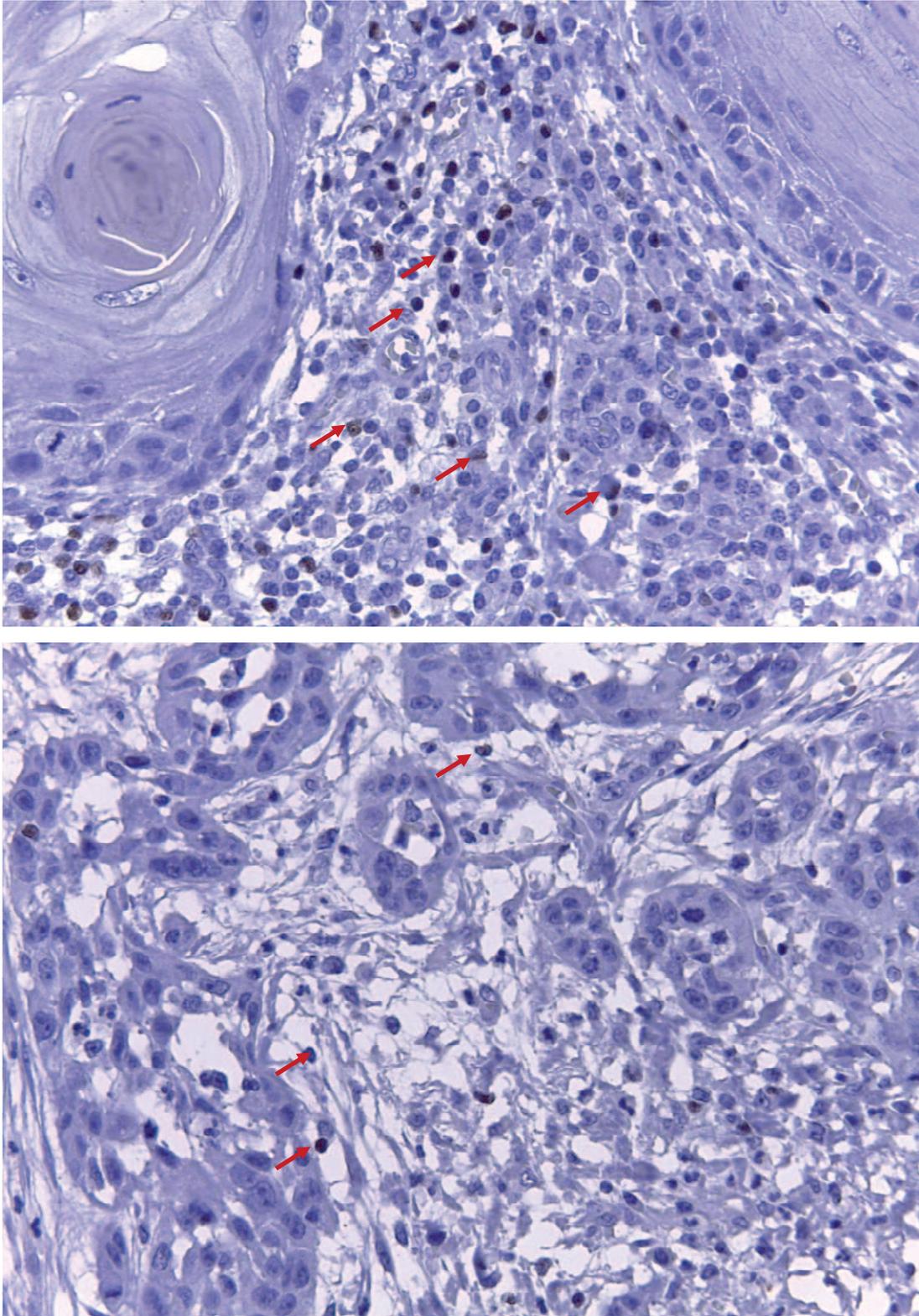


Figura 1. (A) Numerosos linfócitos FoxP3+ (setas) no *front* de invasão de CCE de língua oral de baixo grau de malignidade em indivíduo idoso, exibindo intenso infiltrado inflamatório (Reveal, 400×). (B) Escassos linfócitos FoxP3+ (setas) no *front* de invasão de CCE de língua oral de alto grau de malignidade em indivíduo jovem, exibindo escasso infiltrado inflamatório (Reveal, 400×).

