



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

DEISE SOUZA VILAS BÔAS

LOCALIZAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA CICLOXIGENASE-2,
MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR, MICRODENSIDADE
VASCULAR, POTENCIAL PROLIFERATIVO E SUA RELAÇÃO COM
GRAU DE DIFERENCIAÇÃO EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR
DE BOCA

Salvador
2008

DEISE SOUZA VILAS BÔAS

LOCALIZAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA CICLOXIGENASE-2,
MACRÓFAGOS ASSOCIADOS AO TUMOR, MICRODENSIDADE
VASCULAR, POTENCIAL PROLIFERATIVO E SUA RELAÇÃO COM
GRAU DE DIFERENCIAÇÃO EM CARCINOMA ESCAMOCELULAR
DE BOCA

Dissertação apresentada ao Instituto
de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal do Rio de
Janeiro para obtenção do título de
Mestre em Ciências Morfológicas na
área de Patologia Geral.

Orientador: Profa. Dra. Christina Maeda Takiya
Co-Orientador: Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos

Salvador
2008

Vilas Boas, Deise Souza

Localização imunohistoquímica da cicloxigenase-2 e macrófagos associados ao tumor, microdensidade vascular, potencial proliferativo e sua relação com grau de diferenciação em carcinoma escamocelular de boca/ Deise Souza Vilas Boas. – Rio de Janeiro: UFRJ / ICB, 2008.

xxi, 126 f. : il. ; 31 cm.

**Orientadores: Christina Maeda Takiya e Jean Nunes dos Santos
Dissertação (mestrado) – UFRJ/ICB, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, 2008.**

Referências bibliográficas: f. 131-148

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Cicloxigenase-2. 3. Imunoistoquímica. 4. Antígeno Ki-67. 5. Macrófagos. 6. Fator VIII. 7. Humanos. 8. Neoplasias bucais. 9. Patologia Geral – Tese. I. Takiya, Christina Maeda. II. Santos, Jean Nunes dos. III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, ICB, Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas. IV. Título.

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Celular do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Ciências Biomédicas, ICB, na Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, sob a orientação da Professora Dra. Christina Maeda Takiya e no Laboratório de Patologia Cirúrgica do Departamento de Diagnóstico e Propedêutica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, FOUFBA, sob a co-orientação do Professor Dr. Jean Nunes. Os experimentos foram viabilizados mediante recursos concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ)

Ao **meu pai**, que jamais me julgou em minhas escolhas.

À **minha mãe**, que sempre estimulou nos filhos o interesse intelectual.

Ao **meu irmão Henrique**, que me deu desde o meu primeiro chiclete até o meu primeiro
álbum de Beethoven.

A **Romar**, o cavalo sagrado e selvagem que purifica a terra dos homens.

A **André**, um guardador de rebanhos com seu violino de um milhão de cores.

A **Wellington**, o sábio das entranhas e sua mistura singular de *Apocalypse* com *Alice*.

A todos os entusiastas da vida.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Profa. Dra. **Christina Maeda Takiya**, pela sua imensa generosidade e confiança desde os primeiros momentos de contato com a minha pessoa. Por ter abraçado meu trabalho desde o início e por ter posteriormente me recebido como orientanda. Pela grande competência profissional na condução dos experimentos e decisiva doação material para desenvolvimento deste projeto. Pela paciência e incentivo ímpar à minha carreira; pelo maravilhoso cuidado, amor e carinho a mim dirigido em todas as minhas estadias no Rio de Janeiro. Pelas deliciosas iguarias vegetarianas que preparou para mim em suas madrugadas.

Ao Prof. Dr. **Jean Nunes dos Santos**, pela tão copiosa e dedicada orientação ao longo de todas as etapas de elaboração deste trabalho, pela grande competência profissional, empenho e preciosa sugestão no redirecionamento do tema. Pela amizade, amor e carinho imensos. Por ter sempre me incentivado à vida acadêmica e por ter contribuído substancialmente na minha vida profissional me inspirando o procedimento ético e criterioso. Pela confiança e paciência. Por ter disponibilizado os casos do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUFBA, o que viabilizou a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. **Tatiana Coelho de Sampaio**, por ter me aceito ainda à distância como sua orientanda; pela competente orientação na primeira parte do meu mestrado e por ter sempre confiado em mim. Pela solicitude em resolver meus problemas burocráticos quando da minha ausência no Rio de Janeiro. Pela grande compreensão e pelo incentivo para alçar 'vôos sempre maiores'. Pelo grande carinho, cuidado e afeto comigo compartilhados em todas as minhas estadias no Rio de Janeiro. Pelo exemplo de ética e virtude ao longo da minha pós-graduação.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho científico, por mais simples que seja, abarca em si muito mais do que as chamadas 'relações de funções' estabelecidas pela Ciência. E ainda que preliminar ou pequeno em suas pretensões, dificilmente será realizado apenas por uma pessoa, sem o auxílio e incentivo de outrem (s).

É com muita satisfação que realizo aqui muito mais do que um cumprimento de regra ou burocracia acadêmica. Dirijo meu olhar e minha gratidão a todos aqueles que, mesmo que de uma forma 'sem saber que o estavam fazendo', auxiliaram no desenvolvimento desta empreitada. Porque o processo de composição, ainda que dure segundos, é sempre uma empreitada do corpo e da alma.

A **Adna Barros**, pela sua amizade, carinho e incentivo.

Ao Prof. Dr. **Alexandre Ribeiro do Espírito Santo**, pela grande amizade, carinho, confiança, incentivo e companheirismo profissional; por compartilhar comigo seus conhecimentos científicos e pela importante orientação na elaboração dos gráficos e tabelas.

Ao **André Cipolla**, pelo seu amor, incentivo artístico e filosófico; por ter me hospedado em sua casa no Rio de Janeiro de forma tão abnegada e carinhosa; por ter compartilhado comigo sua maravilhosa luz.

Ao Prof. Dr. **Aryon de Almeida Barbosa Júnior**, por ter colocado à disposição o acervo de carcinomas basocelulares do seu laboratório de patologia (IPAC). Pelo incentivo no meu mestrado e pelas sugestões na parte inicial deste projeto.

À **Biblioteca da Faculdade de Odontologia da UFBA**, na pessoa da ex-bibliotecária **Valdete**, que disponibilizou seu acervo para empréstimo mesmo não existindo um número de matrícula em meu nome na instituição.

À **CAPES** e à **FAPESB**, pela concessão de bolsa durante parte do meu mestrado.

Ao meu irmão **Carlos Henrique Vilas Boas**, por tanto amor, carinho e orientação intelectual. Por ter ofertado sempre boa parte de sua alma em prol de pequenas e grandes alegrias minhas. Por toda ajuda financeira e por ter me hospedado tão amorosamente em sua casa no Rio de Janeiro.

À Profa. **Clarissa Gurgel**, pela amizade e auxílio na parte inicial deste projeto; por ter dividido comigo meus primeiríssimos passos na imunohistoquímica.

Aos **colegas do Laboratório da Matriz Extracelular - ICB/UFRJ** (Karla Menezes, Profa. Lela Campos, Marcos Assis, Maria Lúcia e Wendell Girard), pelo companheirismo e incentivo; e em especial a Camila Hochman e Madalena Barroso, pela amizade e auxílio metodológico.

Aos **colegas do Laboratório de Patologia Celular - ICB/UFRJ** (André Barreira, Bernardo Pascarelli, Caroline Dalmas, Denielle Lopes, Grazy Lela, Isabela Assis e Priscila Frazão) pelo excelente convívio, carinho, incentivo, auxílio e ensinamentos.

Ao Sr. **Dagoberto Leite**, diretor do Serviço de Patologia Cirúrgica (SEPAC), que prontamente cedeu seus casos de carcinoma escamocelular, o que possibilitou o desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço, sobretudo a **Deus** -“causa de si e de todas as coisas” (Spinoza) pela vida, que me é abundante e bela.

Ao Prof. Dr. **Eduardo Ramos**, que tão gentilmente cedeu o Laboratório de Histopatologia da FIOCRUZ/CPqGM para execução da parte inicial deste trabalho e contribuiu com sugestões importantes para a metodologia.

À Profa. Dra. **Eliane Sousa**, grande amiga e incentivadora, pela importante contribuição na minha formação como docente e por manter sempre o brilho nos meus olhos.

À Profa. Dra. **Fabiana Paim**, por possibilitar meu tirocínio docente na disciplina de Processos Gerais em Patologia (ICS/UFBA), o que contribuiu para minha formação durante o mestrado.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia**, na pessoa da Profa. Dra. **Maria Isabel Vianna**, pelo incentivo, acolhimento e por disponibilizar sua infra-estrutura para realização deste projeto.

Aos **funcionários da Gol - Linhas Aéreas Inteligentes**, pelas várias liberações concedidas aos meus memoráveis excessos de bagagem nas viagens durante o mestrado.

Ao **Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal do Rio de Janeiro**, na pessoa do Prof. Dr. **Adalberto Ramon Vieyra**, por disponibilizar sua infra-estrutura para realização deste projeto.

Ao **Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia**, na pessoa da Profa. Dra. **Maria Thereza Barral Araújo**, pelo convênio com a Universidade Federal do Rio de Janeiro, ao qual está vinculado o desenvolvimento deste trabalho; por me disponibilizar o acesso domiciliar aos periódicos CAPES.

À Profa. Dra. **Isabela Campos**, grande amiga e incentivadora; ilustre companheira de alegrias e vicissitudes, pelo amor, confiança e solicitude; por compartilhar comigo seus conhecimentos e sua energia tão elevada.

Ao Prof. Dr. **Leandro Miranda**, pelo carinho, amizade e apoio metodológico, sobretudo na fase de padronização do experimento.

Ao **Leonardo Monção**, escudeiro de minhas estadias cariocas, pelo carinho, amizade e companheirismo sem igual. Por ter me ensinado minúcias de laboratório; por ter me auxiliado em várias fases de execução deste trabalho; por ter zelado pela minha vida no Rio de Janeiro.

À Profa. Dra. **Márcia Grillo Cabral** (FO-UFRJ), que disponibilizou prontamente os casos de carcinoma escamocelular de boca necessários ao fechamento da minha amostra.

Ao Prof. Dr. **Márcio Cajazeiras**, pela amizade, incentivo sempre presente, confiança e pela importante orientação para confecção das pranchas.

À Profa. Dra. **Maria Cristina Cangussu**, pelo imprescindível auxílio no tratamento estatístico deste trabalho; pela sua paciência e carinho.

À Profa. **Maria da Penha**, pela compreensão e incentivo profissional ao longo do meu mestrado e em todas as minhas ausências de Salvador.

À Profa. **Maria das Graças** (HU-UFRJ/ Serviço de Cirurgia Buco-maxilo-facial) e sua equipe, pela prontificada colaboração no fornecimento de amostras de tecido bucal que foram utilizadas para controle positivo.

À Profa. Dra. **Maria de Fátima Dias Costa**, pelo incentivo durante o mestrado e pelas palavras de carinho sempre presentes.

Aos **mestres mortos**, que são acessados através de seus escritos e biografias.

Aos **mestres vivos**, principalmente aqueles que não sabem que são mestres.

Aos **meus alunos, ex-alunos e monitores**, pelas atitudes e palavras de carinho e reconhecimento.

À minha mãe, **Neide Vilas Boas**, por tão sublime amor, dedicação e delicadeza; por ter sempre cuidado de mim desde a minha mais tenra idade com extremo carinho, pureza de alma e ter me orientado dentro do melhor de seu ser. Por ter me financiado de uma forma quase miraculosa ao longo de minha formação e ter sempre me incentivado na carreira científica.

Ao **Paulo Costa**, pelo incentivo e apoio na minha carreira; pela compreensão e ajuda quando das minhas ausências em Salvador.

Ao Prof. Dr. **Radovan Borojevic**, pelo incentivo e pela preciosa sugestão durante a pré-avaliação deste trabalho. Pela sua dedicação a fim de engrandecer a pós-graduação *strictu sensu* da UFBA.

Ao meu pai, **Raimundo Carlos Vilas Boas**, por tão grande amor, humildade e generosidade; por ter cuidado de mim desde sempre e por ter plantado em mim as sementes do amor e da integridade. Por ter me financiado de uma maneira inacreditavelmente desapegada e incentivadora; por me fortalecer em minhas aptidões.

Ao **Romar Blanco**, meu grande amor, pelo seu incondicional amar e dedicação conjugal; pela sua fiel amizade e cuidado com o meu ser em todos os momentos; por ter me ensinado a viver sempre leve; por ter zelado maravilhosamente bem da minha casa durante as viagens ao Rio de Janeiro.

À Profa. Dra. **Sílvia Reis**, pelo carinho, incentivo e por tão relevante contribuição na minha formação acadêmica. Por ter valorizado as minhas diferenças e possibilitado meu ingresso no grupo PET-Odontologia, o que decisivamente ampliou meus horizontes e consolidou meu caminhar ao lado da docência e da pesquisa científica.

A **Stefani Menezes**, pelo auxílio e pelas dicas de *Corel Draw*.

Aos **técnicos de laboratório** Ana (Histopatologia - FIOCRUZ/CPqGM), Cristina (microtomia e colorações - FIOCRUZ/CPqGM), Glória (arquivo - IPAC), Janice (arquivo - SEPAC), Miriam (arquivo - FO/UFBA), Nancy (microtomia e colorações - SEPAC), pela atenção e prontidão nas solicitações, pela competência profissional e pelos ensinamentos; e em especial a Lourdes (microtomia e colorações - FO/UFBA), Luís (microtomia e colorações - ICB/UFRJ) e Silvânia (processamento de material e reagentes - ICB/UFRJ) pelo adicional amizade e alegria. Sem vocês este trabalho certamente não seria uma realidade!

A **Tânia**, funcionária da biblioteca da Faculdade de Odontologia da UFBA, pela simpatia, orientações e prontidão na importação dos textos.

Ao **Tiago Ribeiro**, amigo que me ascende ao pensamento e ao sentimento, pelo seu incentivo e por ter feito da sua casa a minha.

Ao Prof. Dr. **Vivaldo Moura Neto**, pelo carinho, incentivo e pelo imenso empenho na resolução de questões burocráticas referentes à minha bolsa.

A **Vívian Samoto**, pela grande amizade, carinho e auxílio na padronização do experimento; pelas dicas de imunohistoquímica e companheirismo nas celebrações cariocas.

Ao **Wellington Mendes**, por ter me conduzido até a superfície em episódios de afogamento existencial; por ter comigo compartilhado pensamentos nobres e bom-humor; por ter auxiliado financeiramente minha formação acadêmica de forma substancial e amorosa.

A todos os amigos, colegas e transeuntes que compartilharam amistosamente comigo esta importante fase da minha vida e não estão aqui citados.

“Na história da humanidade (e dos animais também) aqueles que aprenderam a colaborar e improvisar foram os que prevaleceram.”

Charles Darwin

RESUMO

O carcinoma escamocelular de boca (CEB) se constitui numa neoplasia maligna que pode evoluir de uma displasia intensa até uma lesão com alto grau de agressividade local e metástase. O tumor cresce a partir da proliferação de células malignas e tecidos adjacentes de suporte, sobretudo novos vasos sanguíneos. Além disso, um componente inflamatório está presente no microambiente do CEB predispondo ao crescimento e à disseminação. Cicloxigenase-2 (COX-2) e macrófagos associados ao tumor (MATs) são componentes inflamatórios presentes no CEB, e podem influenciar o crescimento e disseminação tumorais. No presente estudo, avaliamos a expressão de COX-2, MATs, Ki-67 e microvasos tumorais em CEB, associando esses achados com a graduação histológica de malignidade (OMS) e dados clínicos de lesões *in situ* e invasivas. Localização imunohistoquímica realizada em cortes desparafinizados de 27 tumores mostrou que a COX-2 é expressa no CEB por células epiteliais, endoteliais e estromais. Uma elevação na expressão de COX-2 foi observada em 62,96% (forte 17, moderada 3, fraca 1, ausente 3) da amostra. O teste do X^2 mostrou ausência de associação entre o escore epitelial de COX-2 (intensidade e proporção) e grau de diferenciação das lesões. O teste de análise de variância *One way* mostrou que o índice de proliferação (antígeno Ki-67, anticorpo monoclonal MIB-1) mostrou-se associado ao grau de diferenciação dos tumores ($p=0,000$). A densidade microvascular (DMV) avaliada pelo fator-VIII em aumento de 400X foi significativamente maior nos CEBs menos diferenciados quando comparadas entre si apenas lesões invasivas ($p < 0,05$). Os MATs foram avaliados mediante observação de células marcadas pelo CD68 e apresentaram elevada densidade tanto nos CEBs *in situ* quanto nos invasivos com diferentes graus de diferenciação. Uma relação positiva foi observada entre raça e

expressão do Ki-67 ($p=0,000$), com elevados índices para os melanodermas. O teste de correlação de *Pearson* mostrou ausência de correlação entre as proteínas pesquisadas. Concluimos que no CEB o índice de proliferação medido pelo Ki-67 e a DMV apresentam valor prognóstico e que a elevação na expressão de COX-2 apresenta-se independente do grau de diferenciação. Ademais, é possível que a COX-2 e os MATs estejam envolvidos nos diversos estágios da carcinogênese oral.

Palavras-chave: 1. carcinoma de células escamosas. 2. cicloxigenase-2. 3. imunohistoquímica. 4. antígeno Ki-67. 5. macrófagos. 6. fator VIII

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a malignant neoplasm that ranges from an intense dysplasia to a lesion with high degree of locally aggressive and metastasis. The tumour grows with proliferation of malignant cells and adjacent supportive tissues, especially new blood vessels. Furthermore, an inflammatory component is present in the microenvironment of tumour, predisposing to growth and dissemination. Cyclooxygenase-2 (COX-2) and tumor-associated macrophages (TAMs) are inflammatory components present in OSCC and may influence tumour growth and metastasis. In the present study, we evaluated the expression of COX-2, TAMs, Ki-67 and tumour microvessel in OSCC, associating these findings with histological degree of malignancy (WHO) and clinical features of *in situ* and invasive lesions. Immunohistochemical localization in 27 deparaffinized tissue sections showed that COX-2 was expressed in OSCC by epithelial, endothelial and stromal cells. An elevated COX-2 expression was observed in 62,96% (strong 17, moderate 3, weak 1, absent 4) of the 27 tumour samples. χ^2 analysis showed no significant association between epithelial COX-2 histoscore (intensity and proportion) and degree of differentiation. One way analysis showed that proliferative index (Ki-67 antigen, monoclonal antibody MIB-1) was associated with the histological degree of malignancy of tumours ($p=0,000$). Microvessel density (MVD) assessed by factor-VIII (400X) was statistically different in OSCC when compared only invasive lesions ($p < 0.05$). TAMs assessed by CD68 were found in high density both in *in situ* and invasive OSCC exhibiting different degrees of malignancy. A significant relationship was observed between race and expression of Ki-67 ($p=0,000$), with high scores for blacks. Pearson correlation showed no correlation between studied proteins in our study. In conclusion, Ki-67 and MVD are in

accordance with the histological degree of malignancy of OSCC, and might be important as prognostic factors. COX-2 overexpression in OSCC is independent of the histological degree of the lesion. Furthermore, it is possible that COX-2 and TAMs may be involved in diverse stages of oral carcinogenesis.

Keywords: 1. oral squamous cell carcinoma. 2. cyclooxygenase-2. 3. imunohistochemistry. 4. Ki-67 antigen. 5. macrophages. 6. factor VIII.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Distribuição dos casos de carcinoma escamocelular de boca (CEB) da amostra estudada pela faixa etária.....	73
Tabela 1	Características clínicas referentes à amostra estudada de CEB.....	74
Figura 2	Padrões morfológicos dos CEBs da amostra estudada.....	75 e 76
Figura 3	Distribuição dos casos de CEB da amostra estudada pela idade dicotomizada.....	77
Tabela 2	Características histológicas dos casos de CEB da amostra estudada e dados dos marcadores biológicos.....	78
Tabela 3	Distribuição da cor da pele dos pacientes pelos valores dos marcadores biológicos estudados.....	79
Figura 4	Expressão imunohistoquímica do Ki-67 nos CEBs da amostra estudada e nos controles positivos.....	80 e 81
Figura 5	Índice de proliferação medido pelo Ki-67 em relação à graduação histológica (OMS) dos CEBs da amostra estudada.....	82
Figura 6	Índice de proliferação medido pelo Ki-67 em relação à graduação histológica (OMS) dos CEBs da amostra estudada. Comparação apenas entre as lesões invasivas.....	82
Figura 7	Densidade microvascular aferida pelo F VIII em relação à graduação histológica (OMS) dos CEBs da amostra estudada.....	84
Figura 8	Densidade microvascular aferida pelo F VIII em relação à graduação histológica (OMS) dos CEBs da amostra estudada. Comparação apenas entre as lesões invasivas.....	84

- Figura 9 Expressão imunohistoquímica do anti- fator *von Willebrand* humano (Fator VIII) nos CEBs da amostra estudada e nos controles positivos..85 e 86
- Figura 10 Padrão de distribuição de células imumopositivas para o CD68 nos CEBs da amostra estudada e nos controles positivos.....88
- Figura 11 Densidade macrofágica aferida pelo CD68 em relação à graduação histológica (OMS) dos CEBs da amostra estudada.....90 e 91
- Figura 12 Padrão de expressão imunohistoquímica de cicloxigenase-2 (COX-2) no parênquima dos CEBs da amostra estudada.....92 e 93
- Figura 13 Elevada expressão imunohistoquímica de COX-2 no parênquima de CEBs *in situ* e invasivos exibindo diferentes graus de diferenciação da amostra estudada.....94 e 95
- Figura 14 Expressão da COX-2 no parênquima dos casos de CEB da amostra estudada em relação à graduação histológica (OMS).....96
- Figura 15 Padrão de expressão imunohistoquímica de COX-2 no estroma dos CEBs da amostra estudada.....98 e 99
- Figura 16 Expressão imunohistoquímica da COX-2 no parênquima e no estroma em diferentes regiões de um CEB moderadamente diferenciado.....100 e 101

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenocarcinoma Cístico
AD	Adenocarcinomas
AP	Adenoma Pleomórfico
CCL	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CEB	Carcinoma Escamocelular de Boca
CEM	Carcinoma Epitelial/Mioepitelial
COX-1	<i>Cyclooxygenase -1</i>
COX-2	<i>Cyclooxygenase-2</i>
DEO	Displasia Epitelial Oral
DMV	Densidade Microvascular
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EUA	Estados Unidos da América
FGFb	<i>Fibroblast Growth Factor 2 (basic)</i>
FOUFBA	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia
FO-UFRJ	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro
F VIII	Fator-VIII
GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i>
HIF	<i>Hypoxia Inducible Factor</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>

ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
IFN- γ	<i>Interferon Gamma</i>
IL	<i>Interleukin</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MAT	Macrófago Associado ao Tumor
MCP-1	<i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
MDGF	<i>Macrophage-Derived Fibroblast Growth Factor</i>
MIB-1	<i>Molecular Immunology Borstel</i>
MMP	<i>Matrix Metalloproteinase</i>
M-CSF	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
MVD	<i>Microvessel Density</i>
NK	<i>Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido Nítrico
OSCC	<i>Oral squamous cell carcinoma</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDGF	<i>Platelet-Derived Growth Factor</i>
PG	<i>Prostaglandin</i>
RNA _m	<i>Messenger Ribonucleic Acid</i>
RT-PCR	<i>Real-Time Polymerase Chain Reaction</i>
SEPAC	Serviço de Patologia Cirúrgica
TAM	<i>Tumour Associated Macrophage</i>
TGF β	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>

TNF α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha</i>
TUNEL	<i>Terminal Deoxynucleotidyl Transferase-mediated dUTP Nick and Labelling</i>
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
X^2	<i>Qui-quadrado</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
3 OBJETIVOS	64
4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS	65
5 RESULTADOS	72
6 DISCUSSÃO	102
7 CONCLUSÃO	130
REFERÊNCIAS	131

1. INTRODUÇÃO

Não obstante os enormes esforços empenhados e os expressivos progressos obtidos até o momento na compreensão e intervenção do câncer, as estatísticas disponíveis demonstram que a doença se constitui ainda em flagelo mundial, afetando parcela considerável da população de países de todos os continentes, de todos os padrões de desenvolvimento econômico e social, de diversas etnias e hábitos culturais e numa larga faixa etária. Câncer oral é referido como um subgrupo entre as neoplasias malignas que se desenvolvem primariamente na boca, representando cerca de 5% das neoplasias malignas existentes (World Health Organization – WHO, 2007).