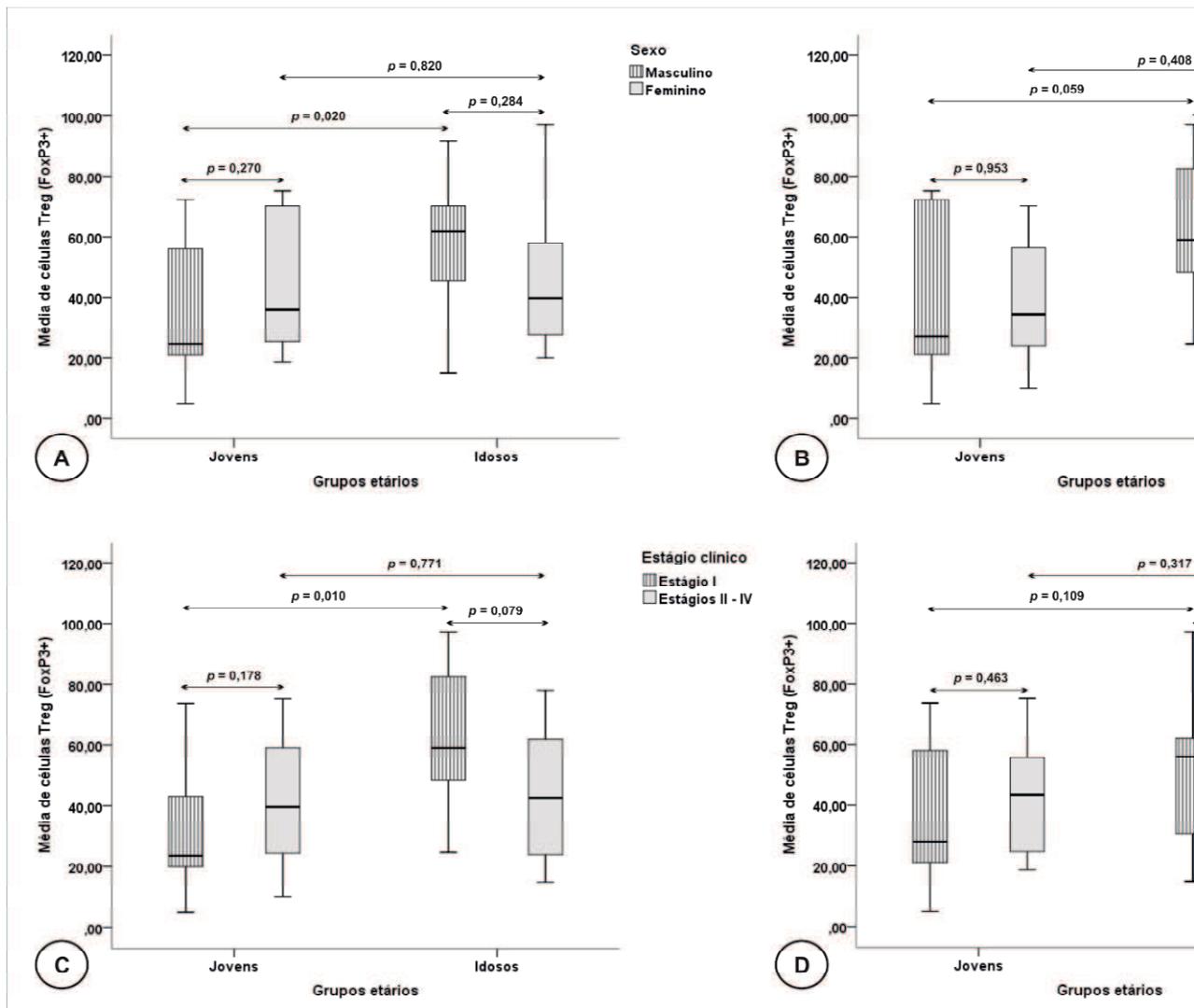


Figura 2. Gráficos box-plot da quantidade de linfócitos FoxP3+ em CCEs de língua oral em indivíduos jovens (≤ 40 anos) e idosos (> 40 anos), considerando o sexo dos pacientes, tamanho do tumor, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade.