Entre os tipos de câncer que podem acometer a cavidade oral, destaca-se o carcinoma escamocelular de boca (CEB), que corresponde a mais de 90% dos casos da doença e consiste numa neoplasia maligna do epitélio de revestimento capaz de acometer língua, lábios, mucosa jugal, assoalho da boca, palato, glândulas salivares e outras localizações intra-orais (Classificação Internacional das Doenças/CID, 1990; Moore et al., 2000). A abordagem do CEB é importante em virtude dos seus elevados índices de morbidade e mortalidade, uma vez que se constitui na forma mais prevalente de câncer em alguns países do Oriente ou pode ainda produzir nos indivíduos sobreviventes limitações severas à sua vida social por comprometer gravemente a aparência e funções básicas como mastigação e fonação (Vokes et al, 1993; Choi et al., 2006; Pandey et al, 2008).

O crescimento do CEB ocorre principalmente a partir de uma proliferação das células malignas e de tecidos adjacentes de suporte, especialmente novos vasos sanguíneos, sem os quais o tumor morre por desnutrição. Além disso, um componente inflamatório constituído por células e mediadores químicos está presente no microambiente tumoral,

também predispondo ao seu desenvolvimento e disseminação (Mantovani et al., 1992; Ueno et al, 2000; Alberts et al., 2004; Weidner, 2004; Allavena, Sica et al, 2008).

A cicloxigenase-2 (COX-2) é uma enzima envolvida em situações inflamatórias e sua expressão está associada ao favorecimento de diversos tipos de câncer. Os macrófagos constituem juntamente com os linfócitos o principal componente celular inflamatório tumoral, podem influenciar positivamente o tumor de diversas formas, além de serem os principais secretores de COX-2 no estroma tumoral. Os episódios-chaves na carcinogênese relacionados à COX-2 e aos macrófagos envolvem a redução de imunidade anti-tumoral, indução de angiogênese, perda de adesividade celular e expressão de metaloproteinases. (Tsuji et al., 1997; Tsujii et al., 1998; Jones et al., 1999; Huang et al., 2000; Tanabe & Tohnai, 2002; Hotchkiss et al., 2003; Bonizzi & Karin, 2004; Hagemann et al., 2004; Dohadwala et al., 2006; Mantovani et al., 2007; Allavena et al., 2008). No entanto, existem poucos trabalhos na literatura que demonstram a participação da COX-2 e macrófagos em neoplasia orais.

A pesquisa de proteínas relacionadas ao CEB, bem como sua relação com características clínicas e histopatológicas, permite o conhecimento de como fatores biológicos e locais podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença, contribuindo na elaboração de estratégias terapêuticas.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a imunoexpressão de COX-2, Ki-67 (sinalizador de proliferação celular), microvasos tumorais e macrófagos associados a 27 CEBs de diferentes estágios de diferenciação, investigando a presença de correlação entre as proteínas e de associação às características clínico-patológicas dos tumores.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1.CÂNCER ORAL

2.1.1 Epidemiologia

O carcinoma escamocelular de boca (CEB) se constitui na oitava neoplasia maligna mais comum no mundo e importante causa de morbi-mortalidade, principalmente no Oriente. A incidência da doença varia consideravelmente nos cinco continentes e tem crescido dramaticamente em muitas regiões. De um modo geral, as maiores taxas encontram-se nos países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos (Moore et al., 2000), assim como os tumores com piores características clínicas e histopatológicas (Carvalho et al., 2004).

Em alguns países da Ásia, mais especificamente no subcontinente Indiano, a doença apresenta-se como grave problema de saúde pública, chegando a se constituir na mais prevalente forma de câncer entre homens (Pandey et al. 2008). Pessoas brancas são as mais acometidas pelo câncer de lábio, que registra maior ocorrência no lábio inferior em relação ao superior. Para todas as outras regiões da boca, são mais relevantes hábitos culturais em relação à etnia. (Brasil, Ministério da Saúde - INCA, 2008).

Particularmente no Brasil, o câncer de boca apresenta uma das maiores taxas mundiais de incidência, com cerca de 14.160 novos casos previstos para 2008 de um total de 466.730 novos casos de câncer. A distribuição dos casos específicos de câncer oral apresenta-se, como há muitos anos, heterogênea entre estados e capitais do país, sendo as

regiões Sul e Sudeste as mais acometidas e as regiões Norte e Nordeste as que mostram as menores taxas (Brasil, Ministério da Saúde - INCA, 2008).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, somente no estado da Bahia, 760 entre os 18.450 casos de câncer ocorreram na cavidade bucal, sendo aproximadamente 250 registrados em Salvador. Para o estado do Rio de Janeiro, que apresenta uma das maiores taxas nacionais, ocorrerão no ano de 2008 aproximadamente 2.030 novos casos de câncer oral entre os 54.850 casos de câncer estimados, sendo 900 de ocorrência na capital. (Brasil, Ministério da Saúde - INCA, 2008).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado aumento na incidência do câncer oral nos últimos quinze anos tanto em homens quanto em mulheres em países como o Reino Unido, sobretudo em pessoas acima de 45 anos (Conway et al., 2006), embora estimativas demonstrem globalmente um crescimento na incidência da doença em pessoas jovens ((Mackenzie et al., 2000). Cerca de 5% de todos os casos de câncer da cavidade oral ocorrem em pacientes que possuem menos de 40 anos de idade (Llewellyn et al., 2001) e os mecanismos através dos quais estas pessoas desenvolvem a doença parecem ser similares àqueles que ocorrem nos mais velhos (Jin et al., 1999).

Entre os fatores que têm contribuído para o aumento na incidência do câncer em jovens deve ser ressaltado o hábito de fumar nos primeiros anos da adolescência, o que gera a persistência de DNA *adducts* (ligações covalentes de compostos genotóxicos a fragmentos da molécula de DNA) no tecido pulmonar, por ser este mais vulnerável aos carcinógenos do tabaco nos jovens (Wiencke et al., 1999).

2.1.2 Etiologia

A etiologia do câncer de boca não está relacionada a apenas um carcinógeno específico, no entanto se admitem que o fumo e o consumo de álcool sejam os principais agentes causadores, estando relacionados com aproximadamente 75% dos casos (La Vecchia et al., 1997; Mackenzie et al., 2000). Entre os demais fatores relacionados ao surgimento da doença podem ser citados a radiação ultravioleta, a irradiação X, deficiências nutricionais, imunossupressão, infecção por HPV (papilomavírus humano) e por Candida, além de sífilis (La Vecchia et al., 1997; Moore, Moore et al., 2001; Hashibe et al., 2005). Para indivíduos jovens que nunca fumaram, a presença do HPV e predisposição a instabilidades genéticas parecem ser os fatores mais associados (Lingen et al., 2001; Llewellyn et al., 2001).

Milhões de pessoas no mundo inteiro são fumantes e a porcentagem da população que possui este hábito varia entre 25% da população total, como acontece no Reino Unido e na Austrália, e 63% da população total, como ocorre na China. O tabaco é esclarecidamente o maior fator independente para risco de câncer oral e faríngeo, e seus usuários apresentam de 7 a 10 mais chances de desenvolver a doença em relação a pessoas que nunca fumaram (Lam et al., 2004; Conway et al., 2006).

O tabaco pode ser consumido de diversas formas, no entanto os usuários mais prevalentemente o utilizam em forma de cigarro enrolado industrialmente fumando com a chama para fora da boca. Outras maneiras menos comuns de uso incluem fumar cigarros enrolados manualmente com a chama para dentro da boca (fumo invertido), fumar charutos, aspirar ou até mesmo mascar diretamente o tabaco. Todas as formas de utilização

acima citadas estão relacionadas com o desenvolvimento do câncer oral, ainda que apresentem riscos distintos (Warnakulasuriya et al., 2005).

O hábito de fumar invertidamente, embora globalmente singular, é comum em algumas regiões da Índia e da América do Sul (Alvarez Gómez et al., 2008). Segundo estudo longitudinal realizado ao longo de seis anos, este costume está fortemente relacionado com o câncer oral, principalmente com lesões no palato, uma vez que o efeito de hipertermia gerado pela presença da chama no interior da cavidade bucal apresenta efeito sinérgico com os carcinógenos presentes no tabaco (Stich et al., 1992; Gupta, et al., 1980).

De acordo com Kim et al. (2006), o tabaco levaria a um maior risco para o câncer oral por acentuar as deficiências do processo replicativo e dos mecanismos de reparo diante da produção de *DNA adducts* (Wiencke et al., 1999) e de injúrias oxidativas, que ocorrem sobretudo no DNA mitocondrial, o qual é mais susceptível às lesões em relação ao DNA nuclear por não receber o efeito protetor das histonas. Estas são proteínas fundamentalmente responsáveis pelo nível mais básico de organização cromossômica (nucleossomo), sendo cruciais no processo de estruturação da cromatina e compactação do DNA durante a divisão mitótica (Alberts et al., 2004). Kim et al. (2006), que trabalharam com diversas linhagens celulares cancerosas de cabeça e pescoço, acreditam que o tabaco seria capaz de exaurir a capacidade da célula de realizar correções diante de uma injúria ao DNA mitocondrial, gerando uma susceptibilidade intrínseca às mutações carcinogênicas.

O consumo excessivo de álcool concomitante ao hábito de fumar apresenta-se como primeiro fator de risco para o câncer oral, uma vez que o risco para estes dois

agentes é sinérgico e o efeito potencial dos dois hábitos juntos supera a soma dos dois fatores se considerados isoladamente (Hindle et al., 2000). Alcoólicos crônicos geralmente fumam, o que dificulta o estabelecimento do real fator de risco independente do consumo de álcool (Moreno-López et al., 2000). No entanto sabe-se que o álcool, em pessoas que não fumam, apresenta-se como primeiro fator de risco para câncer oral (Lingen et al., 2001) e que o risco para desenvolver a doença ou para apresentar recidiva após tratamento está provavelmente associado ao genótipo que o paciente apresenta da álcool-desidrogenase, enzima responsável pela conversão do etanol a acetaldeído, um potente carcinógeno oral (Olshan et al., 2001).

2.1.3 Aspectos histológicos

Os CEBs frequentemente são originados de anormalidades do tecido de revestimento que podem ser desde uma hiperplasia até uma neoplasia intraepitelial denominada displasia epitelial oral (DEO) (Kujan et al., 2007). Esta última é considerada uma importante lesão pré-maligna que acomete a cavidade bucal, sendo classificada em diferentes estágios que variam de uma lesão de baixo grau, na qual as células em divisão podem ser encontradas no terço inferior do epitélio e as células epiteliais ainda permanecem com morfologia em escama mostrando sinais de diferenciação ainda que incompleta; até uma displasia de alto grau (carcinoma *in situ*), na qual as células de todas as camadas epiteliais estão proliferando e já não mostram sinais de diferenciação. Quanto mais desenvolvida a DEO, maior a probabilidade de evoluir para o câncer e menor o tempo necessário para que ocorra a transformação cancerosa (Alberts et al., 2004; Barnes et al., 2005; Kujan et al., 2007).

A partir de uma DEO acentuada, as células destroem a lâmina basal e invadem o conjuntivo adjacente, caracterizando a malignidade propriamente dita. Nesta as células exibem alterações morfológicas específicas como: hipercromasia nuclear (compactação e irregularidade da cromatina), alteração da relação núcleo/citoplasma (aumento do núcleo), pleomorfismo celular (variações pronunciadas no volume e na forma do citoplasma), hiper celularidade (aumento do número de células por área), além de um aumento no número de mitose típicas e atípicas (tri ou multipolares) e perda completa da diferenciação celular (anaplasia) (Alberts et al., 2004; Barnes et al., 2005).

2.1.4 Graduação histológica

Os CEBs apresentam comportamentos biológicos muitas vezes surpreendentes, mesmo dentro de uma localização anatômica específica. O curso clínico, por exemplo, da CEB de língua é claramente imprevisível, principalmente das lesões em estágio inicial, nas quais o índice de metástases ocultas é relativamente elevado (Keski-Säntti et al., 2007). Nesse sentido, a predição do comportamento do tumor pode ser auxiliada pela avaliação de sua atividade biológica e tem sido realizada há muitos anos mediante análise de parâmetros histológicos que envolvem aspectos morfológicos do tumor e de sua população celular (Anneroth et al., 1986).

Em 1941, Broders propôs um método de graduação histológica de malignidade essencialmente descritivo, que contemplava a proporção de maturação e diferenciação celular nas porções menos diferenciadas do tumor, através do qual este poderia ser classificado como: altamente, moderadamente ou pobremente diferenciado. De acordo com Anneroth et al. (1986), este método apresenta um fator limitante da maior relevância, que é

a restrição da análise à população celular tumoral, o que impediria inferir prognóstico adequado para delineamento da terapia.

Em 1973, Jakobson et al. estabeleceram um sistema de graduação histológica de malignidade para carcinomas de laringe, o qual passou a ser utilizado para carcinomas orais. Esta classificação ampliava os critérios morfológicos em relação ao método de Broders, agregando a análise da interface entre as células tumorais e o tecido hospedeiro (relação tumor-hospedeiro). Eram atribuídos valores de 1 a 4 de acordo com a observação de oito parâmetros morfológicos, incluindo: pleomorfismo nuclear, número de mitoses, modo e estágio de invasão, estrutura e diferenciação do tumor, resposta celular e invasão vascular.

Posteriormente, Anneroth & Hansen (1984) sugeriram dentro da classificação de Jakobson et al. (1973) a exclusão do critério “invasão vascular”. Segundo eles, a modificação proposta no sistema de graduação justificava-se pela impossibilidade de reconhecer e definir claramente este aspecto do tumor.

Em 1987, Anneroth et al. apresentaram um método de graduação multifatorial originado a partir de outras modificações daquele proposto por Jakobson et al. (1973). As alterações consistiam basicamente na inclusão de porcentagens e pontuação de parâmetros morfológicos que tornassem a avaliação semi-quantitativa, sendo eles: padrão e estágio de invasão, pleomorfismo nuclear, número de mitoses, grau de queratinização e infiltração linfo-plasmocitária. A atribuição de um escore de malignidade era obtida ao final pela divisão da somatória das pontuações.

Bryne et al. (1989), por sua vez, introduziram uma nova graduação histopatológica de malignidade para o CEB a partir de uma importante alteração no sistema estabelecido por Anneroth et al. (1987): a exclusão do parâmetro “estágio de invasão”. Segundo os autores,

a maior parte das biópsias incisionais apresentam pouca quantidade de material, o que inviabiliza adequada análise do estroma tumoral.

A classificação proposta por Bryne et al. (1989) consistia na observação das margens de invasão e das células nas áreas mais profundamente invasivas, que segundo os autores são as que ditam o comportamento clínico do tumor. Neste sistema de graduação, as lesões também recebiam uma pontuação para cada um dos aspectos histopatológicos analisados e um escore final obtido pela média aritmética da soma total dos pontos atribuídos a cada parâmetro avaliado. Escores elevados indicariam prognóstico pobre.

Em 2005, Brandwein-Gensler et al. sugeriram uma avaliação histopatológica de risco, na qual as margens tumorais não seriam aspecto de grande validação do prognóstico. De acordo com esse método de graduação, três variáveis histopatológicas (invasão perineural, infiltrado linfocítico e padrão de invasão) eram avaliadas e relacionadas com o índice de recorrência do tumor e com o nível de sobrevida dos pacientes. Valores numéricos eram atribuídos a cada um dos parâmetros histopatológicos, sendo o padrão de invasão definido pela notificação do pior padrão encontrado, e não do padrão predominante.

Embora diversos sistemas para graduação histológica tenham sido sugeridos na literatura, a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), proposta em 2005 (Barnes et al., 2005), tem sido a mais recentemente utilizada (Kademani et al, 2005; Bell et al., 2007; Huang et al., 2007; Keski-Sänttti et al., 2007), pois avalia os aspectos histopatológicos em conjunto e não necessita de qualquer tipo de cálculo. A análise baseia-se essencialmente na diferenciação celular, e os CEB são agrupáveis em três categorias: altamente, moderadamente ou pobremente diferenciados.

Os CEBs considerados ‘bem diferenciados’ são aqueles nos quais a arquitetura tecidual foi preservada dentro de uma semelhança com o epitélio escamoso normal. Os ‘moderadamente diferenciados’ são os que apresentam certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e pouca ceratinização. Aqueles que apresentam numerosas mitoses típicas e atípicas, queratinização mínima ou ausente e predomínio de células pleomórficas são classificados como ‘pouco diferenciados’ (Barnes et al., 2005). Os bem diferenciados são os que apresentam, portanto, melhor prognóstico, enquanto os pouco diferenciados revelam um prognóstico sombrio.

Embora já invalidada por alguns trabalhos como variável importante na predição do curso clínico do tumor, a graduação histológica prevalece na literatura como importante fator de emissão de prognóstico para o câncer oral. Em 2004, Lim et al. investigaram aspectos clínico-patológicos em pacientes portadores de CEBs de língua, utilizando a graduação de malignidade de Broders e escores de Bryne e de Anneroth para analisar o modo e a frente de invasão. Eles encontraram correlação significativa entre a presença de metástases cervicais e a graduação de Broders, bem como com os escores de Anneroth e de Bryne. No entanto, de todos os aspectos analisados, os autores só correlacionaram índice de sobrevivência dos indivíduos com presença de metástase cervical tardia.

Kademani et al. (2005) estudaram em 215 pacientes portadores de CEB características clínico-patológicas, incluindo a graduação histológica da OMS, no intuito de identificar fatores de predição para o prognóstico, sobretudo em relação ao período livre da doença. Eles observaram que idade, raça, gênero, localização e padrão das margens do tumor foram fatores que não influenciaram a sobrevida dos pacientes, que foi significativamente correlacionada com o estágio e graduação histológica dos tumores. Os

autores ressaltam a importância da graduação histológica como fator prognóstico independente para prever sobrevivência em indivíduos portadores de CEB.

Keski-Sänttti et al. (2007) realizaram estudo com 73 pacientes portadores de CEB de língua, no intuito de analisar o valor de quatro parâmetros histopatológicos para prever recorrência local, presença de metástases ocultas e índice de sobrevida dos pacientes. Eles não encontraram qualquer correlação entre a graduação histológica da OMS e a presença de metástases ocultas, correlacionando significativamente apenas com a infiltração e com o diâmetro patológico tumoral. Os autores correlacionaram apenas este último parâmetro histopatológico com o índice de recorrência local e não correlacionaram nenhum parâmetro com o índice de sobrevivência dos indivíduos. Eles consideram que a graduação histológica não apresenta qualquer valor prognóstico.

Huang et al. (2007) analisaram a significância prognostica de determinados aspectos clinico-patológicos em 150 pacientes portadores de CEB submetidos a tratamento cirúrgico. Foi estabelecida classificação histológica do tumor baseada na graduação da OMS e os autores encontraram este aspecto como fator que afetou de forma independente a taxa de sobrevivência dos pacientes. Segundo eles, a graduação histológica, ao lado do estágio do tumor, constitui a variável prognóstica mais importante para o CEB.

Bell et al. (2007) avaliaram em 115 pacientes com CEB de diferentes localizações a influência, não apenas das diferenças anatômicas, mas de aspectos clínico-patológicos, como variáveis emissoras de prognóstico. De acordo com os resultados encontrados, tanto o estágio do tumor quanto a graduação histológica da OMS apresentaram significância estatística ao serem correlacionados com o índice de sobrevivência dos indivíduos, o que não ocorreu em relação às diferenças nos sítios anatômicos de ocorrência da lesão.

Silveira et al. (2007) analisaram em 30 casos de CEB de língua a presença das citoqueratinas 7, 10, 13, 14, 16 e 19 e aspectos clínico-patológicos dos tumores, como tamanho do tumor, disseminação linfonodal e à distância. Para a graduação histológica, os autores utilizaram a classificação de Bryne que, segundo os resultados obtidos, foi o único aspecto que não se correlacionou com as variáveis clínicas do tumor. Os autores afirmam, portanto, que a graduação histológica de Bryne não atesta o comportamento biológico dos CEBs de língua.

2.1.5 Bases moleculares

O surgimento do câncer é um processo gradativo que está relacionado com um acúmulo de aberrações genéticas ou epigenéticas não-letais, sendo a primeira relacionada diretamente com a seqüência de DNA, e a segunda com o padrão de expressão dos genes sem que haja mudança na seqüência de DNA. Modelos matemáticos afirmam que aproximadamente de sete a dez alterações individuais devam ser produzidas até que o câncer se desenvolva (Renam, 1993). As alterações genéticas podem surgir de forma espontânea ou herdada. As alterações epigenéticas, por sua vez, sempre refletem a memória celular e ocorrem durante o desenvolvimento normal como manifestações da estabilidade dos diferentes estados de diferenciação celular. Ambas culminam na produção de alterações fenotípicas nas células tumorais (Alberts et al., 2004; Kumar et al., 2005).

As mutações nas células somáticas que levam à formação do câncer são originadas a partir de um comprometimento de genes específicos relacionados com a proliferação ou diferenciação celular, os quais são chamados de *oncogenes* quando são originados de genes estimuladores do crescimento e da divisão celular; e de *supressores de tumor* quando

relacionados ao controle negativo da proliferação celular, promoção da apoptose e diferenciação (Jones, 2004). Entre os processos bio-moleculares que estão vinculados ao surgimento da célula que originará um clone maligno estão: a ativação de oncogenes por mutação puntiforme, translocação, amplificação ou desregulação da expressão genética; alteração, deleção ou inativação de genes supressores de tumor; além de alterações em genes que controlam a apoptose ou que realizam o reparo do DNA (Alberts et al., 2004; Kumar et al., 2005).

Entre os oncogenes humanos mais associados ao desenvolvimento do câncer estão o *ras*, *myc*, *erbB*, *abl*, *sis*, sendo o *ras*, que se encontra mutado em cerca de um a cada quatro tumores humanos, o único capaz de sozinho gerar um célula maligna (Alberts et al., 2004) e o mais relacionado ao câncer oral. Dos genes supressores de tumor destacam-se o *Rb* e o *p53*, sendo as alterações em *p53* bastante relacionadas com o câncer oral. A forma ativa da pRb, sob a influência de importantes proteínas controladoras do relógio celular denominadas *cinases dependentes de ciclinas* (CDKs), impede o ciclo de entrar na fase S, funcionando assim como freio da divisão celular. O *p53* é expresso apenas diante de uma injúria ao DNA, impedindo em cooperação com a pRb a progressão da divisão celular, induzindo o reparo do DNA lesado ou a apoptose em caso de não reparação. Entre os genes controladores de apoptose, o *bcl-2*, relacionado com o controle anti-apoptótico, parece ser o mais envolvido nas malignidades orais (Jones, 2004).

O desenvolvimento de um tumor maligno está vinculado a inúmeras interações entre suas células e componentes do hospedeiro, incluindo inicialmente alterações nos mecanismos proliferativos e posteriormente o rompimento de uma membrana basal. (Kalluri, 2003; Kumar et al., 2005).

As metástases, principal causa de óbitos decorrentes do câncer, são implantes tumorais distantes e descontínuos em relação ao tumor primário. Para sua ocorrência estão implicados inicialmente invasão local através dos tecidos e posterior disseminação via linfática ou sanguínea. O complexo evento que se constitui na formação da metástase tumoral depende de diversos aspectos relacionados à interação entre células tumorais e células sadias do hospedeiro, mas depende sobretudo do potencial proliferativo e da formação de novos vasos (angiogênese) (Kumar et al., 2005).

2.2 PROLIFERAÇÃO CELULAR - Ki-67

A proliferação celular é considerada um dos principais mecanismos na tumorigênese (Van Diest et al., 1998). Embora as células cancerosas possuam um período de cumprimento do ciclo celular semelhante ao das células normais, elas apresentam um descontrole no número de vezes que são capazes de se dividir, podendo se tornar inclusive imortalizadas quando cultivadas em laboratório. Além disso, as células cancerosas perdem algumas propriedades controladoras da proliferação, a exemplo da inibição por contato, o que faz com que elas continuem a se replicar mesmo diante da união com a membrana celular de células vizinhas (Alberts et al., 2004).

De um modo geral, quanto maior o potencial proliferativo de um tumor, maior a sua natureza agressiva, o que faz deste importante fornecedor de prognóstico. A proliferação celular pode ser avaliada de três formas: através de marcadores de fração de crescimento; de marcadores de fases específicas do ciclo celular; e de marcadores da duração do ciclo celular (Gerdes et al., 1984; Gerdes, 1990).

O Ki-67 é uma grande proteína não-histona de 395kDa intrinsecamente relacionada aos mecanismos proliferativos da célula (Gerdes, 1990). A quantidade de pKi67 presente durante cada momento do ciclo celular é regulada, e ela se expressa por mecanismos proteolíticos, o que pode ser evidenciado pela sua susceptibilidade a determinadas proteases, a partir de fosforilação e desfosforilação durante a mitose (Schlüter et al., 1993; Wu et al., 2000).

O anticorpo anti Ki-67 detecta este antígeno nuclear, que está presente exclusivamente em células proliferativas. Ele pode ser classificado como marcador de fração de crescimento porque fornece o número de células que estão proliferando (Gerdes, 1990), e tem sido utilizado para demonstrar a atividade proliferativa celular nas fases G1, S, G2 e M do ciclo celular, apresentando expressão máxima nas fases G2 e M (Gerdes et al., 1984).

Devido a sua alta sensibilidade e especificidade para caracterizar proliferação celular em massa tumoral (Magdelénat, 1992), além de sua propriedade de expressar-se em quase todas as fases do ciclo celular, o Ki67 tem sido utilizado de forma confiável em trabalhos envolvendo estudo de neoplasias orais (De Aguiar et al., 2007; Katori et al., 2007).

Katori et al. (2007) realizaram um trabalho com objetivo de quantificar em humanos a expressão imunohistoquímica de Ki-67 para diferentes neoplasias malignas (adenocarcinoma - AD, carcinoma epitelial/mioepitelial - CEM e adenocarcinoma cístico - AC) originados de adenomas pleomórficos (AP), os quais são tumores benignos de glândula salivar com relativo risco para cancerização. Eles encontraram aumento significativo nos índices de Ki-67 para AD, quando comparados com os casos de CEM, de AP e de sialoadenite (inflamação de glândulas salivares maiores). Os autores encontraram

também elevação significativa nos índices de Ki-67 quando compararam os casos de AC com os de sialoadenite. Eles afirmam que altos escores de imunomarcção para Ki-67 estão geralmente associados a comportamento agressivo dos tumores, principalmente nos tumores malignos de glândula parótida e que o diagnóstico patológico está sempre de acordo com o padrão proliferativo celular das lesões.

Em trabalho realizado em 2007, de Aguiar et al. pesquisaram aspectos clínicos, histológicos e moleculares que estivessem correlacionados com a recorrência precoce local do carcinoma escamocelular oral em humanos. Entre os fatores investigados estiveram presentes: hábito de fumar e consumo de álcool por parte do paciente; modalidade de tratamento realizado; e expressão de Ki-67, de caderina-E, de p53 e de bcl-2 avaliadas por imunohistoquímica nas amostras de massa tumoral coletadas. Dos fatores acima citados, a expressão elevada do Ki-67 e o consumo excessivo de álcool foram os únicos que estiveram relacionados com a recorrência da doença. Os autores afirmam que as características biológicas do tumor, como expressão aumentada de Ki-67, podem identificar pacientes de alto risco, ajudam na compreensão de discrepâncias clínicas e redefinem o plano de tratamento, o qual deverá ser mais agressivo.

Kim et al. (2007) testaram, em carcinomas escamocelulares (CEBs) de língua removidos terapêuticamente de 60 pacientes, a validade do Ki-67 e de uma proteína indutora de hipóxia (carbônico-anidrase IX – CA IX) como fatores indicadores de prognóstico, uma vez que as alterações induzidas pelo ambiente hipóxico tornam as células com fenótipo mais agressivo. Os níveis de expressão das proteínas foram correlacionados com os índices de sobrevida e morbidade dos indivíduos operados. Expressão elevada de Ki-67 foi encontrada tanto nos pacientes que apresentaram um baixo índice de sobrevivência quanto naqueles que sobreviveram, mas que apresentaram baixo período

livre da doença. Foram considerados de alto risco aqueles pacientes com altos índices de Ki-67 e de CA IX, e de médio risco os que apresentaram altos níveis de uma das duas proteínas apenas, uma vez que estas foram compreendidas como fatores independentes no estabelecimento do prognóstico. Os autores concluíram que o Ki-67 pode ser incluído num modelo prognóstico para representar o potencial proliferativo das células em CEB de língua.

2.3 ANGIOGÊNESE TUMORAL

Ao lado da capacidade de proliferação, a potência em gerar novos vasos figura como aspecto biológico da maior relevância na tumorigênese porque existe a necessidade de sustentação nutricional das células tumorais (Weidner, 2004). Tumores precisam de novos vasos para sobreviver e crescer além do tamanho de cerca de um milímetro, pois com essas dimensões a nutrição por difusão apresenta-se já inviabilizada. Por isso, o crescimento e posterior disseminação à distância é um processo que depende principalmente de fatores envolvidos na neoformação de vasos, sendo que sem estes as células tumorais entram em degeneração e morrem. Desta forma, tumores com elevada presença de vasos estão comumente associados com comportamento biológico mais agressivo e prognóstico ruim (Alberts et al., 2004).

A formação de novos vasos tem sido considerada um componente do crescimento tumoral tão importante a ponto da diminuição induzida do suprimento sanguíneo, que pode ser utilizada sem colocar em risco os vasos sanguíneos pré-existentes nos tecidos saudáveis adjacentes, ser utilizada como alternativa importante no tratamento de diversos tipos de câncer (Weidner, 2004). A terapia consiste basicamente em bloquear fatores de

crescimento angiogênicos ou adicionar moléculas inibidoras de angiogênese (Abdollahi et al., 2005; Li et al., 2005; Lee et al., 2007).

Os vasos sanguíneos podem se formar nos tecidos humanos mediante dois mecanismos distintos: vasculogênese e angiogênese. A vasculogênese se caracteriza pela diferenciação de células precursoras denominadas angioblastos em células endoteliais e formação *de novo* de um sistema vascular primitivo, enquanto a angiogênese se dá pelo crescimento de novos capilares a partir de vasos sanguíneos maduros pré-existentes (Risau, 1997).

Há alguns anos acreditava-se que no adulto a formação transitória ou permanente de novos vasos em situações fisiológicas e patológicas ocorresse apenas por angiogênese, já que classicamente a vasculogênese se constituía num processo associado à formação do sistema vascular primitivo do embrião (Risau & Flamme, 1995).

Atualmente, a caracterização na circulação sanguínea de células progenitoras endoteliais vindas da medula óssea em animais adultos e a demonstração da incorporação das mesmas em focos de neovascularização fisiológica e patológica indicam a participação da vasculogênese na neovascularização que ocorre na vida adulta (Asahara & Isner, 2002). No entanto, tratando-se exclusivamente de formação tumoral maligna, o crescimento e posterior disseminação à distância se dão mediante angiogênese e os complexos processos envolvidos no curso dessa lesão dependem principalmente de fatores envolvidos nessa modalidade de formação vascular (Alberts et al., 2004).

Tanto na angiogênese fisiológica (p.ex. no ciclo reprodutivo) quanto na patológica (p.ex. inflamação e câncer) existe um brotamento dos novos vasos sanguíneos a partir de extensões da vasculatura existente como resultado de um balanço entre fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos. Esta regulação envolve a interação entre células

endoteliais; células periendothelias, como as musculares lisas e os pericitos; células do estroma e matriz extracelular e é traduzida por sinais positivos e negativos liberados por essas células (Carmeliet, 2004).

Nos tumores, moléculas reguladoras de angiogênese são produzidas e difundidas principalmente pelas próprias células neoplásicas, por leucócitos, mastócitos ou por macrófagos presentes ao redor do tumor. Os principais fatores pró-angiogênicos tumorais são: o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator de crescimento transformante- β (TGF β), a interleucina-8 (IL-8) e o fator de necrose tumoral- α (TNF α). Entre os fatores anti-angiogênicos tumorais os mais importantes são a trombospondina, a angiostatina e a endostatina (O'Reilly, 1997; O'Reilly et al., 1997; Yuan et al., 2000; Masuda et al., 2007).

Inicialmente fatores pró-angiogênicos, em particular o VEGF, ativam as células endoteliais estimulando sua proliferação e migração (Lee et al, 2007). A partir da ação de metaloproteinases, que irão realizar degradação da matriz extracelular e concomitante liberação de fatores de crescimento antes seqüestrados na matriz, como o fator de crescimento de fibroblastos básico (FGFb), a angiopoetina-1 e o próprio VEGF, as células endoteliais finalmente migram. Em seguida estas células organizam-se formando estruturas tridimensionais em forma de tubo, as quais posteriormente adquirem um lúmen (Carmeliet, 2004; Rundhaug, 2005).

Posteriormente, a partir da secreção pelas células endoteliais de fatores pró-angiogênicos tardios como o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o TGF- β , ocorre recrutamento e proliferação de células periendothelias, que realizam a estabilização dos vasos recém-formados e inibem a proliferação das células endoteliais, estimulando sua diferenciação e sobrevivência (Al Rawi et al., 2005). Mais

especificamente, PDGF está envolvido no recrutamento de pericitos e TGF- β participa da maturação dos vasos (Cleaver & Melton, 2003).

Resumidamente, os eventos relacionados à angiogênese tumoral envolvem: a) a dissolução da membrana basal; b) migração de células endoteliais em direção ao tumor; c) canalização para formação de rede vascular; e d) amadurecimento do leito capilar com formação de membrana basal, sendo que os fatores reguladores de angiogênese podem estar relacionados a um ou várias etapas desse mecanismo (Kumar et al., 2005).

Diversos estudos até o momento têm sido conduzidos no intuito de descrever biologicamente e esclarecer como a angiogênese está implicada na progressão tumoral. Yuan et al., (2000) afirmam que a IL-8 induz a quimiotaxia e proliferação de células endoteliais e é um fator angiogênico tumoral tão importante a ponto de poder ser utilizada como indicador de prognóstico em câncer de pulmão.

Pugh & Ratcliffe (2003) ressaltam a ação reguladora do fator induzido por hipóxia (HIF), um fator transcricional que regula fatores de crescimento-chave na angiogênese tumoral como o próprio VEGF.

Kimura et al. (2007) afirmam que a presença de interleucina-1 β (IL-1 β) em células tumorais de pulmão induz a produção de potentes fatores angiogênicos, VEGF e a IL-8, o que favorecer o crescimento do tumor.

Por outro lado, Vairaktaris et al. (2007), investigando polimorfismos nos genes que controlam a expressão da IL-1 β em indivíduos portadores de CEB, não encontraram qualquer correlação com características histopatológicas dos tumores ou hábitos culturais dos pacientes que fossem predisponentes à doença. Eles afirmam que provavelmente a IL-1 β , embora produza fatores relacionados à angiogênese tumoral, não apresenta papel primordial no desenvolvimento do CEB.

Segundo alguns autores, a vascularização do CEB, principalmente nos mais agressivos, pode ser realizada também através da formação de canais vasculares delineados por células tumorais, o que é chamado de ‘mimetismo’ ou mediante a junção de células endoteliais com células tumorais, o que é chamado ‘mosaico’. Esses canais, que foram observados inicialmente em melanomas, se constituem num requinte de disseminação tumoral porque permitem que o tumor sofra perfusão através dos tecidos independentemente da angiogênese tumoral (Maniotis et al., 1999; Liu et al., 2008).

Embora a angiogênese não possa ser medida diretamente em tumores humanos, mesmo em lesões frescas (Schor et al., 1998), estudos que associaram diretamente alta densidade microvascular com mau prognóstico para alguns tipos de câncer demonstram que a vascularidade de um tumor é bom indicativo do seu potencial angiogênico e isso pode ser aferido através de cortes histológicos (Horak et al., 1992; Gasparini & Harris, 1995; Gasparini et al., 1998; Artese et al., 2001; Vora et al., 2003).

A presença de vasos sanguíneos nos tecidos pode ser avaliada pela identificação e quantificação de estruturas marcadas com anticorpos como Fator VIII ou de *von Willebrand* (F VIII), CD31 ou CD34, que apresentam reatividade para células endoteliais. O F VIII e o CD31, embora incapazes de distinguir novos vasos formados por angiogênese tumoral daqueles pré-existentes que foram incorporados num tumor invasivo, permitem a interpretação de sua marcação como angiogênese induzida pelo tumor (Schor et al., 1998).

O Fator de *von Willebrand* desempenha um importante papel na hemostasia, promovendo a adesão das primeiras plaquetas ao subendotélio vascular, além de transportar o F VIII na circulação sanguínea, sendo que o antígeno relacionado ao F VIII se localiza exclusivamente no endotélio vascular (Maeda et al., 1995; Tan & Ginsburg, 2008).

Siitonen et al. (1995) e Martin et al. (1997) avaliaram o quanto a medida de angiogênese a partir da marcação com três diferentes anticorpos estaria relacionada fatores prognósticos em 77 e 174 casos de câncer de mama, respectivamente. Siitonen et al. (1995) encontraram bom desempenho apenas para o CD34 e F VIII, embora não tenha correlacionado nenhum dos dois com achados clinico-patológicos dos pacientes. Martin et al. (1997), por sua vez, encontraram boa correlação entre as marcações realizadas com CD31, CD34, F VIII e o índice de sobrevivência dos pacientes, sendo que o CD31 apresentou a menor correlação entre os três, e o F VIII correlação mais significativa com o índice de morte. Os autores alertam para o fato do CD31 não marcar exclusivamente células endoteliais, o que pode diminuir sua confiabilidade.

Weidner et al. (1991) avaliaram a correlação entre angiogênese identificada pelo F VIII e metástase em 49 casos de câncer de mama e encontraram resultados significativos tanto para contagem dos vasos por campo quanto por densidade microvascular. Os autores afirmam que a medida de vascularização obtida em aumento de 200X a partir das regiões mais vascularizadas do tumor pode ser utilizada para identificar pacientes em estágio inicial da doença que precisam de terapia agressiva.

Shpitzer et al. (1996) investigaram em 25 CEBs de língua a relação entre a angiogênese tumoral marcada pelo F VIII e presença de metástase. Eles realizaram contagem por campo, num aumento de 250X e encontraram forte correlação, afirmando que nessas condições a vascularização é forte fator preditivo de metástase nodal.

Em 1997, Gleich et al. estudaram a angiogênese em 31 CEBs através de medida de densidade microvascular pelo F VIII e CD31 em aumento de 400X e compararam os resultados com aspectos clínicos de progressão do tumor. Eles observaram correlação entre densidade microvascular e o estágio da doença, mas não em relação ao índice de

sobrevivência dos pacientes, afirmando que a agressividade do tumor não pode ser predita pela medida de vascularização.

Artese et al. (2001) avaliaram em 52 casos de CEB a microdensidade vascular aferida pelo F VIII em aumento de 400X e compararam os dados obtidos com achados clínico-patológicos dos pacientes. Eles encontraram forte correlação entre quantificação dos vasos e graduação histológica, bem como presença de metástase linfonodal.

Vora et al. (2003) no intuito de estabelecer fatores prognósticos para CEB de língua, avaliaram diversos biomarcadores, incluindo o F VIII, em relação a parâmetros de prognóstico. Eles realizaram contagem por campo, utilizaram aumento de 400X e afirmam que a contagem de microvasos se correlaciona significativamente com o índice de recidiva da doença.

Guttman et al. (2004) estudaram a expressão do F VIII e CD34 em 23 casos de CEB de língua no intuito de avaliar a validade prognóstica do grau de vascularização. Eles realizaram contagem por campo num aumento de 400X e acreditam que a vascularização é um bom indicativo da agressividade desses tumores, embora tenham encontrado resultados significativos apenas com o CD34.

Em 2007, Fernández et al. realizaram estudo longitudinal realizado ao longo de 5 anos e avaliaram angiogênese mediante marcação pelo CD31 em aumento de 400X em 43 pacientes portadores de CEB de língua. Eles não encontraram correlação entre DMV e os índice de recorrência e sobrevivência dos pacientes, e afirmam que a medida de angiogênese não se apresenta como fator prognóstico para o CEB.

Calvin et al. (2007) avaliaram, através de marcação pelo F VIII em aumento de 200X, a importância da DMV como fator prognóstico para prever grau de recorrência em pacientes portadores de carcinoma de cabeça e pescoço submetidos a radioterapia. Eles

afirmam a DMV não esteve correlacionada com índice de recidiva, presença de metástase ou sobrevivência dos indivíduos, e, portanto não apresenta valor prognóstico para a doença estudada.

Liu et al. (2008) analisaram a presença de vasos delineados por células tumorais mediante dupla-marcação com o CD34 e pan-citoqueratinas, em relação a aspectos clínico-patológicos em 112 amostras de CEB oral e observaram forte correlação entre a quantidade de formação dessas estruturas e índice pobre de sobrevivência dos pacientes. Logo os autores afirmam que os vasos delineados por células tumorais podem ser marcadores potentes de prognóstico para a doença.

2.4 INFLAMAÇÃO E TUMORIGÊNESE

A ligação existente entre inflamação e câncer é antiqüíssima. Há mais de um século o cientista Rudolf Virchow observou a presença de um infiltrado leucocitário nas proximidades de um tumor maligno e sugeriu o elo entre os dois temas (Allavena et al., 2008). Embora não tenha sido foco de atenção na pesquisa sobre o câncer durante longo período, esses fenômenos têm recebido confirmações moleculares e genéticas em relação à sua importância para a progressão da doença.

2.4.1 Macrófagos

Nos últimos anos houve considerável aumento no interesse para a função das células intersticiais nos tumores, sobretudo nas malignidades, onde a presença de células inflamatórias parece ter um significado biológico bastante relevante (Coussens & Werb, 2002). Em particular, macrófagos constituem o maior componente celular do estroma

tumoral e funcionam como reguladores negativos ou positivos do crescimento do tumor (Mantovani et al., 1992). As próprias células tumorais estimulam a constituição desse estroma, o qual secreta diversos fatores de crescimento, proteases e citocinas no qual os macrófagos estão ambientados (Ueno et al., 2000).

2.4.1.1 Origem, morfologia e função

O termo ‘macrófago’ foi utilizado pela primeira vez há mais de um século por um pesquisador Prêmio Nobel chamado Metchnikoff, para descrever células fagocitárias amebóides observadas após a introdução de um espinho de rosa em larvas de estrela-do-mar (Tauber & Chernyak, 1989). Atualmente, esta célula é compreendida como a principal responsável por diversos processos metabólicos, imunológicos e inflamatórios, tanto em condições fisiológicas quanto em condições patológicas (Naito, 2008).

Presentes em quase todos os animais, os macrófagos nos humanos são originados a partir de células-tronco hematopoiéticas em estágios tardios de órgãos hematopoiéticos e medula óssea do feto. Estas posteriormente originam os monócitos, células circulantes no sangue que se dirigem aos tecidos através de um processo de migração denominado diapedese (Takahashi et al., 1996).

A função dos macrófagos em relação à defesa do hospedeiro inclui: fagocitose de patógenos; apresentação de antígenos a linfócitos T; citotoxicidade antimicrobiana; expressão de citocinas, fatores de crescimento, componentes do complemento, enzimas e prostaglandinas; além de promoção do remodelamento tecidual. Todas estas ações estão intrinsecamente relacionadas à presença de diversos receptores na sua superfície: para moléculas de adesão, para imunoglobulinas, para proteínas do sistema complemento, para citocinas pro-inflamatórias e para moléculas da parede celular. Aqueles relacionados à sua

atividade de limpador de detritos reconhecem e fagocitam o patógeno, podendo matá-lo mediante diversos mecanismos (Naito, 2008). Outras importantes funções realizadas pelos macrófagos incluem a ingestão e digestão de eritrócitos senescentes, imprescindível para o metabolismo da bilirrubina, principal produto do metabolismo da fração heme da hemoglobina (Naito, 2008); e o mecanismo de involução fisiológica observado no útero pós-parto (Brandes & Anton, 1969).