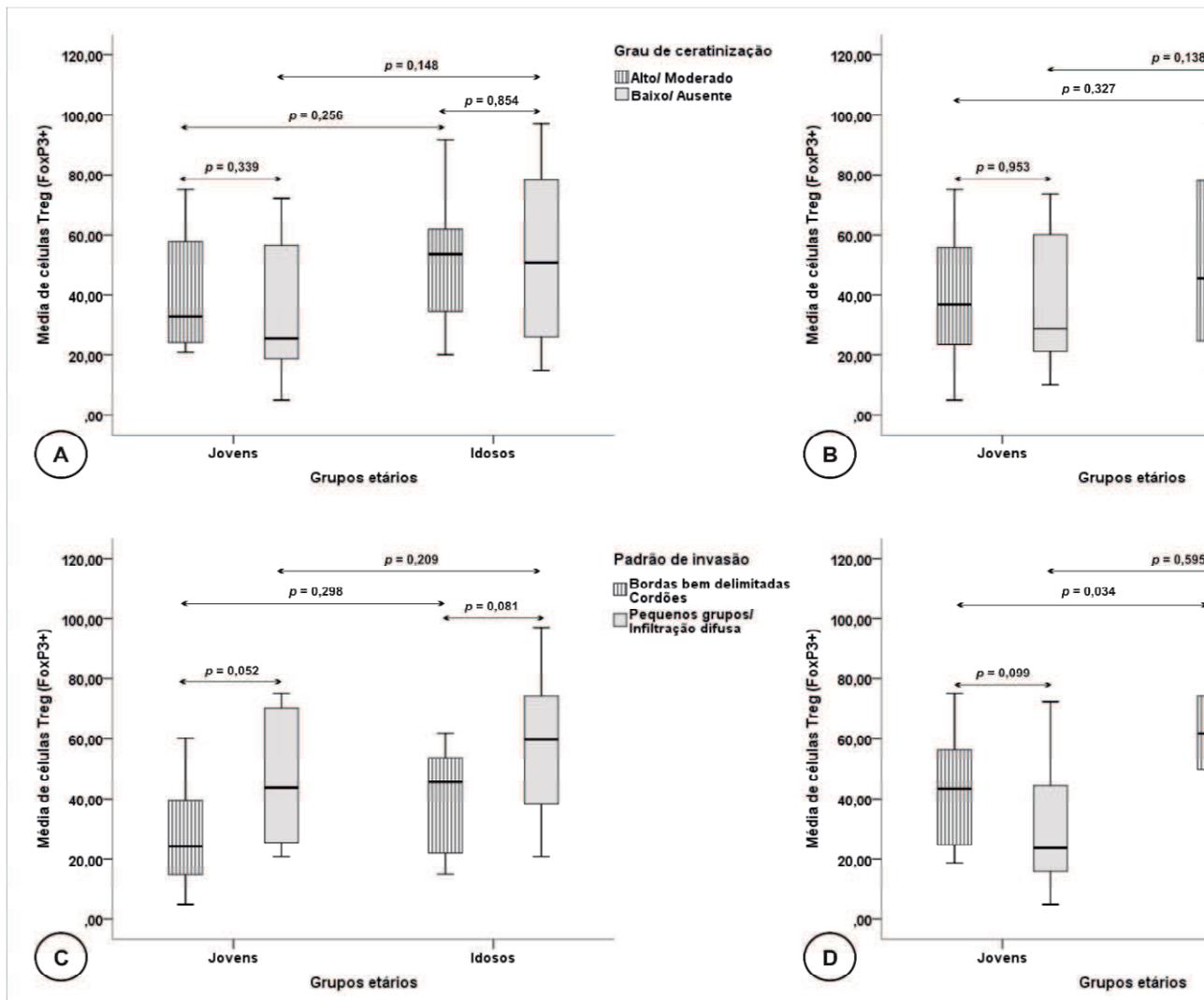


Figura 3. Gráficos box-plot da quantidade de linfócitos FoxP3+ em CCEs de língua oral em indivíduos jovens (≤ 40 anos) e idosos (> 40 anos), considerando o grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e intensidade da infiltração de linfócitos Treg.