2.4.1.2 Macrófagos e progressão do câncer

Geralmente, quando adequadamente ativados, os macrófagos apresentam importante ação contra células tumorais, desde que seus precursores, os monócitos circulantes, se liguem às células endoteliais para migração mediante expressão de moléculas próprias de adesão, como a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1). Os níveis de expressão da ICAM-1 estão estreitamente relacionados com a adesão de monócitos do sangue periférico às células endoteliais, pois funcionam como um contra-receptor de algumas integrinas, a exemplo da β -2 integrina, que é uma molécula de adesão dependente de cálcio que liga as células à matriz extracelular (Bernasconi et al., 1991; Webb et al., 1991). Embora a expressão da ICAM-1 nas células tumorais se relacione com a progressão e desenvolvimento de tumores, seu papel no câncer oral ainda não foi totalmente estabelecido (Huang et al., 2000).

Com relação à infiltração dos macrófagos em direção ao tumor para realização de sua atividade tumoricida, existe uma regulação mediada por diversas citocinas e quimiocinas. Estas últimas constituem uma grande família de citocinas estruturalmente homólogas que estimulam, entre outros, a migração dos leucócitos do sangue para os

tecidos e são produzidas constitutivamente por várias células nesses tecidos (Abbas & Lichtman, 2005). Entre as quimiocinas, destaca-se a MCP-1/CCL2 (proteína quimiotática de macrófagos), que é produzida não apenas pelas células tumorais, mas por fibroblastos, células endoteliais e pelos próprios monócitos. O gene MCP-1 ativa nos monócitos sua função citostática para células cancerosas, enquanto que o gene MCP-1 *transfer* eleva o potencial metastático de células tumorais (Nakashima et al., 1995).

Macrófagos associados ao tumor (MATs), no entanto, têm sido alvo de atenção por estarem pouco relacionados com a destruição de células tumorais localmente (Ziegler-Heitbrock, 1988). Ao contrário, suas funções se dão curiosamente em prol do tumor (Lang et al., 2007), entre as quais estão incluídas: supressão da imunidade adaptativa, expressão de fatores de crescimento e de metalo-proteinases, além de promoção da angiogênese (Polverini & Leibovich, 1984; Polverini & Leibovich, 1985; Coussens & Werb, 2002; Allavena et al., 2008).

Os MATs apresentam-se atraídos em direção ao tumor por mecanismos semelhantes aos macrófagos de ação citotóxica, a exemplo da própria quimiocina MCP-1/CCL2, pelo CCL5 e CCL1 (Allavena et al., 2008), o que já foi demonstrado por exemplo em modelo de câncer de mama. Estas moléculas desempenham um papel independente e aditivo porque sinais mediados através de suas vias determinam a frequência de monócitos circulantes que se acumulam ao redor do tumor (Mantovani et al., 2007).

Assim como nos macrófagos tumoricidas, não apenas quimiocinas operam a atração de futuros MATs em direção ao tumor, mas outras moléculas como o VEGF, PDGF, TGF β e o fator de crescimento de colônia de macrófagos (CSF-M) (Coussens & Werb, 2002).

Atualmente, admite-se que a capacidade de expressar programas funcionais tão distintos, e porque não dizer antagônicos, entre os macrófagos está diretamente relacionada

com o seu modo de polarização, o que os autores denominam plasticidade. Nesse sentido, de acordo com as diferentes características e formas de responder às citocinas e aos produtos microbianos, bem como de desempenhar suas funções nos tecidos, os macrófagos são subdivididos em M1 e M2, refletindo a nomenclatura Th1 e Th2 (Allavena et al., 2008).

Os chamados M1 ou macrófagos clássicos são considerados potentes efetores na defesa no organismo contra patógenos e células neoplásicas malignas. Eles possuem alta capacidade de apresentar antígenos e grande habilidade citotóxica, tanto para células que ingeriram microrganismos quanto para as advindas de tumores, principalmente pela expressão de intermediários tóxicos na sua superfície, como o TNF e o óxido nítrico (ON). Níveis elevados de produção de IL-12 e IL-23 nessas células contribuem para a ativação de células T tipo 1, mesmo sabendo-se que a secreção de ON claramente diminui a imunidade mediada por células T. Ademais, esses macrófagos expressam receptores opsônicos quando estimuladas pelo interferon-gama (IFN- γ), além de estimularem a resposta imune adaptativa e produzirem altos níveis de diversas citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-23 e TNF) (Zhang et al., 2007; Allavena et al., 2008; Pina et al., 2008).

Os macrófagos M2, ao contrário, apresentam baixa capacidade de apresentar antígenos, são capazes de suprimir a imunidade adaptativa mediada pelas células T tipo 1 e apresentam poucas propriedades anti-inflamatórias. Sua ação na defesa do organismo inclui apenas a morte e encapsulamento de parasitas, promoção de angiogênese, remodelamento tecidual e reparo cicatricial. A ativação dos macrófagos M2 se dá pela liberação das IL-4 e IL-13 além de sinais específicos do microambiente tecidual, como baixos níveis de IL-12 e elevados de IL-10 (Allavena et al., 2008).

Entre os fatores que podem induzir um monócito a se diferenciar num macrófago M2, destacam-se a PG2, o TGF- β , a IL-6, a IL-10 e o CSF-M, todos expressados no

microambiente tumoral ou pelas células neoplásicas e pelos próprios macrófagos, como é o caso da IL-10 e do TGF- β . O CSF-M possui ação tanto para monócitos quanto para macrófagos re-circulantes, promovendo diferenciação e sobrevivência destes (Allavena et al., 2008).

Levando-se em consideração as demonstrações em diversos estudos de que os MATs são capazes de desenvolver papéis específicos no microambiente tecidual neoplásico, como diminuição da resposta imune adaptativa e promoção de angiogênese, além de promover remodelação tecidual e supressão da resposta inflamatória, os MATs estão mais próximos do ponto de vista fenotípico e funcional aos macrófagos M2 (Allavena et al., 2008).

A função imunomoduladora nos tecidos desempenhada pelos MATs corresponde especificamente a uma diminuição da secreção de IL-12 [inibidora de células T-Th1 e estimuladora das células matadoras naturais (NK)] e aumento na secreção de PGE2 (inibidora da proliferação de células T e da diferenciação de células dendríticas; supressora da atividade antitumoral das células NK e dos macrófagos), de TGF- β e de IL-10 (ativadora de linfócitos B, inibidora de células T-Th1 e supressora da própria função dos macrófagos) (Mantovani et al., 2007; Lang et al., 2007).

Vairaktaris et al. (2008) e Yao et al. (2008) pesquisaram em indivíduos portadores de CEB, polimorfismos nos genes que controlam a expressão da IL-10, uma interleucina imunossupressora produzida pelos MATs. Eles encontraram forte associação entre os polimorfismos e progressão ou risco para desenvolvimento da doença. Segundo os autores uma explicação seria o fato de a IL-10 contribuir para a não-execução da imunidade anti-tumoral.

MATs são capazes de induzir a formação de novos vasos através da expressão de moléculas pró-angiogênicas potentes, como o VEGF, PDGF TGF- β e quimiocinas angiogênicas como o CCL2, que pode ser produzida por células tumorais ou estromais e cujos níveis estão associados ao acúmulo de MATs. Nas regiões mais hipóxicas do tecido, onde eles preferencialmente se acumulam, o programa pró-angiogênico inclui a expressão de outros fatores, como TNF- α , β -FGF e IL-8 (Bonizzi & Karin, 2004; Mantovani et al., 2007).

A cascata angiogênica relacionada à atividade dos TAM está relacionada também com fatores solúveis por eles liberados, a exemplo do fator de crescimento derivado de macrófagos (MDGF), que estimula a síntese de DNA e a proliferação de subtipos celulares de origem mesenquimal não-linfóide, como células endoteliais, fibroblastos e células musculares lisas (Polverini & Leibovich, 1985).

Ademais, os MATs mediam angiogênese tumoral através da produção de um fator angiogênico chamado timidina-fosforilase, que promove a migração de células endoteliais *in vitro* (Azenshtein et al., 2002).

A linfoangiogênese tumoral depende principalmente da ação de moléculas como VEGF-C e VEGF-D, sendo que os MATs são capazes de produzir o VEGF-C que permite a disseminação das células tumorais, caracterizando a metástase linfática (Schoppmann et al., 2006). Schoppmann et al. (2002) afirmam ainda que a expressão de um fator quimiotático para monócitos, o VEGF-A, além de recrutar monócitos circulantes, age na indução da linfoangiogênese ao lado dos VEGF-C e VEGF-D.

Adicionalmente, MATs apresentam uma ação pró-angiogênica indireta através da amplificação de moléculas angiogênicas produzidas diretamente pelas células tumorais (Mantovani et al., 2007).

Kimura et al. (2007) afirmam que a elevação nos níveis de IL-1beta influi sinergisticamente na angiogênese em células tumorais de pulmão, já que existe produção induzida pela IL-1beta tanto de fatores angiogênicos, como VEGF e a IL-8, quanto de MCP-1, que atrai macrófagos para o tumor, os quais liberam MDGF promovendo assim a proliferação de células endoteliais. Inclusive, a relação entre presença de macrófagos e densidade microvascular já foi bem estabelecida há algum tempo em tumores, a exemplo dos adenomas do trato gastrointestinal. (Chapple et al., 2002).

Com o objetivo de estabelecer marcadores moleculares de prognóstico para câncer de mama, Ueno et al. (2000) investigaram em 151 casos, pelo método ELISA, a expressão de diversos fatores solúveis, incluindo IL-1, IL-4, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , IFN- γ , VEGF e MCP-1, correlacionando esses achados com aspectos clínicos dos pacientes biopsiados e expressão imunohistoquímica de macrófagos. Eles encontraram correlação significativa entre quantidade de infiltrado macrofágico e níveis de IL-8, VEGF e TNF- α , os quais são fatores pró-angiogênicos. Altos índices de expressão da MCP-1, que estava presente tanto nos macrófagos quanto nas células tumorais, estiveram presentes nos pacientes que apresentaram recorrência precoce da doença.

Em 2003, Chen et al. investigaram através de RT-PCR e imunohistoquímica a interação entre o infiltrado macrofágico e células tumorais de pulmão cultivadas, no intuito de esclarecer se este infiltrado celular específico influenciaria a expressão de IL-8 e a angiogênese tumoral, já que a IL-8 é um importante fator pró-angiogênico. Eles observaram que a densidade macrofágica esteve significativa e positivamente correlacionada com a expressão da IL-8 e com a contagem de vasos, bem como negativamente relacionada com a sobrevivência dos pacientes. Outro achado importante deste trabalho foi uma exacerbada

expressão de IL-8 pelas células tumorais após interação com os macrófagos, o que pôde ser suprimido mediante administração de drogas anti-inflamatórias.

Marcus et al. (2004) avaliaram, através de um estudo tipo *coorte* prospectivo, o impacto dos MATs na agressividade tumoral e sobrevivência de 20 pacientes portadores de carcinoma oral e orofaríngeo. Foram quantificados presença e índice de migração dos macrófagos através de *tissue microarray* e imunohistoquímica. Diversos dados clínicos e patológicos foram analisados e comparados com os resultados obtidos. Os autores concluíram que elevação no número de macrófagos esteve diretamente associada a uma maior agressividade dos tumores analisados, uma vez que altas taxas de infiltração macrófágica estiveram presentes nos pacientes acometidos por metástase linfonodal ou expansão extracapsular do tumor através dos linfonodos em T1 e T2, dois fatores prognósticos extremamente negativos. Eles sugerem que o componente crítico para estes resultados é a indução de angiogênese realizada pelos macrófagos.

Em 2008, Soeda et al. investigaram por imunohistoquímica a relação existente entre a presença de MATs e fatores prognósticos para adenocarcinoma uterino, como Ki67, invasão e densidade vascular, além de graduação de malignidade. Eles encontraram correlação significativa entre a presença dos macrófagos, principalmente dos localizados nas margens do tumor, com o índice de sobrevivência dos pacientes, microdensidade vascular, estágio, graduação histológica e proliferação intratumoral. Os autores afirmam que, embora os MATs não se apresentem como fator prognóstico independente para a doença estudada, apresentam sem dúvidas importante papel biológico na progressão desta.

O papel dos MATs na progressão do câncer pode estar relacionado também com a modulação da atividade do factor nuclear kappa B (NF- κ B), um fator de indução de transcrição regulador da resposta inflamatória e mediador de tumorigênese. O NF- κ B

apresenta ativação constitutiva em células cancerosas desencadeada por moléculas pró-inflamatórias como a IL-1 e o TNF, e é capaz de induzir alterações celulares relacionadas a um fenótipo mais agressivo, como: angiogênese, auto-suficiência em relação aos sinais de crescimento, insensibilidade aos sinais inibidores, resistência aos sinais pró-apoptóticos, imortalização, invasão tecidual e metástase (Hanahan & Weinberg, 2000).

Evidências do envolvimento dos macrófagos com a disseminação do câncer e metástase podem ser obtidas pela observação: da indução de expressão de metaloproteinase de matriz (MMP) por essas células na dependência do TNF- α em câncer de mama (Hagemann et al., 2004); da forte relação entre a presença de CSF-1 e potencial metastático em câncer de mama (Lin et al., 2001); e da importância da presença de IL-1 β para desenvolvimento de metástase em câncer de mama (Snoussi et al., 2005).

Ademais, macrófagos também influenciam proliferativamente os tecidos porque são principais secretores de cicloxigenase-2 (COX-2) no componente intersticial, passando a expressar esta proteína após sofrerem ativação pela IL-1 e pelo TNF- α , (Huang et al., 2000).

2.4.2 Cicloxigenase-2 (COX-2) e câncer

A COX-2 é atualmente considerada uma oncoproteína, uma vez que a elevação na sua expressão já foi demonstrada em vários tumores malignos sólidos de naturezas variadas e correlacionada diretamente com prognósticos ruins (Cadden et al., 2007). Suas ações imunossupressora e pró-tumoral serão descritas adiante após algumas considerações a respeito de sua estrutura e biologia.

2.4.2.1 Aspectos bioquímicos e biológicos

Ciclooxigenase (COX) é uma glicoproteína dimérica integral da membrana encontrada predominantemente no retículo endoplasmático, que contém uma fração heme e está relacionada à catalisação do primeiro estágio de oxidação do ácido aracdônico (Smith et al., 1994). Este é um ácido graxo constituinte da membrana celular precursor da síntese de eicosanóides (prostanóides), os quais são produzidos nos tecidos e levam à formação especificamente das prostaglandinas da série 2 (PGE, PGD2, PGF2, PG12), tromboxano e determinados leucotrienos; todos mediadores bioquímicos potentes envolvidos na inflamação, infecção, lesão tecidual, modulação do sistema imune e agregação plaquetária. O ácido aracdônico se une aos fosfolipídeos das membranas das células por meio de ligações éster, e é liberado por hidrólise a partir de estímulos fisiológicos e patológicos de várias causas, determinando o metabolismo da enzima ciclooxigenase (Vane et al., 1998; Smith et al., 2000).

As prostaglandinas (PGs) são sintetizadas em várias células e tecidos e, além de estarem relacionadas com processos fisiológicos como fertilização, ovulação, manutenção da função renal, agregação plaquetária e arterialização, funcionam como reguladores endógenos da inflamação, febre e dor (Tanabe & Tohnai, 2002). Também denominada endoperoxidossintase de PGs, sintase de PGs, prostaglandina H2 sintase ou PG G/H sintase, a COX apresenta, entre outras, importante ação envolvendo processos patológicos como Doença de Alzheimer, eventos trombóticos cardiovasculares, reumatismo e câncer (Tanabe & Tohnai, 2002).

Ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2) são as duas isoformas presentes nos mamíferos da enzima COX, as quais são codificadas por genes distintos e consistem num longo canal estreito e hidrofóbico com massa molecular de

aproximadamente 71 kDa. Embora sejam proteínas estruturalmente distintas, possuem um local activo semelhante para o seu substrato natural (Vane et al., 1998).

Enquanto a COX-1 é expressa de forma constitutiva na maioria dos tecidos e apresenta funções homeostáticas como proteção do epitélio superficial gástrico, vasodilatação no rim e produção de tromboxano pelas plaquetas; a COX-2 é produzida constitutivamente apenas em rim de ratos adultos, sendo, portanto, indetectável em condições fisiológicas nos humanos (Vane et al., 1998; Tanabe & Tohnai, 2002). De um modo geral, sua indução ocorre apenas em resposta a fatores pró-inflamatórios: IL-1, INF γ , ativador de plasminogênio tecidual, TNF- α ; hormônios: hormônio folículo-estimulante, hormônio luteinizante e estrogênio (Tanabe & Tohnai, 2002); fatores de crescimento: fator de crescimento epidermóide (EGF) (Dubois et al., 1994), PDGF e FGF; oncogenes: v-Src e v-Ras (Tanabe & Tohnai, 2002); endotoxinas bacterianas; e agentes mitogênicos, como os ésteres de forbol (Smith et al., 2000).

A estrutura genética da COX-2 foi elucidada em 1991 e revela, antes da clivagem da seqüência sinalizadora, 604 aminoácidos que correspondem a 60% da seqüência do polipeptídeo humano COX-1 (Kujubu et al., 1991; Tanabe & Tohnai, 2002). A regulação da sua expressão genética envolve mais de um elemento regulatório e engloba: CRE, NF-IL-6, NF- κ B, e E-BOX. O elemento responsivo ao AMP-cíclico (CRE) exerce sua atividade promotora e atua como um dos mais importantes elementos na regulação da expressão de COX-2. Entre todos os motivos protéicos que podem estar possivelmente presentes regulando a expressão genética, NF-IL6 é o único fundamental para a região promotora de COX-2. O NF- κ B apresenta dois ligantes na região promotora de COX-2, e tem sido identificado como o mais essencial de todos os elementos na regulação desse gene. O elemento E-BOX do gene da COX-2 possui capacidade de se ligar a proteínas

transcricionais regulatórias, mas apresenta-se como elemento importante apenas no gene da COX-2 de ratos (Tanabe & Tohnai, 2002).

A indução da expressão genética de *COX-2* está relacionada principalmente a três cascatas de proteíno-cinases ativadas por mitógeno, que são: ERK1/2, p38 e JNK/SAPK. Também chamadas de MAP-cinases, estas cinases de proteínas podem agir de forma independente ou em conjunto e necessitam, para que a ativação seja completa, da fosforilação de uma treonina e de uma tirosina, separadas por um único aminoácido (Minden & Karin, 1997; Alberts et al., 2004). Para que a expressão de *COX-2* seja induzida, p38 e JNK/SAPK recebem como estímulos ativadores: citocinas inflamatórias, endotoxinas bacterianas, luz ultravioleta, radiação ionizante, hiperosmolaridade, choque térmico ou stress oxidativo; enquanto que ERK1/2 apresenta-se preferencialmente ativado por fatores de crescimento ou oncogenes, a exemplo do v-Ras e do v-Src (Minden & Karin, 1997; Tanabe & Tohnai, 2002).

2.4.2.2 COX-2 e progressão do câncer

Em neoplasias de células de origem não-epitelial, pouco se sabe a respeito da expressão de *COX-2* (Sheehan et al., 2003). No entanto, em tumores epiteliais a *COX-2* apresenta-se com expressão aumentada em diversos tipos, incluindo os do trato gastrointestinal (Williams et al., 1999), esôfago (Yu et al., 2003) e boca (Cho et al., 2007), estando em todos os casos relacionada com a proliferação e progressão dessas lesões. Entre os efeitos tumorigênicos relacionados ao aumento dos níveis de *COX-2* nesses tecidos, estão incluídos: estimulação da mitogênese (Coffey et al., 1997), crescimento celular (Jones et al., 1999), estimulação da angiogênese (Tsuji et al., 1998), decréscimo da expressão de

E-caderina (Rao et al., 2006), resistência a apoptose (Tsuji & Dubois, 1995), aumento do potencial de invasividade, metástase celulares (Tsuji et al., 1997) e mediação da imunossupressão (Sheehan et al., 2005).

O gene de COX-2 é um importante alvo também para o gene *RAS* (Tanabe & Tohno, 2002), o qual codifica proteínas GTPases que auxiliam na transmissão de sinais da superfície celular para outras partes da célula, e são utilizadas quando receptores tirosino-cinases enviam sinais para o núcleo a fim de estimular a proliferação ou diferenciação através de alteração da expressão gênica. (Alberts et al., 2004). Uma superexpressão de *COX-2* seguida de transformação mediada por *RAS* já foi evidenciada em células epiteliais intestinais, células pulmonares e epiteliais mamárias, na qual existe não apenas um aumento na transcrição de *COX-2*, mas aumento da meia-vida do RNAm de *COX-2* (Tanabe & Tohno, 2002).

Existem evidências de que mecanismos sinalizadores envolvendo o EGF e a COX-2 regulem a proliferação celular no câncer, já que uma sinalização através do receptor do EGF (EGFR) induz, não apenas a mitogênese, mas a expressão da COX-2, resultando em fenótipo tumorigênico para as células (Coffey et al., 1997).

A COX-2 é capaz de promover angiogênese porque influencia diretamente o crescimento de células endoteliais, principalmente através da MAP-cinase ERK2, mecanismo que apresenta alguns componentes dependentes de prostaglandinas (Jones et al., 1999). Além disso, é capaz de modular a produção de fatores pró-angiogênicos como o VEGF, além de induzir a migração de células endoteliais e formação dos tubos pré-vasculares (Tsuji et al., 1998).

A E-caderina é uma proteína que faz parte de um processo crítico para a manutenção da adesividade intercelular e arquitetura tecidual, cuja perda pode ser mediada

via indução de repressores transcricionais mediada pela PGE₂, o que é realizado pela COX-2 expressa pelas células tumorais (Dohadwala et al., 2006).

Alguns estudos apontam para a ação da COX-2 ainda suprimindo mecanismos de apoptose através de uma cooperação com a oncoproteína bcl-2, uma vez que prostaglandinas derivadas de COX-2 podem induzir diretamente a síntese desta proteína anti-apoptótica (Tsuji & DuBois, 1995).

A degradação da matriz extracelular, etapa fundamental para a disseminação à distância no câncer, está relacionada à COX-2, uma vez que células que super-expressam a proteína desenvolvem o fenótipo maligno pela capacidade de ativar a MMP-2 (Tsuji et al., 1997).

A participação da COX-2 na modulação do sistema imune envolve a ação do principal produto resultante de seu metabolismo, a PGE₂, inibindo a proliferação de células T, a diferenciação de células dendríticas e suprimindo a atividade anti-tumoral de células NK e macrófagos (Goodwin & Ceuppens, 1983; Yang et al., 2003).

A expressão da COX-2 está tão fortemente correlacionada com o desenvolvimento e progressão de tumores a ponto de estar sendo utilizada recentemente como biomarcador tecidual para tumores raros que não apresentam características histológicas de benignidade e malignidade definidas. Cadden et al. (2007) avaliaram por imunohistoquímica a intensidade e proporção da expressão de COX-2 em tumores neuroendócrinos da medula adrenal e em tumores de gânglios nervosos do sistema simpático. Eles concluíram que os índices de recorrência e de metástase dos tumores estiveram associados tanto com a intensidade quanto com a proporção de expressão da enzima. Segundo os autores, diante da dificuldade em diferenciar histologicamente tumores benignos e malignos de determinada natureza, a COX-2

apresenta-se como importante marcador biológico fenotípico de seu potencial disseminante.