DISCUSSÃO

4 DISCUSSÃO

O CCE de língua oral é uma lesão tipicamente diagnosticada em indivíduos do sexo masculino (DOS SANTOS COSTA et al., 2017), entre a quinta e sétima década de vida (BUNGET et al., 2013; BODNER et al., 2014; MOURA et al., 2016; CARIATI et al., 2017). Apesar disso, estudos recentes vêm indicando um aumento importante na incidência desta neoplasia maligna em indivíduos mais jovens, com idades abaixo dos 45 anos (MAJCHRZAK et al., 2014; KAPILA; NATARAJAN; BOAZ, 2017). As razões para esse aumento na incidência de CCE oral em indivíduos jovens ainda são discutíveis, mas estudos sugerem uma possível associação com infecção por papilomavírus humano (HPV) de alto risco oncogênico (MESQUITA et al., 2016). No Brasil, pesquisas têm revelado que de 3,3% a 12% dos pacientes diagnosticados com CCE oral têm idade inferior a 45 anos (RIBEIRO et al., 2009; SANTOS et al., 2016; LEITE et al., 2018).

Aliado ao aumento significativo no número de casos de CCE oral em indivíduos jovens, a existência de diferenças nas bases moleculares e no comportamento biológico dessa lesão entre indivíduos jovens e idosos tem se apresentado como objeto de intensa discussão na literatura, com achados ainda conflitantes (BODNER et al., 2014; MAJCHRZAK et al., 2014; DOS SANTOS COSTA et al., 2017). Neste sentido, alguns estudos têm sugerido um curso clínico mais agressivo do CCE oral em indivíduos mais jovens (ADDURI et al., 2014; KAPILA; NATARAJAN; BOAZ, 2017). Em contrapartida, outras pesquisas não constataram diferenças significativas no comportamento biológico do CCE oral relacionadas à idade dos pacientes (FONSECA, et al., 2014; DOS SANTOS COSTA et al., 2017).

De acordo Popovtzer et al. (2004), o CCE de língua oral em pacientes abaixo dos 45 anos pode apresentar dois padrões de comportamento biológico distintos. Em um grupo, estas lesões exibem um curso bastante agressivo, com índices de mortalidade em dois anos que podem alcançar 40%. Em outro extremo, essa neoplasia apresenta um curso relativamente indolente, com os pacientes livres de doença por mais de quinze anos (POPOVTZER et al., 2004). No estudo realizado por Frare et al. (2016), foram observadas maiores taxas de recidiva local e metástase regional, além de menores índices de sobrevida livre de doença em cinco anos, nos pacientes jovens com CCE oral. Pesquisas desenvolvidas no Brasil têm demonstrado que mais de 60% dos casos de CCE oral em indivíduos jovens são diagnosticados em estágios clínicos avançados (III e IV) (BENEVENUTO et al., 2012; SANTOS et al., 2016). Embora tais achados possam refletir um comportamento biológico mais agressivo dessa lesão em pacientes jovens, deve-se ponderar a possibilidade de que

sejam resultado do diagnóstico tardio do CCE oral nestes indivíduos, como é observado em pacientes idosos (SANTOS et al., 2016).

No intuito de contribuir para o entendimento das diferenças, descritas na literatura, nas bases moleculares e no comportamento biológico dos CCEs de língua oral entre indivíduos jovens e idosos, diversos estudos têm sido realizados, com resultados contraditórios. Neste contexto, análises do índice de proliferação celular, do índice angiogênico e da densidade linfática nos CCEs de língua oral não demonstraram diferenças significativas entre indivíduos jovens e idosos (BENEVENUTO et al., 2012; MOURA et al., 2016). Por outro lado, quando avaliada a expressão do fator de crescimento vascular endotelial-C (VEGF-C), Moura et al. (2016) constaram maior imunorreatividade deste indutor de crescimento de vasos linfáticos nas células neoplásicas do CCE oral em pacientes jovens.