Yu et al. (2003) analisaram a expressão da COX-2 em displasia e carcinoma escamocelular de esôfago por imunohistoquímica ao lado do índice de proliferação celular medido pelo MIB-1, em comparação com dados clínico-patológicos dos pacientes. Eles encontraram correlação entre a proliferação e expressão da enzima, mas não obtiveram resultados significativos quando relacionaram COX-2 e achados clínico-patológicos dos pacientes. Segundo os autores, a COX-2, no carcinoma de esôfago, deve estar relacionada apenas com estágios precoces da carcinogênese.

Shibata et al. (2005) estabeleceram correlações entre aspectos patobiológicos dos tecidos, como índices de apoptose pelo TUNEL, de proliferação celular pelo Ki67 e de controle do ciclo celular pela p53, e a expressão de COX-2 em CEB de humanos. Eles não encontraram correlação significativa entre expressão da COX-2 e índice de proliferação celular ou presença da p53.

Shibata et al. (2005) avaliaram em humanos a expressão de COX-2 em CEB, displasias de diferentes graus e mucosa oral normal através de imunohistoquímica e *Western Blot*. Eles raramente observaram a presença de COX-2 no epitélio normal, enquanto que nas displasias e nos carcinomas a proteína esteve sempre presente, mesmo que em intensidade e proporção variadas. Nas displasias severas a COX-2 esteve presente principalmente no citoplasma das células da camada escamosa. Nos carcinomas pouco diferenciados a COX-2 expressou-se de forma inespecífica, enquanto que nos moderadamente diferenciados esteve presente preferencialmente na periferia dos ninhos tumorais. A COX-2 apresentou-se mais expressiva nos carcinomas mais diferenciados e menos nos poucos diferenciados.

Katori et al. (2007) no seu experimento com três distintas neoplasias orais, identificaram a expressão de COX-2 no citoplasma das células epiteliais por imunohistoquímica quantitativa e relacionaram os dados obtidos com aspectos morfológicos das lesões. Foram observados altos índices de marcação para adenocarcinomas (AD) em comparação aos casos de adenocarcinoma cístico (AC), de carcinoma epitelial/mioepitelial (CEM), de adenoma pleomórfico (AP) e de sialoadenite. Foi encontrada também significância estatística para o escore de COX-2 de AC em relação ao CEM, AP e sialoadenite, bem como nos CEM quando submetidos a comparação com AP e sialoadenites. Expressão elevada de COX-2, segundo os autores, foi observada exclusivamente no componente carcinomatoso, sobretudo dos AD; e baixos escores foram encontrados nas lesões com pouco componente carcinomatoso, a exemplo do CEM, sugerindo que a COX-2 está diretamente relacionada com o padrão de transformação maligna e prognóstico das lesões.

3. OBJETIVOS

O presente trabalho apresentou como objetivo geral investigar inflamação, potencial proliferativo e angiogênese em carcinoma escamocelular de boca (CEB); e como objetivos específicos:

- 1- Examinar o padrão de expressão imunohistoquímica da proteína COX-2 no epitélio e no estroma do CEB.
- 2- Observar a distribuição de macrófagos em CEBs através de células marcadas pela proteína CD68 no estroma da lesão. Verificar se existe correlação entre a expressão estromal da COX-2 e a densidade desses macrófagos.
- 3- Avaliar o potencial angiogênico dos CEBs mediante quantificação de microvasos identificados pela expressão de um elemento estrutural do endotélio vascular (proteína Fator VIII ou *Von Willebrand Factor*). Observar se existe correlação entre a densidade microvascular (DMV) e a expressão da COX-2 ou a presença de macrófagos.
- 4- Avaliar o potencial proliferativo dos CEBs através da quantificação de células epiteliais que expressem a proteína sinalizadora de proliferação celular Ki 67. Identificar possível correlação entre este potencial e a expressão da COX-2, presença de macrófagos e DMV.
- 5- Verificar se existe relação entre o grau histológico de malignidade (OMS) dos CEBs e a expressão imunohistoquímica de COX-2, CD68, FVIII e Ki-67.
- 6- Investigar aspectos clínicos dos indivíduos que portaram os carcinomas escamocelulares de boca da amostra estudada (idade, sexo, cor da pele e localização da lesão) e relacionar esses dados com a expressão das proteínas analisadas.

4. CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

O presente trabalho se constitui num estudo de série de casos retrospectivo e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina (Hospital Universitário Clementino Fraga Filho) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (protocolo nº 141/06).

4.1. SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados 36 casos diagnosticados como carcinoma escamocelular de boca dos acervos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA); da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (Departamento de Patologia e Diagnóstico Oral da FO-UFRJ); e do Serviço de Patologia Cirúrgica (SEPAC –R Altino Serbeto de Barros, 241 Edf. Itaigara Memorial s/507, Itaigara, Salvador/BA), sendo este último um laboratório privado. A seleção foi baseada em laudos anátomo-patológicos. Por se tratarem de biópsias incisionais para diagnóstico inicial, nenhum dos pacientes havia recebido previamente tratamento quimio ou radioterápico.

4.2 EXAME HISTOLÓGICO

Os procedimentos para análise histológica foram realizados no Laboratório de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia (FOUFBA). Para tanto, cortes medindo 5µm de espessura foram obtidos em micrótomo e corados pela técnica hematoxilina-eosina (H/E). A análise histomorfológica foi realizada

por um patologista experiente, que procurou descrever os aspectos mais representativos das lesões, bem como graduá-las.

A graduação histológica foi realizada baseada na classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), que define os carcinomas escamocelulares orais como: *in situ*, bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pouco diferenciado (Barnes et al., 2005). Os parâmetros utilizados para a classificação dos tumores incluíram: número de mitoses, grau de pleomorfismo nuclear, padrão de invasão, presença de infiltração linfoplasmocitária e grau de queratinização.

4.3 TÉCNICA IMUNOHISTOQUÍMICA

A técnica imunohistoquímica foi efetivada no Laboratório de Patologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). A partir dos blocos selecionados, foram realizados cortes de 3 µm de espessura, que foram recolhidos em lâminas previamente tratadas com material adesivo (*Superfrost Plus®/Easy Path*) e mantidas em estufa a 60°C durante 30 min. Posteriormente, seguiu-se a desparafinização em 3 banhos sucessivos de xilol, cada um de 15 min, seguida da rehidratação dos cortes em 3 banhos de 5 min cada, em séries decrescentes de etanol (95%, 85% e 70%).

Após lavagem com água destilada por 5 min seguido de banho com tampão fosfato salina (PBS - p.H 7.4) por 5 min, os cortes ficaram imersos em Cloreto de Amônio (NH₄Cl) 50 µM por 30 min, com o objetivo de inibir os resíduos aldeídicos livres. Após 2 novas lavagens em tampão PBS por 5 min, os cortes seguiram para a etapa de recuperação antigênica: embebidos em Tampão Citrato (solução ácido cítrico 0,1M e citrato de sódio 0,1M; p.H. 6.0), 3 min na panela de pressão para recuperação da COX-2; e 40 min em

Steamer (Arno®) a 95-97°C para CD68, Fator VIII e Ki-67. Depois de resfriamento em temperatura ambiente, os cortes foram lavados com água destilada por 5 min. A inativação da peroxidase endógena foi realizada com imersão dos cortes em solução composta de metanol e peróxido de hidrogênio a 3% durante 20 min. Após nova lavagem com água destilada por 5 min seguida de 2 lavagens em tampão PBS durante 5 min cada, procedeu-se o bloqueio dos sítios inespecíficos com PBS/BSA (*Bovine Serum Albumin*) 5% Triton X-100 0,5% durante 60 min. A incubação dos anticorpos primários diluídos em solução salina PBS/BSA 3% foi realizada em temperatura ambiente e, em seguida, mantidos *overnight* (OV) em geladeira (8-2°C). Os dados referentes aos anticorpos primários e suas respectivas diluições estão descritas no Quadro 01

QUADRO 01 – Anticorpos primários

Especificidade	Número de Catálogo	Clone	Diluição	Recuperação Antigênica	Marca Comercial	Tempo de incubação
Anti-COX-2 Antibody (monoclonal mouse)	160112	-	1:200	Panela de pressão	Cayman Chemical	OV
Anti-Human Macrophage, CD68 (monoclonal mouse)	M 0814	KP1	1:100	<i>Steamer</i>	DAKO	OV
Von Willebrand Factor (policlonal rabbit)	A 082	-	1:200	<i>Steamer</i>	DAKO	OV
Anti-Human Ki-67 antigen (monoclonal mouse)	M 7240	MIB-1	1:50	<i>Steamer</i>	DAKO	OV

No dia seguinte, após lavagem com tampão PBS-Tween 20 0,25% durante 5 min seguida de lavagem com tampão PBS por 5 min, foi aplicado sobre os cortes por 30 min o polímero HRP, reagente do sistema EnVision™ (DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA). Em seguida os cortes foram novamente lavados com 2 banhos, sendo o primeiro com tampão PBS-Tween 20 0,25% e o segundo com PBS, 5 min cada.

A revelação da reação foi realizada com diaminobenzidina (*DAB Plus*/ DAKO Corporation, Carpinteria, CA, USA) por 10 min, no máximo. Após lavagem com PBS-Tween 20 0,25% durante 5 min seguida de 2 lavagens com água destilada por 5 min cada, os cortes foram contrastados com Hematoxilina de *Harris* filtrada e diluída 1:3 durante 1,5 min e azulados em água corrente. Por fim, depois de sofrerem rápida diferenciação em água ácida, os cortes foram lavados em água destilada, desidratados em soluções crescentes de etanol (70%, 80% e 100%), diafanizados em três banhos sucessivos de xilol durando 10 min cada e montados com *Entellan*® (*Merck*/Darmstadt, Alemanha).

O controle positivo foi efetivado através da utilização de fragmentos teciduais de mucosa bucal normal. As amostras utilizadas para controle positivo foram obtidas de 3 pacientes que se submeteram a cirurgia de 3º molar incluso/impactado. Os fragmentos foram obtidos de áreas com ausência de inflamação clínica associada e sem história recente de pericoronarite. Para os anticorpos anti-CD68, anti Fator-VIII e COX-2 foram realizados controles positivos adicionais num fragmento de rim com reconhecida presença de inflamação.

O controle negativo foi realizado mediante substituição dos anticorpos primários por solução PBS/BSA 5% Triton X-100 0,5%.

4.4 HISTOMORFOMETRIA

A análise descritiva e quantificação dos resultados foram realizadas por um único observador previamente treinado e sem o conhecimento das informações clínicas e histopatológicas dos pacientes. Para tanto, foram realizadas fotografias num sistema de detecção constituído por microscópio de campo claro (*Nikon Eclipse E800*) acoplado a câmara digital (*Evolution VF – Media Cybernetics, USA*). As imagens, que mediam 2048 X 1536 *pixels*, foram processadas por um computador de mesa Pentium IV e analisadas utilizando-se o *software Image - Pro Plus* (Versão 4.0.1 – *Media Cybernetics, USA*). Foram considerados positivos os casos onde as células exibiam marcação imunohistoquímica na cor marrom.

4.4.1 COX-2

A avaliação da COX-2 foi realizada nas células epiteliais (parênquima tumoral) e nas células intersticiais (estroma tumoral). As fotografias das seções histológicas foram realizadas num aumento de 400X e nas áreas mais representativas da lesão. No parênquima, um mínimo de 500 e até 1000 células foram analisadas de forma semi-quantitativa, com observação de campos representativos num aumento de 400X e classificação segundo dois parâmetros: intensidade e extensão da marcação.

A intensidade de marcação para cada corte foi expressa a partir da intensidade de marcação predominante de cada caso, estabelecendo-se um escore de 1 a 4, sendo 1- marcação ausente; 2- marcação citoplasmática fraca e difusa; 3- marcação citoplasmática granular moderada; e 4- marcação citoplasmática granular forte. A extensão da marcação foi definida como a percentagem de células marcadas (0 a 100%). A multiplicação da

intensidade (de 1 a 4) pela extensão (de 0 a 100%) produzia então um escore de 0 a 400. A imunoreatividade para COX-2 foi então estabelecida como: 0- produto entre 0 e 10 (marcação desprezível); 1- produto entre 11 e 99 (marcação fraca); 2- produto entre 100 e 199 (marcação moderada); 3- produto entre 200 e 400 (marcação forte) (Chan et al., 2007).

A análise do estroma foi apenas descritiva.

4.4.2 Ki-67

Na análise do Ki-67 foram quantificadas exclusivamente células epiteliais e um mínimo de 500 e até 1000 células também foi tomado com referência para a análise de cada caso. Foram consideradas positivas as células que exibiam reatividade imunohistoquímica nuclear de qualquer intensidade. As fotografias das seções histológicas foram realizadas num aumento de 400X e nas áreas mais representativas da lesão. A fração de crescimento da neoplasia foi expressa através da porcentagem de núcleos neoplásicos imunomarcados em relação aos núcleos totais contados (Katori et al., 2007).

4.4.3 CD68

Foram considerados macrófagos as células CD68 positivas. A análise dos macrófagos associados ao tumor (MATs) foi realizada quantificando-se as células positivamente marcadas mediante visualização dos cinco campos mais confluentes (“hot spots”) em aumento de 400X. A principal contagem foi determinada a partir da média das três maiores contagens obtidas dos 5 campos. O valor da densidade macrofágica foi obtido em mm^2 (Ueno et al., 2000; Chen et al., 2003).

4.4.4 von Willebrand factor (F VIII)

Para o Fator VIII, inicialmente os tumores invasivos foram avaliados num aumento pequeno (100X) para identificação das áreas de maior vascularização. Foram então obtidas imagens de dez campos *hot spot* em aumento de 400X, e a DMV foi obtida nos cortes através da média da quantificação do número de vasos presentes nos dez campos em função da medida da área tecidual analisada em mm^2 (cada campo visualizado = 0.2 mm^2) (Högmo et al., 1999). Foram identificadas como microvasos células endoteliais individuais ou associadas positivamente marcadas, claramente separadas de microvasos adjacentes, células tumorais ou outro elemento do tecido conectivo que pudesse ser considerado um microvaso contável. A presença de um lúmen não foi necessariamente requerida para a contagem (Shptzer et al., 1996). Vasos grandes com parede muscular ou com um lúmen maior que $50\mu\text{m}$ foram excluídos (Guttman et al., 2004). Nos carcinoma “in situ” a análise de DMV foi realizada na porção subepitelial.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação entre os fatores analisados (expressão das proteínas) e os parâmetros clínico-patológicos foi calculada pelos testes X^2 e de análise de variância *One-way*. A correlação entre duas proteínas entre si foi estabelecida através do teste de correlação de *Pearson*. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5. RESULTADOS

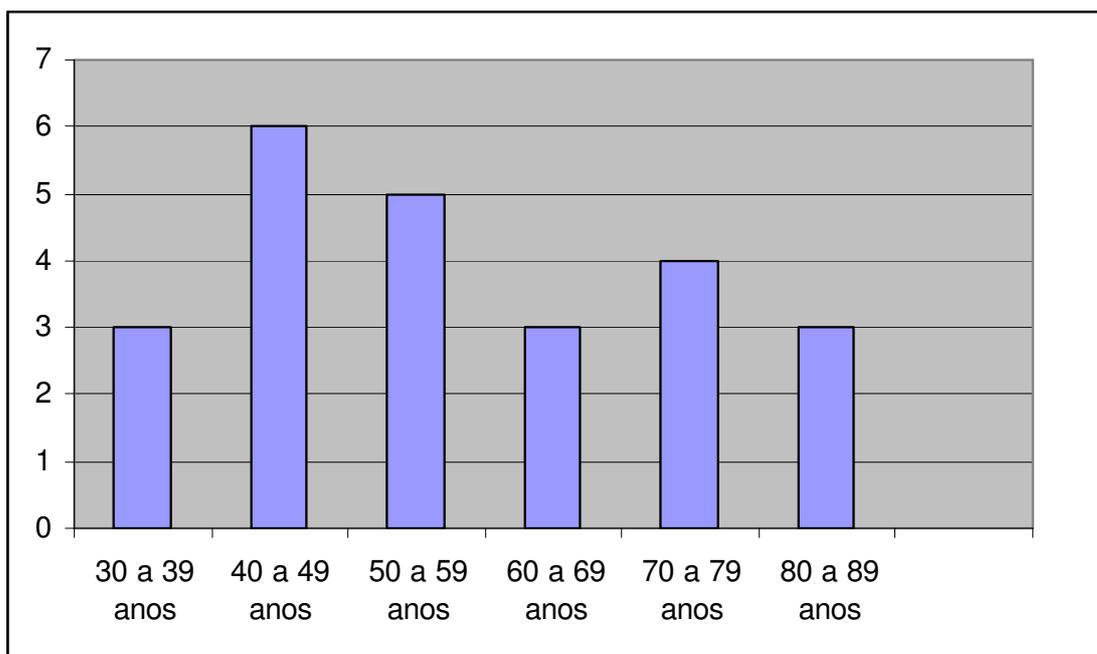
Dos 36 casos de CEB selecionados para compor a amostra, oito foram excluídos porque não apresentavam quantidade viável de tecido tumoral para análise e um foi excluído tendo em vista qualidade inadequada de marcação para todos os anticorpos, provavelmente em decorrência de problemas na fixação ou na qualidade do material obtido. Portanto, a amostra final constou de 27 casos.

5.1 Aspectos clínicos dos pacientes portadores de CEB

A média de idade dos indivíduos foi 56.56, variando de 34 a 86 anos, sendo que dos 27 casos analisados, 24 (88.88%) apresentavam este dado na ficha clínica. Na categorização da idade, observamos que três (14.52%) indivíduos eram jovens (<40 anos) e 21 (85.48%) estavam acima de 40 anos. A distribuição por faixa etária está ilustrada na Figura 1. Nossa amostra não apresentou indivíduos acima dos 90 anos de idade ou pertencentes à primeira ou segunda década de vida. Dezesesseis indivíduos (59.25%) eram do sexo masculino e 11 (40.74%) do sexo feminino. A língua apresentou-se como localização mais freqüente (7 – 25.92%), seguida do assoalho da cavidade bucal e rebordo alveolar, ambos com quatro casos (14.81%). Outras localizações incluíram mucosa jugal, palato, gengiva, lábio e região retromolar. Pele parda ou negra foi identificada em 82.35% dos indivíduos que apresentavam a informação ‘cor da pele’ na sua ficha clínica, sendo que a maior ocorrência do CEB foi observada nos pacientes faiodermas (n=9; 33,33%), seguido dos melanodermas (n=5; 18.51%) e leucodermas (n=4; 11.11%). As informações referentes

à idade, sexo, localização da lesão e cor da pele dos indivíduos foram obtidos de dados clínicos do exame anátomo-patológico e estão resumidos na Tabela 1.

Figura 1 – Distribuição dos casos de CEB na amostra estudada pela faixa etária.



5.2 Aspectos histopatológicos do CEB

De modo geral, as secções coradas em H&E mostravam proliferação de células epiteliais invadindo o conjuntivo subjacente dispostas em diversos padrões que variavam desde ninhos sólidos até células isoladas. Individualmente, as células exibiam hipercromasia nuclear, alteração da relação núcleo/citoplasma e pleomorfismo celular (Figura 2). Numerosas mitoses típicas e atípicas foram observadas em diversos casos.

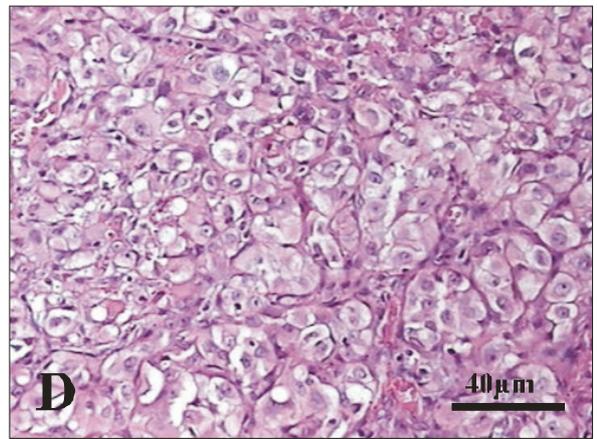
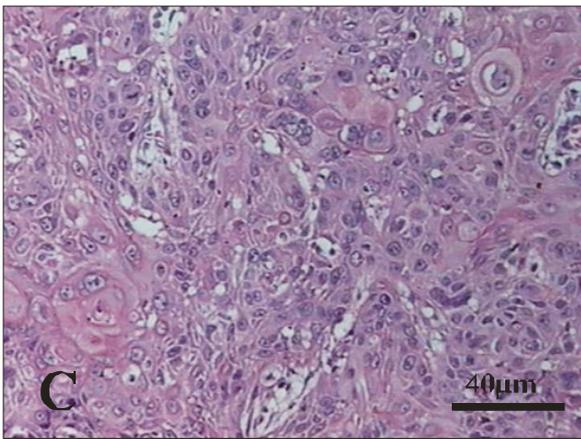
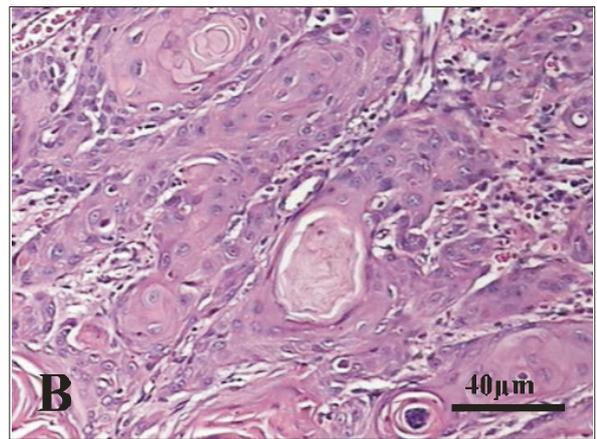
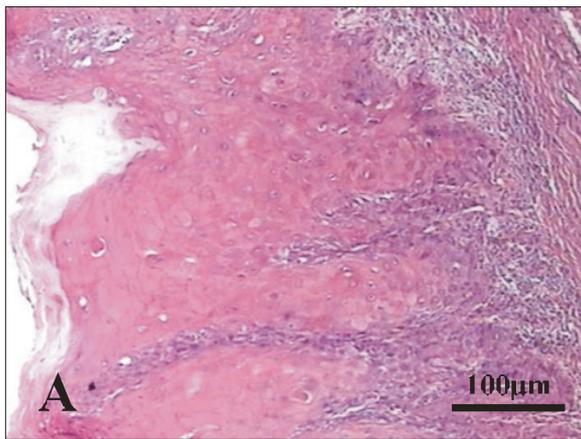
De acordo com a graduação histológica, oito (29.62%) eram ‘bem diferenciados’, nove (33.33%) ‘moderadamente diferenciados’ e seis (22.22%) ‘pouco diferenciados’ (Tabela 2). A graduação foi realizada baseada na Classificação da WHO (Barnes et al., 2005). Quatro (14.81%) tumores apresentavam características histológicas de um carcinoma ainda “in situ”.

Tabela 1 – Características clínicas referentes à amostra estudada de CEB.

Nº	SEXO	IDADE	COR DA PELE	LOCALIZAÇÃO
1	M	49	Melanoderma	Gengiva
2	F	67	Leucoderma	Rebordo alveolar
3	F	*	Faioderma	Mucosa jugal
4	F	74	Faioderma	Língua
5	F	84	Faioderma	Mucosa jugal
6	F	52	Melanoderma	Rebordo alveolar
7	M	51	Faioderma	Assoalho bucal
8	F	85	Leucoderma	Rebordo alveolar
9	F	*	*	Palato
10	M	55	Melanoderma	Região retromolar
11	M	38	*	Língua
12	M	86	*	Assoalho bucal
13	F	34	*	Língua
14	F	77	*	*
15	M	49	Faioderma	Palato
16	M	41	Melanoderma	Assoalho bucal
17	M	65	Faioderma	Mucosa jugal
18	M	68	Leucoderma	Gengiva
19	M	48	*	Língua
20	F	44	Faioderma	Língua
21	M	43	Faioderma	Gengiva
22	M	*	*	Lábio
23	M	73	Faioderma	Palato
24	M	38	Melanoderma	Língua
25	F	71	Leucoderma	Rebordo alveolar
26	M	50	*	Assoalho bucal
27	M	59	*	Língua

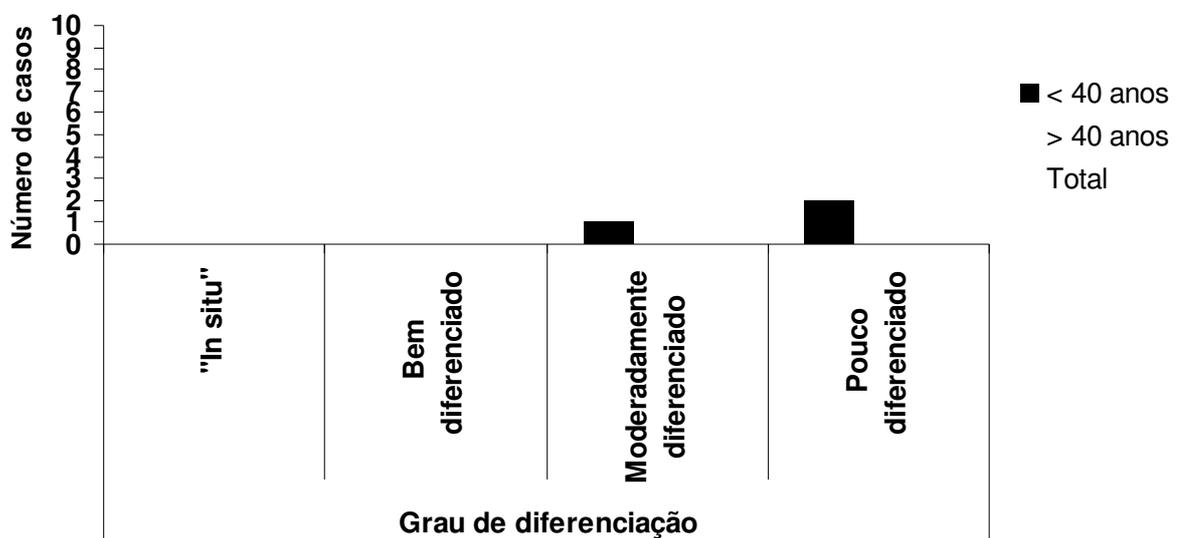
* não informado

Figura 2 Padrões morfológicos do carcinoma escamocelular de boca (CEB). **A** CEB *in situ* exibindo, além de marcante perda de estratificação, pleomorfismo celular e queratinização individual em algumas células (H/E). **B** CEB bem diferenciado exibindo numerosas pérolas córneas (H/E). **C** CEB moderadamente diferenciado exibindo pleomorfismo celular e formação de pérola córnea à esquerda da figura (H/E). **D** CEB pouco diferenciado exibindo marcante pleomorfismo celular e vacúolos para-nucleares (H/E).



Os indivíduos jovens da amostra apresentaram exclusivamente lesões pobremente (66.66%) e moderadamente diferenciadas (33.33%). Os indivíduos mais velhos, embora tenham apresentado lesões com todos os graus de diferenciação, exibiram preferencialmente lesões bem diferenciadas ou “in situ” (57.13%). Esses dados apresentaram significância estatística ($p=0.000$) (Figura 3).

Figura 3 – Distribuição dos casos de CEB da amostra estudada pela idade dicotomizada.



(One-way ANOVA: $p=0.000$)

Todos os indivíduos melanodermas da amostra apresentaram carcinomas moderadamente diferenciados e três (75%) dos quatro indivíduos leucodermas da amostra apresentaram lesão bem diferenciada.

5.3 Análise da expressão imunohistoquímica

As proteínas em estudo foram avaliadas em termos descritivos e/ou semi-quantitativos. A classificação histológica dos tumores e a média de cada um dos marcadores biológicos está demonstrada na Tabela 2.

Tabela 2 - Características histológicas dos CEBs e dados dos marcadores biológicos.

Caso	Classificação Histológica ^a	COX-2 (escore) ^b	Índice MIB-1 (%)	Densidade CD68+ ^c	DMV ^d
1	IS	3	14,14	96,50	54,04
2	IS	3	47,52	ND	42,74
3	IS	3	34,25	55,82	68,46
4	IS	0	18,89	95,29	50,65
5	BD	3	56,01	ND	28,45
6	BD	3	48,01	71,44	26,95
7	BD	1	26,12	40,23	43,02
8	BD	3	23,50	125,65	40,03
9	BD	3	31,89	73,55	34,75
10	BD	3	27,12	61,87	54,82
11	BD	0	17,35	68,08	35,26
12	BD	ND	45,17	133,87	46,68
13	MD	3	12,40	10,50	60,48
14	MD	2	36,47	70,35	67,02
15	MD	3	27,25	44,47	66,86
16	MD	3	43,95	130,34	48,21
17	MD	3	37,24	83,73	46,23
18	MD	3	30,53	95,87	40,19
19	MD	3	50,37	77,22	75,84
20	MD	0	52,43	65,31	47,28
21	MD	0	42,98	121,73	ND
22	PD	2	18,83	153,96	68,94
23	PD	3	53,85	145,70	54,02
24	PD	3	23,15	93,19	20,65
25	PD	3	20,86	71,81	ND
26	PD	ND	38,68	91,44	67,22
27	PD	3	66,15	83,76	46,42

^a IS: carcinoma “in situ”; BD carcinoma bem diferenciado; MD carcinoma moderadamente diferenciado; PD carcinoma pouco diferenciado

^b 0 marcação ausente; 1 marcação fraca; 2 marcação moderada; 3 marcação forte

^c Média do número de células positivas por área tecidual

^d Média do número de microvasos por área tecidual

DMV, densidade microvascular; ND, não determinada.

5.3.1 Ki-67

Todas as lesões exibiram expressão do Ki-67 (Figura 4). Na totalidade dos tumores estudados, em média 34.52% das células expressaram a proteína. A média da porcentagem de marcação foi 33.47% no sexo feminino e 33.90% no sexo masculino em relação ao total de células presentes. Em relação à idade categorial, a análise realizada demonstrou maior proliferação nos jovens do que nos mais velhos, com médias de porcentagem de 17.34% e 15.25%, respectivamente. Houve elevação significativa na expressão do Ki-67 nos indivíduos melanodermas em relação aos leucodermas ($p=0.055$) (Tabela 3). Expressão estatisticamente mais elevada de Ki-67 foi observada nos tumores moderadamente e pouco diferenciados em relação aos carcinomas “in situ” e bem diferenciados ($p=0.000$) (Figura 5) e nos moderadamente diferenciados em relação aos bem diferenciados ($p=0.013$), quando considerados apenas os carcinoma invasivos (Figura 6).

Tabela 3 - Distribuição da cor da pele dos pacientes pelos valores dos marcadores biológicos

Cor da pele dos pacientes	N	Índice MIB-1 (%) ^a	Densidade CD68+ ^a	DMV ^a
Faioderma	9	32,95 ± 15,12	92,2 ± 3 ,96	53,0 ± 1,67
Leucoderma	4	32,21 ± 16,91	108,0 ± 3,46	37,9 ± 0,83
Melanodema	5	33,86 ± 17,08	78,8 ± 2,43	52,2 ± 1,10
		$P=0,550^*$	$P=0,654$	$P=0,373$

^a Valores são fornecidos em médias ± DP

* Valores significativos pela análise de variância *One-way*

Figura 4 Imunoexpressão do Ki-67 em carcinoma escamocelular de boca (CEB) e controle positivo. **A** CEB *in situ* exibindo positividade nuclear em diversas camadas celulares. **B** CEB bem diferenciado exibindo raros núcleos positivos. **C** CEB moderadamente diferenciado de indivíduo melanoderma exibindo muitos núcleos positivos, além de pleomorfismo celular. **D** e **E** CEB pouco diferenciado exibindo muitos núcleos positivos, inclusive em células pleomórficas. **F** Controle positivo em gengiva sadia humana mostrando positividade restrita à camada basal do epitélio, que se apresenta altamente organizada.

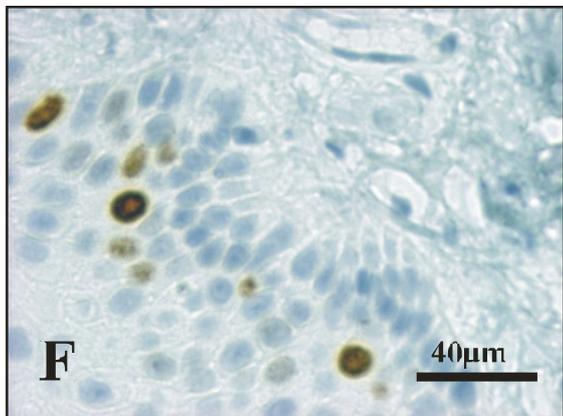
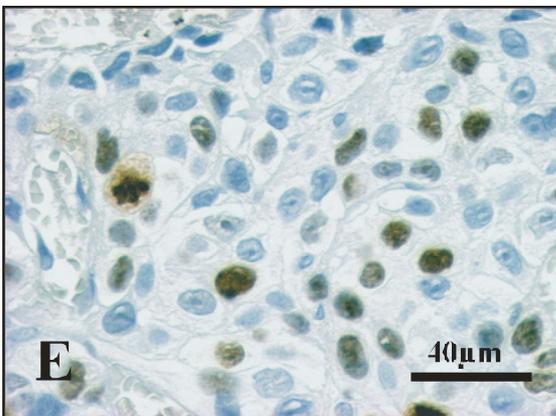
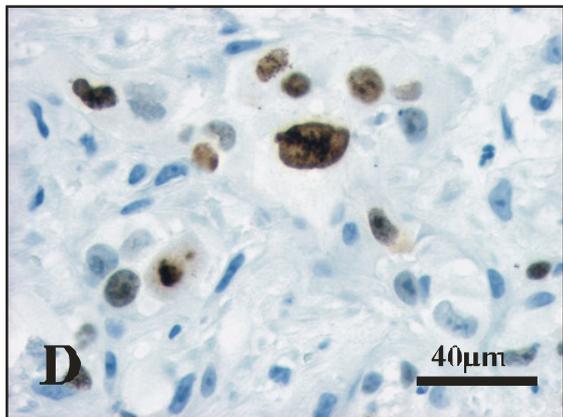
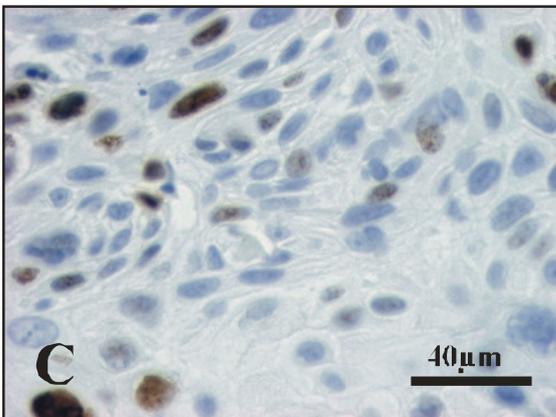
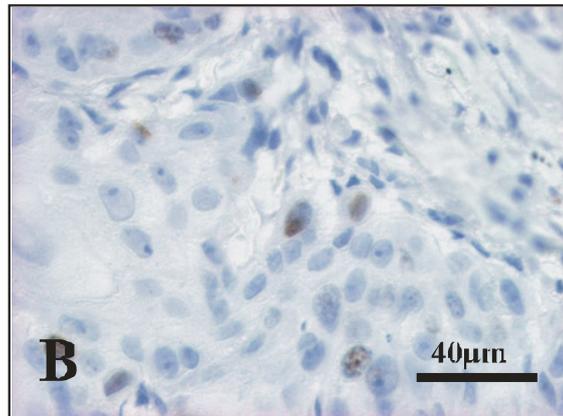
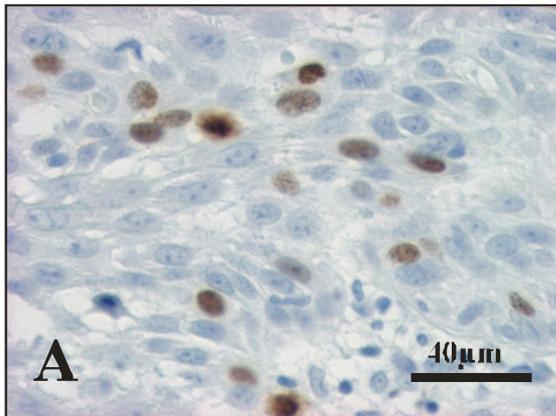
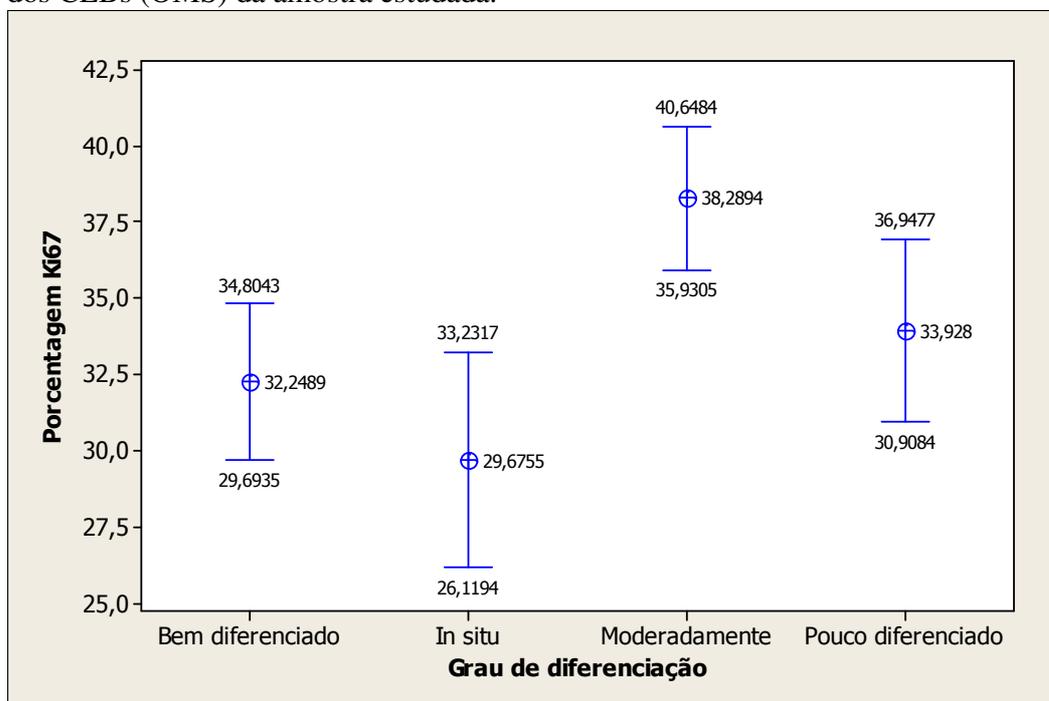
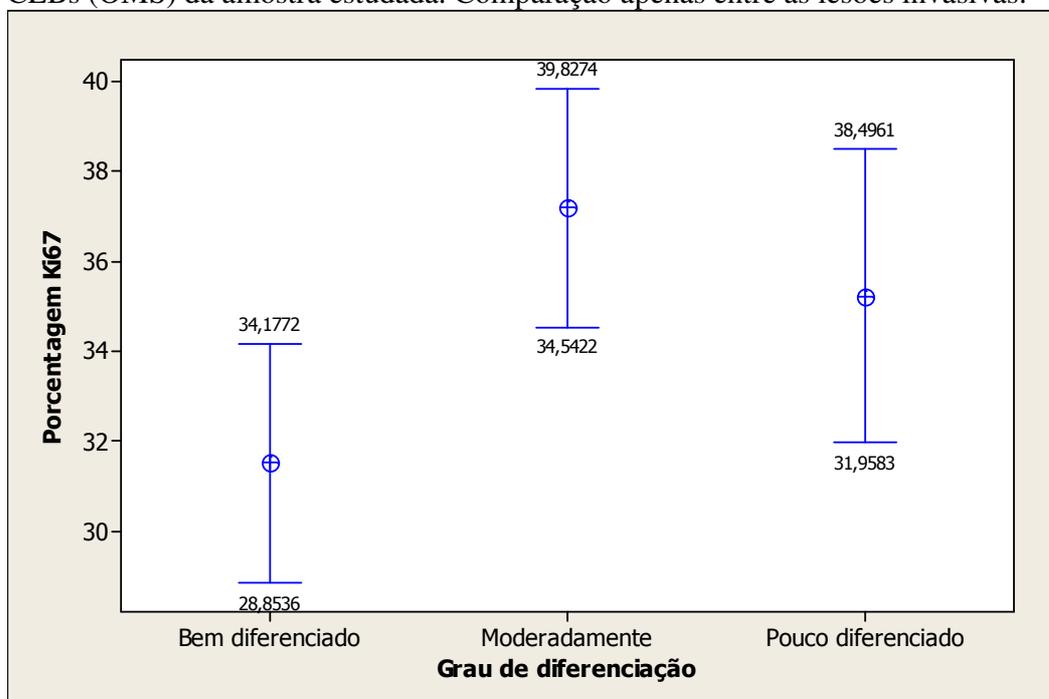


Figura 5 – Índice de proliferação medido pelo Ki-67 em relação à graduação histológica dos CEBs (OMS) da amostra estudada.



(One-way ANOVA: $p=0,000$)

Figura 6 - Índice de proliferação medido pelo Ki-67 em relação à graduação histológica dos CEBs (OMS) da amostra estudada. Comparação apenas entre as lesões invasivas.



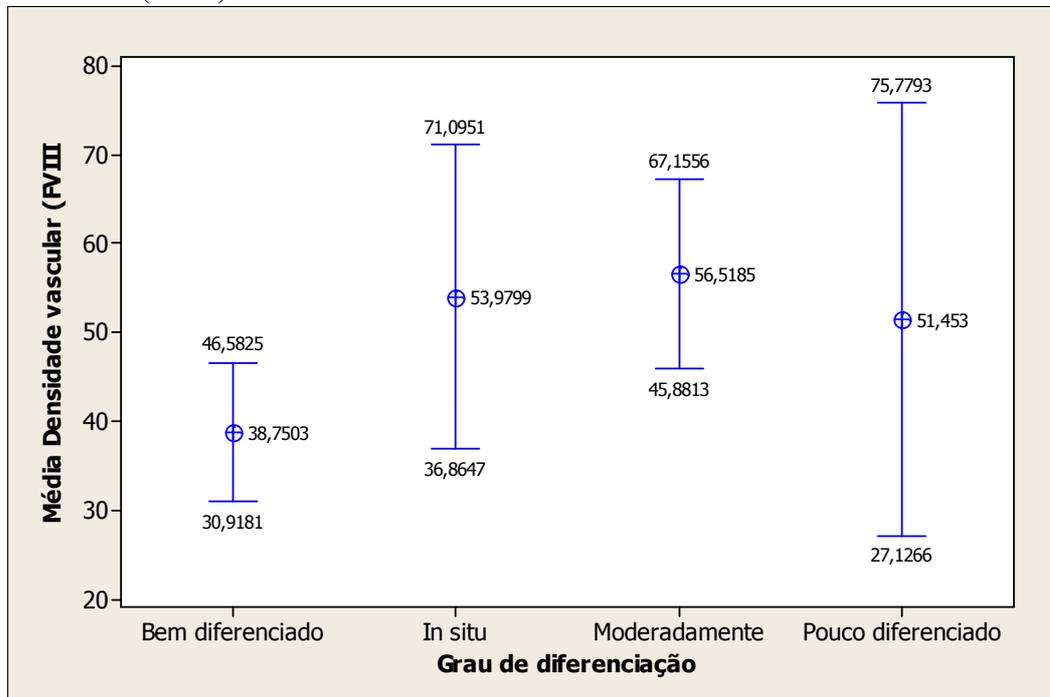
(One-way ANOVA: $p=0,013$)

5.3.2 Fator *von Willebrand* humano (Fator VIII)

Em todos os tumores estudados, a densidade microvascular (DMV) foi de 49.41 microvasos/mm². Indivíduos de sexo feminino apresentaram DMV de 53.76, enquanto que os do sexo masculino apresentaram DMV correspondente a 46.00. Nos indivíduos jovens, a DMV foi maior (57.25) do que nos mais velhos (46.47). Os faiodermas e melanodermas apresentaram DMV igual a 53.08 e 52.21, respectivamente, seguido dos leucodermas com DMV igual a 37.99. Esses dados também não apresentaram significância estatística (Tabela 3).