No microambiente tumoral, interações entre células neoplásicas e células do sistema imune podem modular diversos processos, com destaque para a progressão tumoral (SIMONSON; ALLISON, 2011). Dentre os vários tipos celulares presentes no microambiente dos CCEs orais, destacam-se as células Treg. Essas células podem suprimir a ação de várias outras do sistema imune, como linfócitos B, células *Natural Killer*, linfócitos T CD4 e T CD8, monócitos e células dendríticas (SCHMIDT; OBERLE; KRAMMER, 2012; GAUR et al., 2012).

No presente estudo, houve uma discreta tendência para menor quantidade de linfócitos FoxP3⁺ no estágio I em comparação ao estágio II-IV, no grupo dos jovens, e uma tendência para maior quantidade desses tipos celulares no estágio I quando comparadas ao estágio II-IV, no grupo dos idosos. Constatou-se então, uma maior quantidade de linfócitos FoxP3⁺ no grupo de idosos em relação aos jovens, quando comparadas as lesões no estágio I. Com isso, é possível sugerir, que estas não sejam as principais células responsáveis pela supressão da resposta imune no microambiente tumoral dos CCEs orais em indivíduos jovens, ao contrário do observado nos idosos. Percebeu-se, também, que a medida que a doença progride nos indivíduos idosos, há uma tendência a diminuição destas células nos parâmetros clinicopatológicos nesse grupo.

Na pesquisa ora realizada, foi constatada uma tendência a uma maior quantidade de linfócitos FoxP3⁺ em lesões de menor tamanho (T1), no sexo masculino e em estágios iniciais, no grupo dos idosos, em comparação com os jovens. Em concordância com estes achados, Lim et al. (2014) evidenciaram uma maior quantidade de células Treg em lesões de menor tamanho. Além disso, Wolf et al. (2015) evidenciaram também um maior número de células Treg em CCEs de cavidade oral em estágios iniciais. Em contrapartida, Gaur et al.

(2012) constataram uma maior quantidade de células Treg em CCEs orais em estágios clínicos avançados e, somado a isto, Aggarwal, Sharma e Das (2017) constataram esse achado em tumores de maiores tamanhos.

Com relação ao grau histopatológico de malignidade, no presente estudo, foi observada maior frequência de lesões de alto grau, tanto no grupo de indivíduos jovens como no de idosos. Congruentemente, Bachar et al. (2011) e Frare et al. (2016) não observaram diferenças significativas no grau histológico de malignidade do CCE de língua entre pacientes jovens e idosos. Por outro lado, Kaminagakura et al. (2011) identificaram uma frequência maior de tumores pobremente diferenciados em pacientes jovens quando comparados com os idosos.

Nesta pesquisa, foram observadas maiores quantidades de linfócitos FoxP3+ em CCEs de língua oral com intenso infiltrado inflamatório, tanto no grupo de indivíduos jovens como no de idosos, com diferença estatisticamente significativa neste último ($p = 0,005$). Corroborando este achado, no estudo de Al-Qahtani, Anil e Rajendran (2011), foi registrado um pico de células FoxP3+ nos casos de CCE de cavidade oral que demonstravam um intenso infiltrado inflamatório ($p < 0.01$).