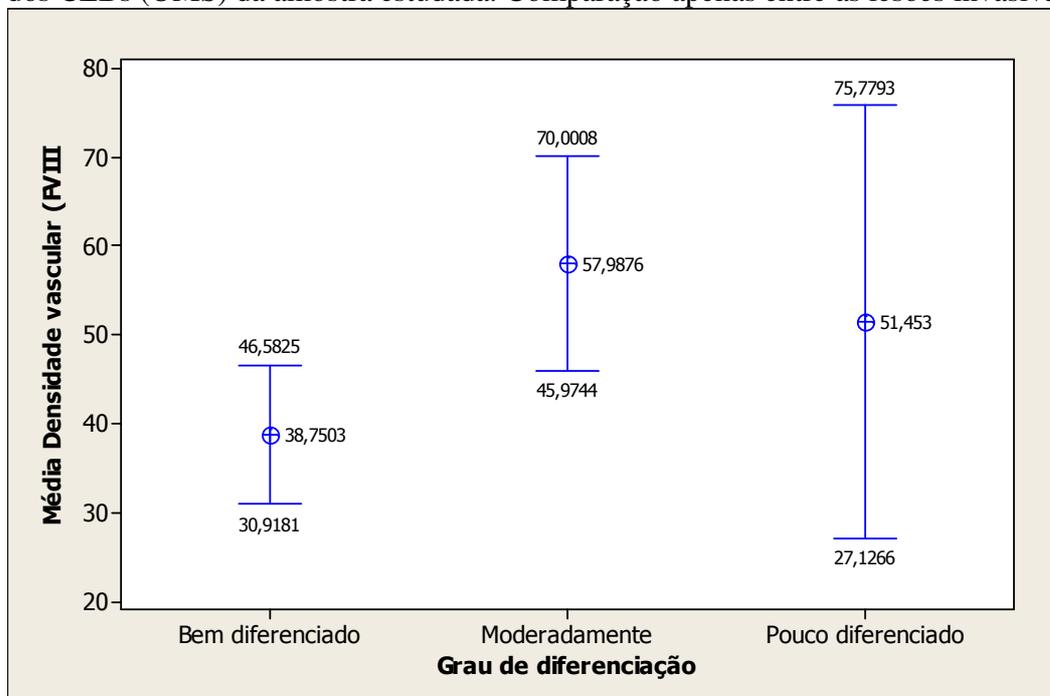
As lesões *in situ* apresentaram alta vascularização, com uma DMV igual a 53.98 e sem diferença estatística em relação aos tumores invasivos (Figura 7). Quando comparadas entre si apenas lesões invasivas, CEBs bem diferenciados apresentaram baixa vascularidade em relação aos tumores moderadamente e pouco diferenciados, com DMV correspondentes a 38.75, 56.52 e 51.45, respectivamente (Figura 8). A diferença entre esses três grupos foi estatisticamente significativa ($p=0.048$). A figura 9 representa a distribuição de microvasos no estroma das lesões estudadas.

Figura 7 – Densidade microvascular aferida pelo F VIII em relação à graduação histológica dos CEBs (OMS) da amostra estudada.



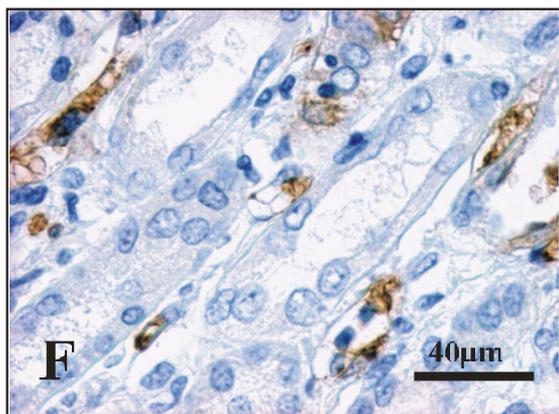
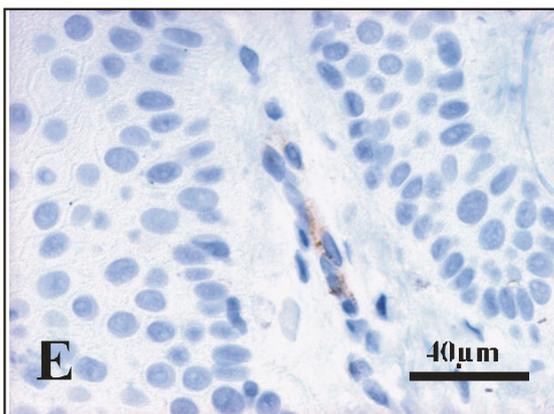
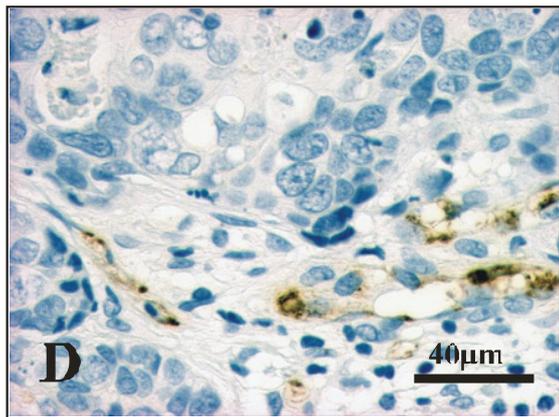
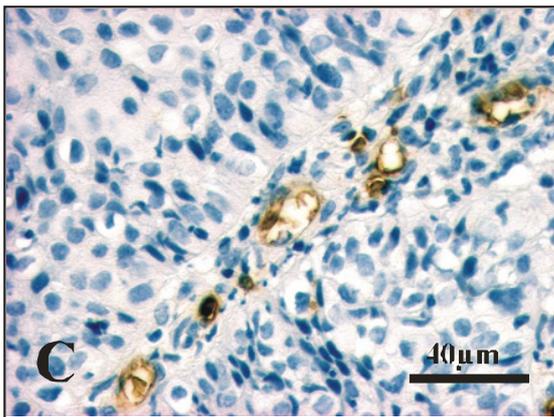
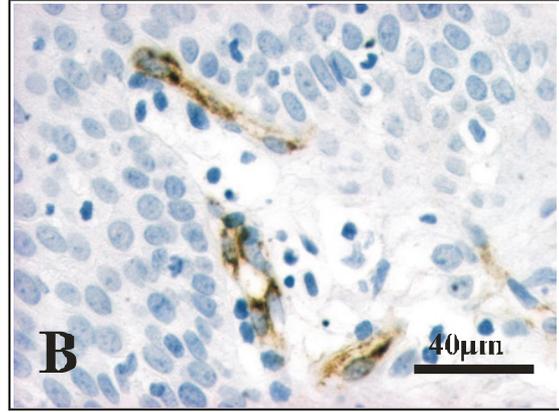
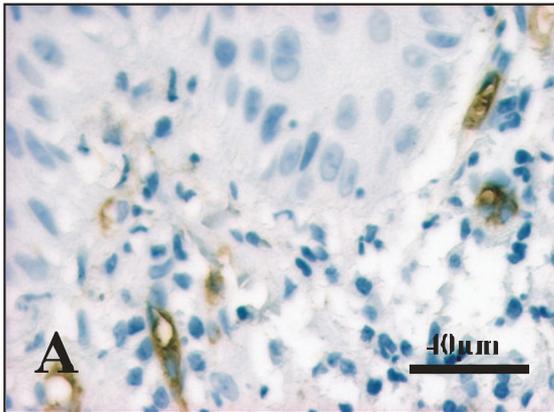
(One-way ANOVA: $p=0,069$)

Figura 8 - Densidade microvascular aferida pelo F VIII em relação à graduação histológica dos CEBs (OMS) da amostra estudada. Comparação apenas entre as lesões invasivas.



(One-way ANOVA: $p=0,048$)

Figura 9 Imunoexpressão do anti- fator *von Willebrand* humano (Fator VIII) em carcinoma escamocelular de boca (CEB) e nos controles positivos. **A** CEB *in situ* exibindo positividade no endotélio de diversos capilares da camada subepitelial. **B** CEB bem diferenciado exibindo poucos capilares no estroma tumoral. Vários capilares no estroma tumoral de CEB moderadamente diferenciado (**C**) e CEB pouco diferenciado (**D**). **E** Controle positivo em gengiva sadia humana mostrando capilar na lâmina própria. **F** Controle positivo exibindo vários capilares em biópsia humana de transplantado renal.



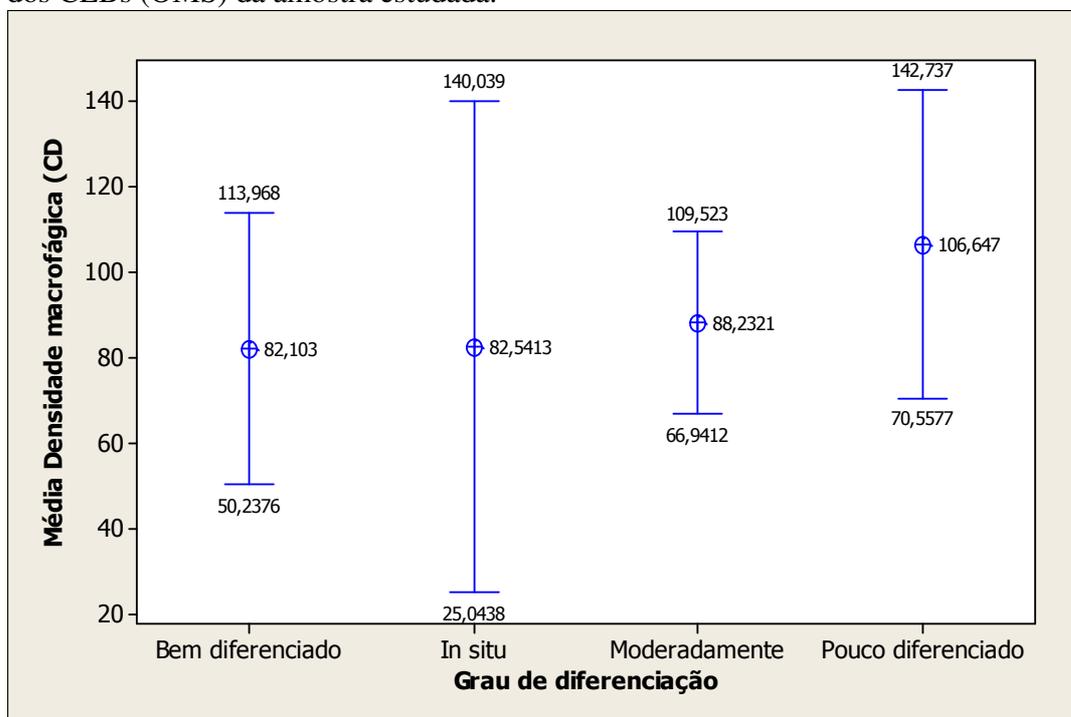
5.3.3 CD68

Macrófagos foram observados de forma constitutiva em todos os tumores, sem diferenças significativas em relação à quantidade. Os MATs variaram de 40.23 a 113.38 /mm² (média de 90.25 /mm²). A média da densidade macrofágica foi de 94.65 no sexo feminino e 87.32 no sexo masculino, sendo que indivíduos mais velhos apresentaram valores maiores (90.60) em relação aos jovens (76.19). Nos indivíduos leucodermas foram encontrados os maiores valores de densidade macrofágica, com uma média de 108.03, seguido de 92.23 para os faiodermas e 78.89 para os melanodermas. Esses dados não apresentaram significância estatística (Tabela 3).

Embora também sem significância estatística, os CEB pouco diferenciados exibiram as maiores médias de densidade macrofágica (106.65), seguido dos ‘moderadamente diferenciados’ (88.23), *in situ* (82.54) e ‘bem diferenciados’ (82.10) (Figura 10).

Com relação ao padrão de distribuição, os macrófagos apresentaram-se aglomerados ou distribuíram-se difusamente ao longo do infiltrado inflamatório próximo ao tumor (Figura 11).

Figura 10 - Densidade macrofágica aferida pelo CD68 em relação à graduação histológica dos CEBs (OMS) da amostra estudada.



(One-way ANOVA: $p=0,512$)

5.3.4 COX-2

A presença da COX-2 foi avaliada no citoplasma das células epiteliais tumorais e no respectivo estroma. A expressão da proteína foi encontrada em 82,76% dos tumores, tanto no parênquima quanto no estroma, mas predominantemente nas células epiteliais.

No parênquima, a média de marcação para COX-2 foi de 75,42% das células, onde foram observados padrões distintos em relação à intensidade e extensão da marcação imunohistoquímica, marcadamente granular (Figura 12). Não houve diferenças nos escores de expressão epitelial da COX-2 em relação sexo, idade ou cor da pele. A marcação esteve presente predominantemente de forma extensa e forte (escore 3) nas células epiteliais tumorais de todos os CEBs, independente do grau de diferenciação (Figura 13). O escore 3

de marcação da COX-2 esteve presente em três (75.00%) dos quatro carcinomas “in situ”, 5 (62.50%) dos oito carcinomas bem diferenciados, cinco (55.55%) dos nove carcinomas moderadamente diferenciados e quatro (66.66%) dos seis carcinomas pouco diferenciados. Não houve, portanto, diferença estatística nos níveis de COX-2 quando comparadas lesões com diferentes graus de diferenciação ($p=0.890$) (Figura 14). No carcinoma “in situ”, a marcação elevada se apresentou notadamente na camada intermediária. Das lesões negativas para COX-2, uma (25%) foi classificada como “in situ”, uma (25%) como ‘bem diferenciada’, duas (50%) como ‘moderadamente diferenciadas’.

Não houve quantificação da COX-2 expressa no estroma. A análise descritiva permitiu observar que a marcação esteve presente predominantemente nas células intersticiais, de forma difusa ou aglomerada (Figura 15), e ocasionalmente nas células endoteliais. Na maior parte das lesões, por se tratarem de biópsias incisionais, a região correspondente ao fronte de invasão não estava presente. Nos casos onde foi possível observar regiões superficiais e profundas do tumor, houve visível predominância de marcação no parênquima em relação ao estroma (Figura 16).

Figura 11 Padrão de distribuição de células imunopositivas para o CD68 em carcinoma escamocelular de boca (CEB) e controles positivos. Elevado número de células positivas numa distribuição difusa na camada subendotelial em CEB *in situ* (A) e no estroma tumoral de CEB bem diferenciado (B). C Elevado número de células positivas que se aglomeram no estroma tumoral de CEB moderadamente diferenciado. D CEB pouco diferenciado exibindo muitas células positivas no estroma tumoral. E Controle positivo em gengiva sadia humana mostrando ausência de células positivas na lâmina própria. F Controle positivo em rim transplantado humano exibindo diversas células positivas.

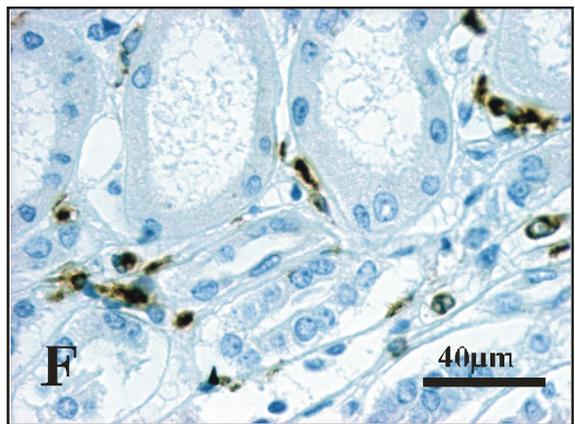
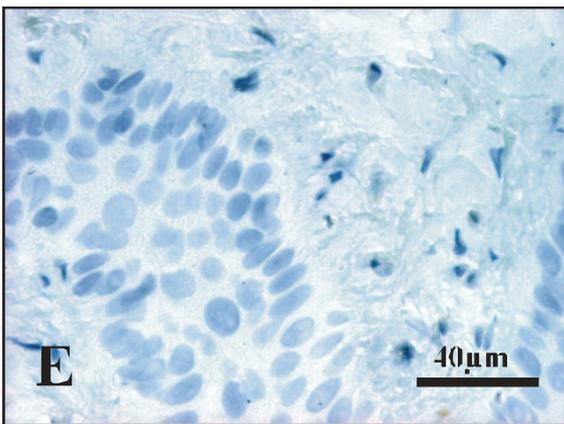
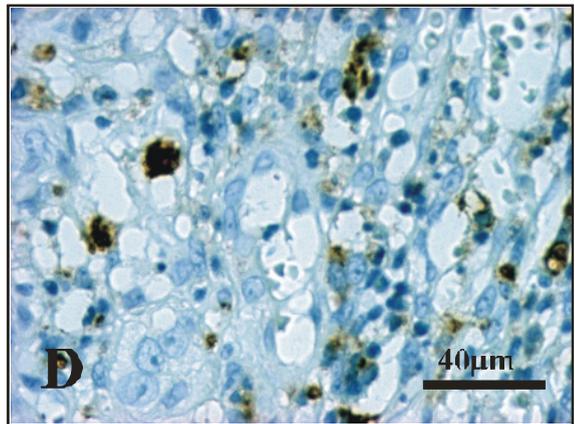
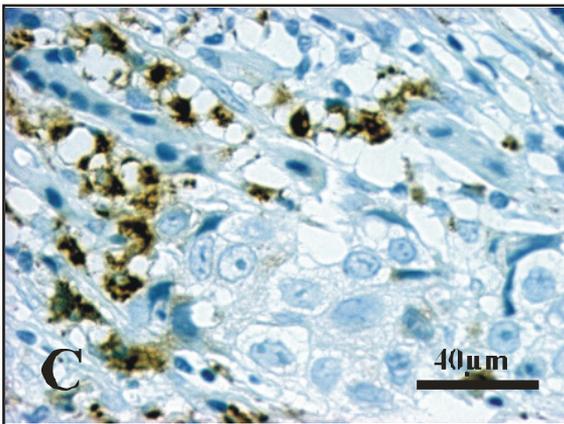
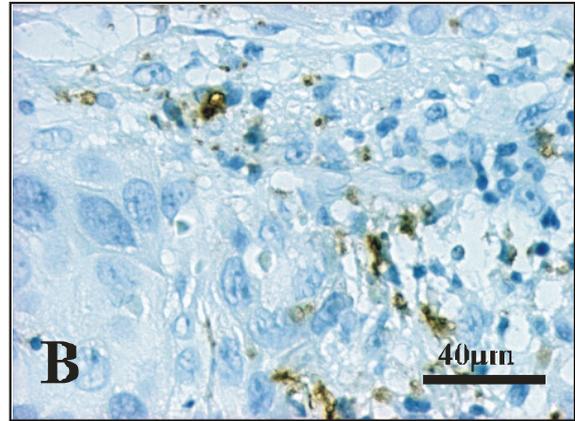
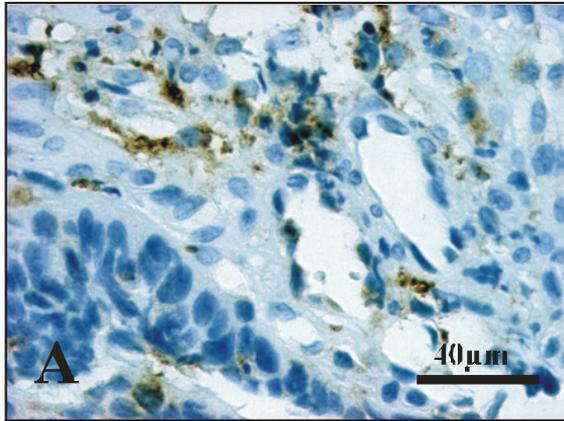


Figura 12 Padrão de imunexpressão da cicloxigenase-2 (COX-2) no parênquima de carcinoma escamocelular de boca (CEB). CEB moderadamente diferenciado exibindo marcação predominantemente fraca (**A**) e moderada, sem ocupar todo o citoplasma das células (**B**). CEB pouco diferenciado (**C**) e moderadamente diferenciado (**D**) exibindo marcação forte ocupando quase todo o citoplasma das células. Notar o padrão granular em todas as marcações.

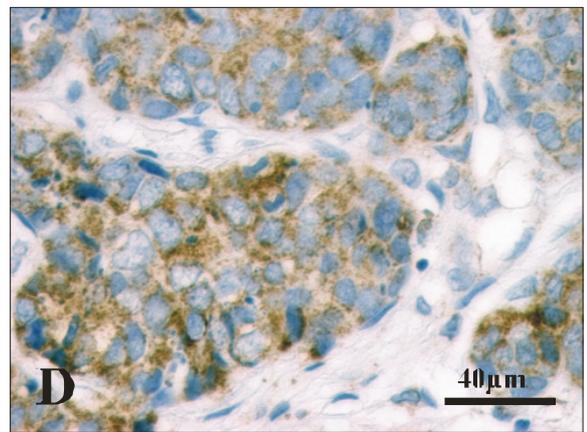
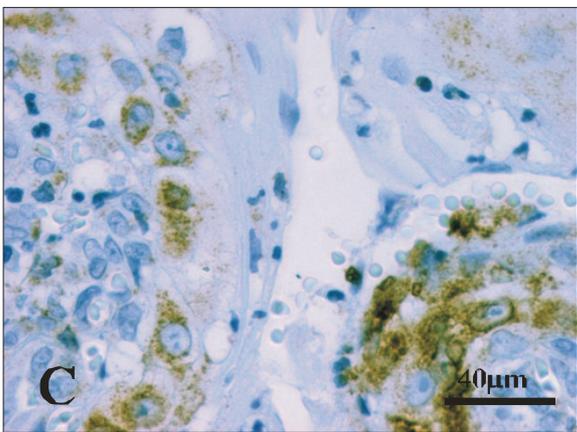
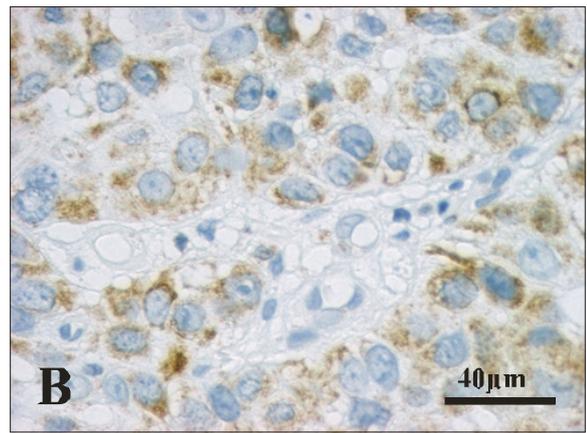
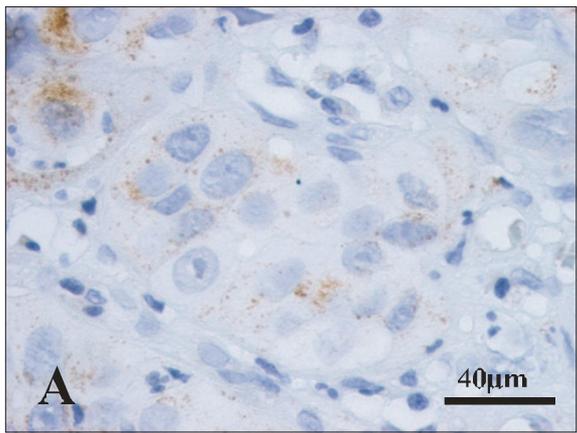


Figura 13 Elevada imunoeexpressão da cicloxigenase-2 (COX-2) no parênquima de carcinoma escamocelular de boca (CEB) *in situ* (A) e de diferentes graus de diferenciação: bem diferenciado (B), moderadamente diferenciado (C) e pouco diferenciado (D).