CONCLUSÃO

5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo sugerem uma maior participação das células Treg na modulação das respostas imunoinflamatórias no microambiente dos CCEs de língua oral em indivíduos idosos, particularmente em homens e em estágios iniciais. Neste contexto, os achados desta pesquisa ressaltam um provável potencial das células Treg como alvos para estratégias imunoterapêuticas nos CCEs de língua oral em indivíduos idosos e destacam, ainda, a necessidade de investigações futuras para avaliar a presença de outros tipos celulares com funções imunossupressoras no microambiente dos CCEs de língua oral em indivíduos jovens.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ADDURI, R. S. R. et al. P53 nuclear stabilization is associated with FHIT loss and younger age of onset in squamous cell carcinoma of oral tongue. **BMC Clin. Pathol.**, v.14, n. 37, p. 1-8, 2014.
- AGGARWAL, S.; SHARMA, S.C.; N. DAS, S. Dynamics of regulatory T cells (Tregs) in patients with oral squamous cell carcinoma. **J. Surg. Oncol.**, v. 116, n. 8, p. 1103-1113, 2017.
- AL- QAHTANI, D.; ANIL, S.; RAJENDRAN, R. Tumour infiltrating CD25+ Foxp3+ regulatory T cells (Tregs) relate to tumour grade and stromal inflammation in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 40, n. 8, p. 636-42, 2011.
- BACHAR, G. et al. Outcome of oral tongue squamous cell carcinoma in patients with and without known risk factors. **Oral Oncol.**, v. 47, n. 1, p. 45-50, 2011.
- BENEVENUTO, T. G. et al. Immunohistochemical comparative analysis of cell proliferation and angiogenic index in squamous cell carcinomas of the tongue between young and older patients. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v. 20, n. 3, p. 291-297, 2012.
- BODNER, L. et al. Oral squamous cell carcinoma in patients twenty years of age or younger – review and analysis of 186 reported cases. **Oral Oncol.**, v. 50, n. 2, p. 84-89, 2014.
- BUNGET, A. et al. Microscopic aspects of angiogenesis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Rom. J. Morphol. Embryol.**, v. 54, n. 3, p. 623-627, 2013.
- CARIATI, P. et al. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a retrospective study in Granada University Hospital. **Med. Oral Patol. Med. Cir. Bucal.**, v. 22, n.6, p. e679-e685, 2017.
- DOS SANTOS COSTA, S. F. et al. Molecular basis of oral squamous cell carcinoma in young patients: is it any different from older patients?. **J. Oral Pathol. Med.**, 2017. [epub ahead of print]
- DURAY, A. et al. Immune suppression in head and neck cancers: a review. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2010, p. 1-15, 2010.

FALAKI, F. et al. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: a retrospective study and review of literatures. **Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.**, v. 16, n. 4, p. e473-e477, 2011.

FONSECA, F. P. et al. Stromal myofibroblasts in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients - a multicenter collaborative study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radio.** v. 118, n. 4, p. 483-9, 2014.

FRARE, J. C. et al. Histopathological grading systems analysis of oral squamous cell carcinomas of young patients. **Med. Oral Patol. Med. Cir. Bucal**, v. 21, n. 3, p. e285-98, 2016.

GAUR, P. et al. Skewed immunological balance between Th17 (CD4+ IL17A+) and Treg (CD4+ CD25+ FOXP3+) cells in human oral squamous cell carcinoma. **Cell Oncol.**, v. 35, n. 5, p. 335-343, 2012.

HANAKAWA, H. et al. Regulatory T-cell infiltration in tongue squamous cell carcinoma. **Acta Otolaryngol.**, v. 134, n. 8, p. 859-864, 2014.

KAMINAGAKURA, E. et al. CCND1 amplification and protein overexpression in oral squamous cell carcinoma of young patients. **Head Neck**, v. 33, n.10, p. 1413-9, 2011.

KAPILA, S.N.; NATARAJAN, S.; BOAZ, K. A comparison of clinicopathological differences in oral squamous cell carcinoma in patients below and above 40 years of age. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 11, n. 9, p. ZC46-ZC50, 2017.

LEITE, A. A. et al. Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathological study on 194 cases in northeastern Brazil. A cross-sectional retrospective study. **São Paulo Med. J.**, v. 136, n. 2, p. 165-169, 2018.

LIM, K. P. et al. CD4+ CD25hi CD127low regulatory t cells are increased in oral squamous cell carcinoma patients. **Plos One**, v. 9, n. 8, p. e103975, 2014.

MAJCHRZAK, E. et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. **Radiol. Oncol.**, v. 48, n. 1, p. 1-10, 2014.

MOURA, J. et al. Immunohistochemical comparative analysis of lymphatic vessel density and VEGF-C expression in squamous cell carcinomas of the tongue between young and old patients. **Pathol. Res. Pract.**, v. 212, n. 12, p. 1095-1101, 2016.

POPOVTZER, A. et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young patients. **Laryngoscope**, v. 114, n. 5, p. 915-7, 2004.

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

SCHMIDT, A.; OBERLE, N.; KRAMMER, P. H. Molecular mechanisms of Treg-mediated T cell suppression. **Front. Immunol.**, v. 3, n. 51, p. 1-20, 2012.

SIMONSON, W. T. N. ; ALLINSON, K. H. Tumour-infiltrating lymphocytes in cancer: implications for the diagnostic pathologist. **Diag. Histopathol.**, v. 17, n. 2, p. 80-90, 2011.

TROIANO, G. et al. Predictive prognostic value of tissue-based micro RNA expression in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **J. Dent. Res.**, 2018. [epub ahead of print]

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

WOLF, G. T. et al. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: a preliminary study. **Oral Oncol.**, v. 51, n. 1, p. 90-95, 2015.

WORKMAN, C. J. et al. The development and function of regulatory T cells. **Cell. Mol. L Sci.**, v. 66, n. 16, p. 2603-2622, 2009.

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/
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA/
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DO RELATOR

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

Número do Protocolo: 39076214.4.0000.5187

Data da 1ª relatoria PARECER DO AVALIADOR: 26/11/2014

Pesquisador Responsável: Cassiano Francisco Weege Nonaka.

Situação do parecer: **Aprovado**

Apresentação do Projeto: O projeto é intitulado: RESPOSTA IMUNE EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA EM PACIENTES JOVENS E IDOSOS, encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba para Análise e parecer com fins de elaboração de trabalho de pesquisa junto ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba., com a participação dos alunos: Fernando Antonio Portela da Cunha Filho (Aluno do Curso de Mestrado do PPgO – UEPB); Hellen Bandeira de Pontes Santos (Aluna do Curso de Mestrado do PPgO – UEPB); Diego Filipe Bezerra Silva (Aluno de Iniciação Científica PIBIC – UEPB); Vinicius Rodrigues da Silva (Aluno de Iniciação Científica PIBIC – UEPB).

Objetivo da Pesquisa: Tem como **Objetivo Geral:** avaliar, por meio de imunistoquímica, a presença das subpopulações M1 e M2 de MATs em CCEs de língua em pacientes jovens e idosos, relacionando a quantidade destes tipos celulares com parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase em linfonodos regionais, metástase à distância, estágio clínico, recidiva local e desfecho) e com a gradação histopatológica de malignidade dos tumores. Além disso, através da análise da imunexpressão das quimiocinas CCL20 e CCL22, será avaliado um possível fenótipo imunossupressor dos MATs M2 nos CCEs de língua.

Avaliação dos Riscos e Benefícios: Considerando a justificativa e os aportes teóricos e metodologia apresentados no presente projeto, e ainda considerando a relevância do estudo as quais são explícitas suas possíveis contribuições, percebe-se que a mesma não apresenta riscos aos participantes a serem pesquisados, tendo em vista que a pesquisa realizará a coleta de dados em fichas clínicas e utilizará lâminas histológicas e espécimes biológicos mantidos em arquivos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa: A presente proposta de pesquisa é de suma importância quanto papel e atribuições das Instituições de Ensino Superior (IES), mormente pesquisa a nível de mestrado, estando dentro do perfil das pesquisas de construção do ensino-aprendizagem significativa, perfilando a formação profissional baseada na tríade conhecimento-habilidade-competência, preconizada pelo MEC. Portanto, tem retorno social, caráter de pesquisa científica e, contribuição na formação de mestres em Odontologia.

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: 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. Portanto, não há 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.

APÊNDICES

APÊNDICE A –

Ficha para coleta de dados referente à análise clínica dos casos de CCE de língua oral.

| Caso | Parâmetros | | | | | |
|------|------------|------|------------------|-------------------------------|-----------------------|-----------------|
| | Idade | Sexo | Tamanho do tumor | Metástase linfonodal regional | Metástase à distância | Estágio clínico |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

APÊNDICE B –

Ficha para coleta de dados referente à análise do grau histopatológico de malignidade, de acordo com o sistema proposto por Bryne *et al.* (1992).

| Caso | Parâmetros | | | | Escore Total | Grau histopatológico |
|------|-----------------------|----------------------|-------------------------|-------------------|--------------|----------------------|
| | Grau de ceratinização | Pleomorfismo nuclear | Infiltrado inflamatório | Padrão de invasão | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |
| | | | | | | |