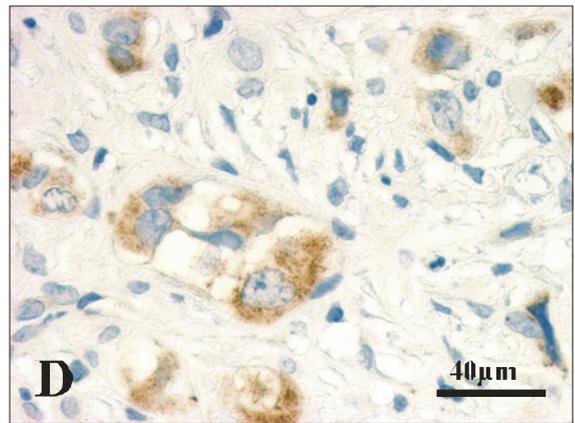
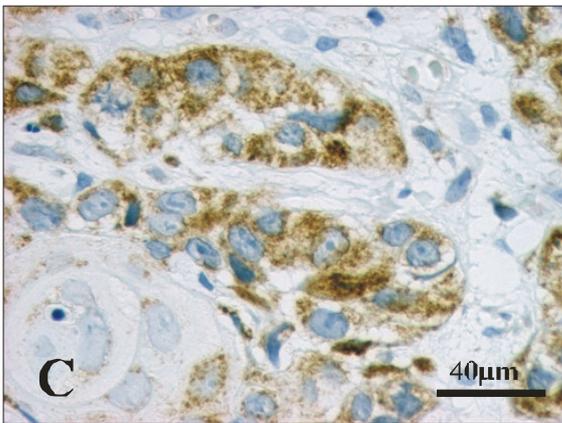
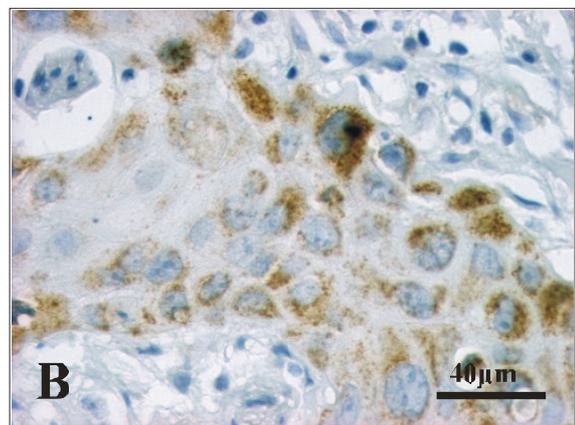
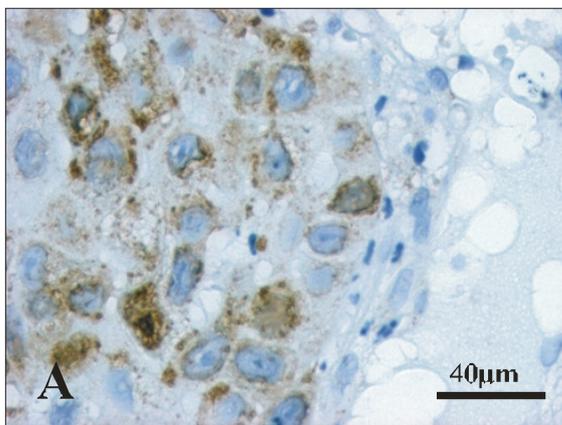
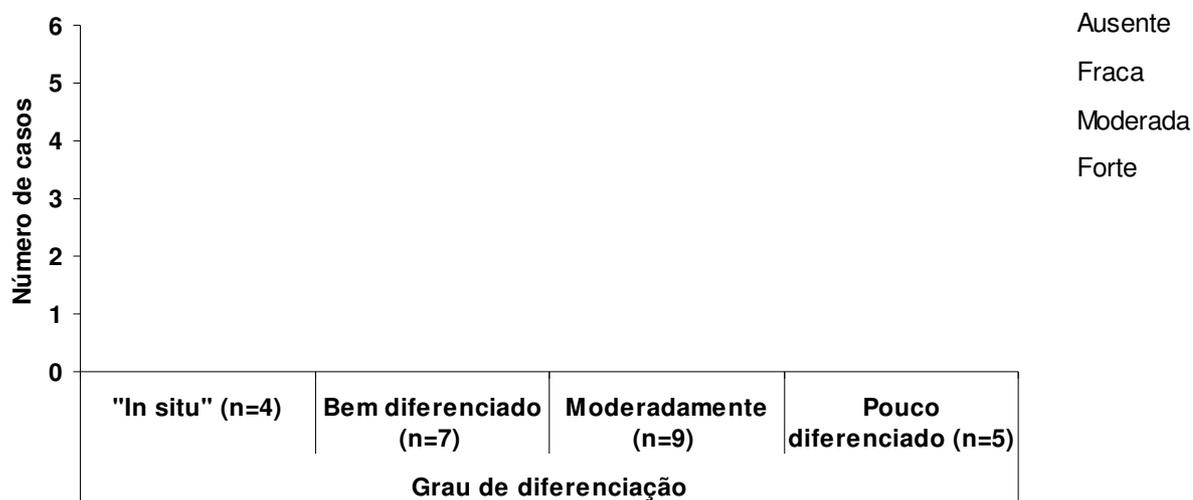


Figura 14 – Expressão da COX-2 nos casos de CEB da amostra estudada em relação à graduação histológica (OMS).



(Teste *Qui-quadrado* $p=0.890$).

5.4 Relação entre a expressão da COX-2 e a densidade de macrófagos

Em muitos casos houve identificação de macrófagos no estroma profundo, mesmo em áreas sugestivamente correspondentes a ausência de marcação para COX-2 (Figura 16). Não foi observada correlação significativa entre a expressão de COX-2 e densidade macrofágica.

5.5 Relação entre a expressão da COX-2 e DMV

Não houve correlação significativa entre a expressão de COX-2 e DMV.

5.6 Relação entre a expressão da COX-2 e proliferação celular

Não foi observada correlação significativa entre a expressão de COX-2 e o índice de proliferação celular.

5.7 Relação entre a densidade de macrófagos e DMV

Não foi observada correlação significativa entre a densidade macrofágica e a DMV.

5.8 Relação entre a densidade de macrófagos e proliferação celular

Não foi observada correlação significativa entre a densidade macrofágica e o índice de proliferação celular.

5.9 Relação entre a DMV e proliferação celular

Não foi observada correlação significativa entre a DMV e o índice de proliferação celular.

Figura 15 Padrão de imunexpressão da cicloxigenase-2 (COX-2) no estroma de carcinoma escamocelular de boca (CEB) *in situ* (A) , CEB bem diferenciado (B), CEB moderadamente diferenciado (C) e CEB pouco diferenciado (D). As figuras C e D se referem às regiões próximas à frente de invasão.

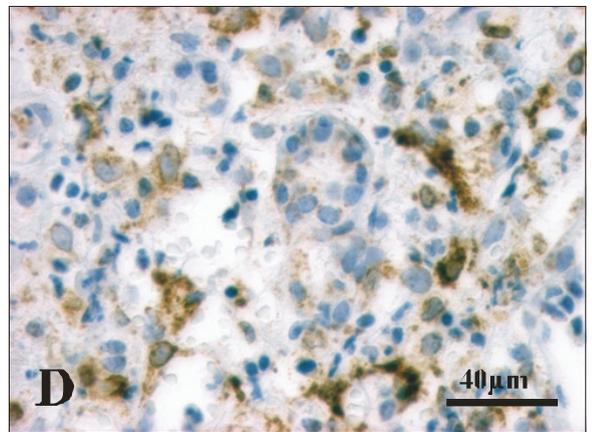
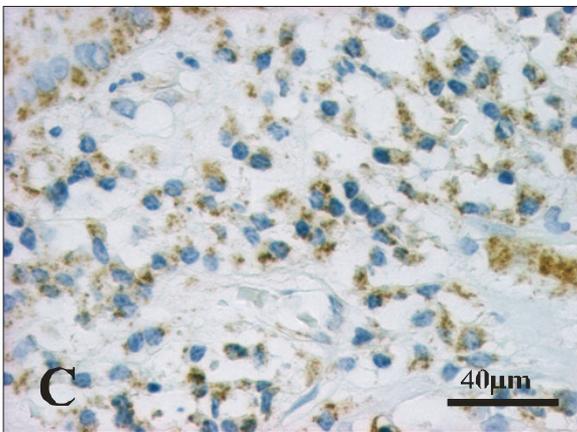
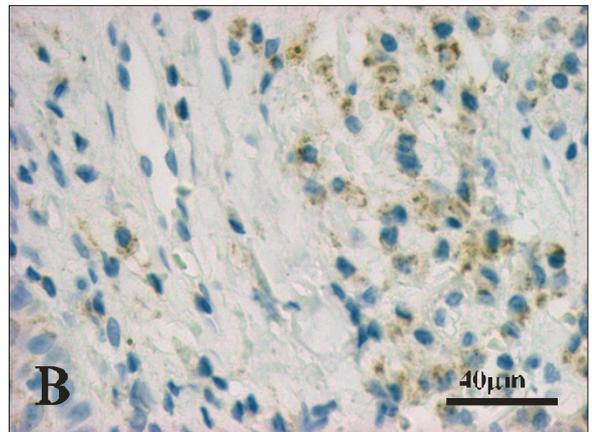
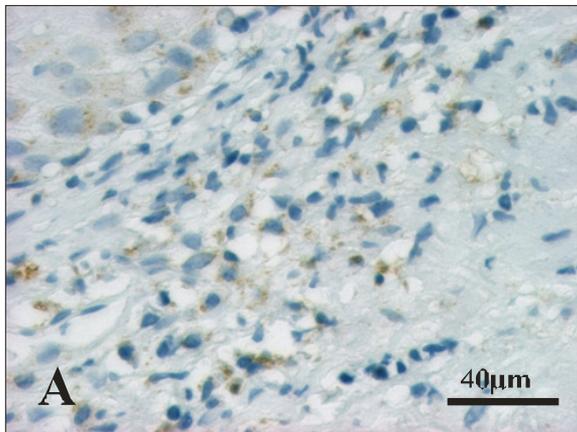
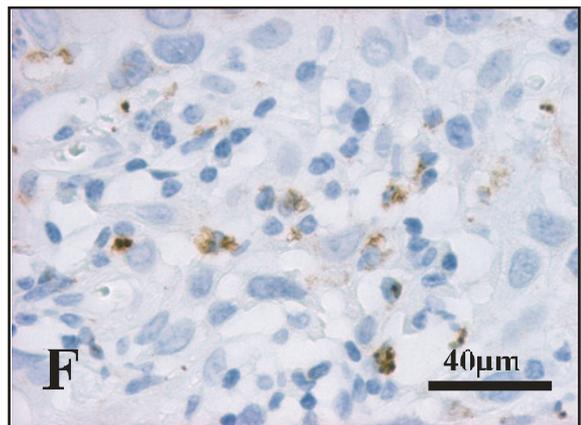
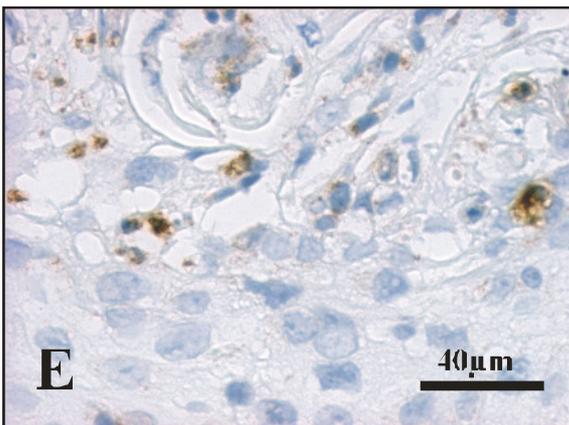
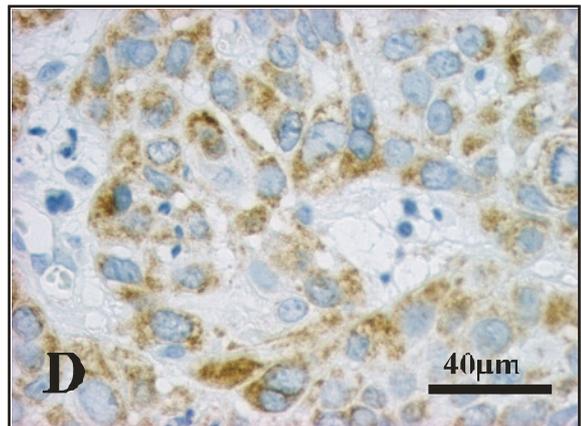
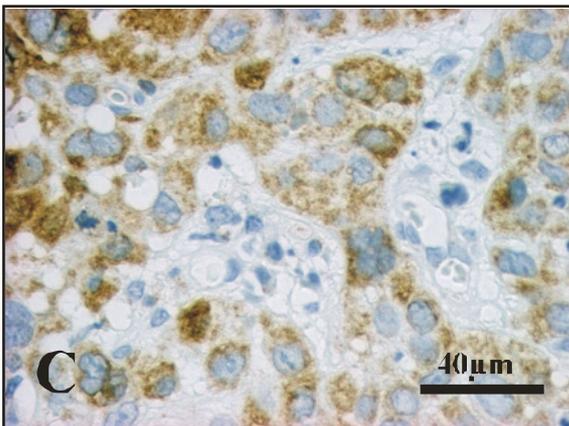
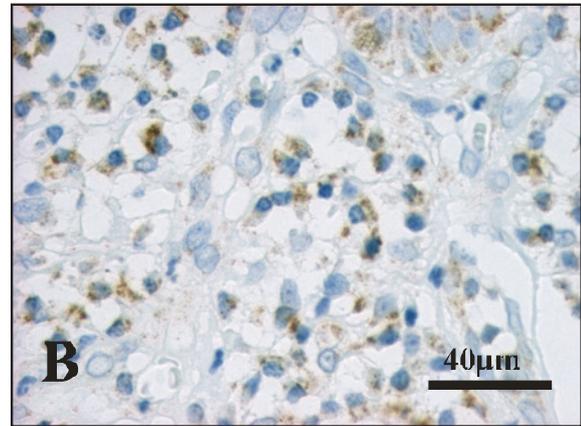
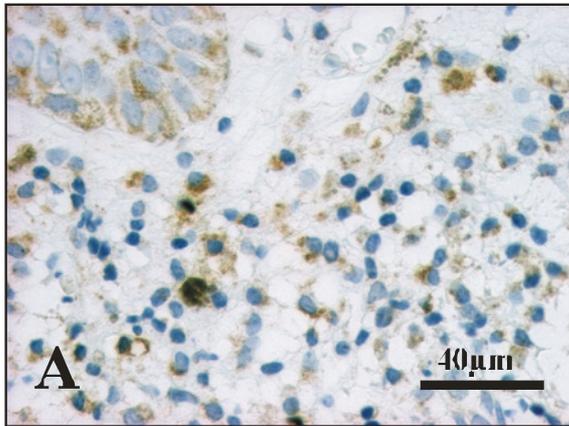


Figura 16 Imunoexpressão da cicloxigenase-2 (COX-2) no parênquima e no estroma em diferentes regiões de um mesmo carcinoma escamocelular de boca moderadamente diferenciado. **A** e **B** exibem a expressão estromal da COX-2 nas porções mais superficiais do tumor. **C** e **D** mostram regiões profundas do tumor, nas quais a expressão da COX-2 se dá basicamente pelas células epiteliais tumorais. **E** e **F** apresentam a positividade de células para o CD68 em áreas correspondentes às das figuras **C** e **D**, mostrando que macrófagos estavam presentes.



6. DISCUSSÃO

O carcinoma escamocelular de boca (CEB), forma mais prevalente do câncer oral, é uma doença que acomete pessoas em todo o mundo, chegando a se constituir na forma mais prevalente de câncer em alguns países do Oriente (Pandey et al., 2008). O Brasil apresenta uma das maiores taxas mundiais de incidência (Brasil, Ministério da Saúde - INCA, 2008). Não obstante todos os avanços no conhecimento e intervenção, esta neoplasia maligna permanece como uma das mais difíceis de ser controlada e os índices de sobrevida pouco melhoraram nos últimos 35 anos de pesquisa (Harrold, 1971; Choi et al., 2006). Nesse sentido, investigar as características clínicas e biológicas da doença é de extrema relevância porque identifica grupos de indivíduos e fatores de risco, o que permite a elaboração de estratégias de prevenção e cura ou, pelo menos, controle diante da impossibilidade de cura.

No nosso estudo, a média de idade dos pacientes portadores das lesões incluídas foi de 56,56, sendo a idade mínima encontrada 34 e a máxima 86. Os indivíduos mais velhos (> 40 anos) apresentaram maior ocorrência em relação aos mais jovens (< 40 anos). Esses dados estão de acordo com outros estudos epidemiológicos, que relatam a média de idade para portadores de CEB em torno dos 60 anos e maior ocorrência em indivíduos acima dos 45 anos (Gervásio et al., 2001; Conway et al., 2006; Lam et al., 2007). No entanto, em nossa amostra, 14,52% dos casos apresentaram idade inferior a 40 anos, um percentual considerado elevado, visto que autores afirmam ser a média de acometimento desta doença para indivíduos jovens em torno de apenas 4% a 6% (Llewellyn et al., 2001). Uma elevação na taxa de incidência para câncer oral em indivíduos considerados jovens é um fenômeno

mundial e vários fatores têm sido relacionados a este aumento, principalmente a redução na idade de início do hábito de fumar, consumo de bebidas alcoólicas e baixo consumo de frutas e vegetais (Mackenzie et al., 2000), já que estes últimos contêm carotenóides e retinóides, nutrientes que possuem efeito protetor para a doença (La Vecchia et al., 1997; Gabriel et al., 2006). Outras possibilidades incluem infecção por HPV (papilomavírus humano) e instabilidade genética ligada à p53, os quais estão geralmente presentes nos acometidos jovens que nunca fumaram ou beberam (Llewellyn et al., 2001).

Dos 27 casos de CEB avaliados, 16 (59.25%) eram do sexo masculino e 11 (40.74%) do sexo feminino. Portanto, nosso trabalho corrobora com outros estudos, epidemiológicos ou não, que demonstram a predileção de ocorrência nos homens para o CEB (Mackenzie et al., 2000; Moreno-López et al., 2000; Moore et al., 2000; Carvalho et al., 2004; Conway et al., 2006; Lam et al., 2007). Uma explicação para este fato seria uma maior prevalência do hábito de fumar e ingestão de bebidas alcoólicas nos homens, agravado por uma menor preocupação em relação aos cuidados de higiene oral e visita regular ao dentista (Franco et al., 1989; Vokes et al., 1993; Hindle et al., 2000; Moreno-López et al., 2000; Nemes et al., 2008).

Em nosso estudo, a língua (n=7; 25,92%) apresentou-se como sítio principal de ocorrência para o CEB, seguido do assoalho bucal (n=4; 14,81%) e do rebordo alveolar, (n=4; 14,81%). Estes dados estão de acordo com outros estudos que apontam igual seqüência de ocorrência para este câncer (Franco et al., 1989; Gervásio et al., 2001; Mackenzie et al., 2000; Neville & Day, 2002). Embora a maior parte dos autores afirme que tumores originados de diferentes tipos de epitélio oral possuem comportamentos clínicos distintos (Rautava et al., 2007) e que o CEB de língua tende a ser mais agressivo em relação aos que apresentam outra localização bucal (Albuquerque et al., 2003), Bell et

al., (2007) não encontraram correlação significativa entre o sítio de origem do tumor primário e o índice de sobrevivência dos pacientes ou período livre da doença, correlacionando tais aspectos prognósticos apenas com o estágio do tumor e graduação histológica.

Segundo Brandwein-Gensler et al. (2005), a variação de regiões anatômicas para desenvolvimento de um CEB está intrinsecamente relacionada às diferenças quanto à exposição aos fatores de risco. Ademais, existem diferenças com relação ao comportamento biológico e prognóstico, por exemplo, entre as lesões de lábio e as intrabucais. Infelizmente, no nosso trabalho a correlação entre o aspecto 'localização do tumor' e os outros parâmetros avaliados neste trabalho não se apresentou viável em função do tamanho da amostra.

Em nosso estudo, 18 casos (66,66%) apresentaram informação referente à cor da pele, observando-se uma maior ocorrência para o CEB nos pacientes faiodermas (n=9; 33,33%) e melanodermas (n=5; 18,51%). Em apenas quatro casos (11,11%) os indivíduos foram identificados como leucodermas. O fato de 82,35% dos indivíduos apresentarem uma pele parda ou negra pode estar relacionado com a origem da amostra, que foi obtida de bancos de laboratórios de dois estados brasileiros onde a população apresenta predominantemente estas cores na pele (IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2000).

Não foi possível realizar na totalidade da amostra a análise de todos os aspectos clínicos propostos em virtude da ausência de informações em algumas das fichas de prontuário. Embora não tenha comprometido o resultado do trabalho, este dado reforça a necessidade dos profissionais clínicos coletarem e fornecerem informações clínicas minimamente necessárias, como localização da lesão, idade e cor da pele dos pacientes

submetidos à biópsia, o que viabiliza a compreensão de como fatores locais influenciam na patogênese da doença.

Os CEBs apresentam comportamento biológico muitas vezes imprevisível, principalmente se considerarmos as lesões de estágio inicial, nas quais a presença de metástases lifonodais ocultas é algo extremamente comum. Portanto, a definição de parâmetros histopatológicos do tumor primário que sejam capazes de orientar a respeito do curso clínico da lesão é algo relevantemente necessário para a decisão do tratamento clínico proposto (Keski-Säntti et al., 2007).

A distinção dos tumores de acordo com o grau de diferenciação foi realizada com base na classificação da OMS, que define os tumores como: bem, moderadamente ou pouco diferenciados a partir de aspectos histopatológicos como: grau de pleomorfismo nuclear, padrão de invasão, número de mitoses, grau de queratinização e presença de infiltração linfo-plasmocitária, e tem sido ampla e recentemente utilizada em estudos envolvendo avaliação de câncer oral (Kademani et al., 2005; Bell et al., 2007; Huang et al., 2007; Keski-Säntti et al., 2007; Pandey et al., 2008). A idéia de incluir os carcinomas *in situ* neste trabalho advém do nosso intuito de estudar o comportamento biológico de um carcinoma ainda na sua fase intra-epitelial, bem como de investigar as proteínas por nós estudadas em relação aos eventos iniciais da carcinogênese.

De acordo com os nossos achados para graduação histológica, a maior parte dos casos de CEB apresentou grau de diferenciação moderado, que estava presente em nove dos vinte e sete casos (33,33%), seguido do 'bem diferenciado' (n=8; 29,62%). Se ocultarmos os casos de carcinoma *in situ*, as porcentagens se estabelecem como 39,13% e 34,78%, respectivamente para os de grau moderado e para os bem diferenciados. Estes dados corroboram com Huang et al. (2007), que utilizaram a classificação da OMS para

analisar 172 CEBs de mucosa jugal e encontraram maior prevalência para as lesões moderadamente diferenciadas, e menor para as pouco diferenciadas.

A técnica de imunohistoquímica é largamente utilizada na rotina diagnóstica e em experimentos científicos na área de patologia humana desde a década de 70 e se constitui em método seguro para detecção da expressão de proteínas em amostras de massa tecidual (Mighell et al., 1998; Chan, 2000). No entanto, durante a escolha e execução da técnica, para preservar ao máximo a estrutura e recuperar a composição química tecidual, algumas especificidades em relação ao pré-tratamento do material devem ser observadas (Larsson, 2000).

Fixadores à base de formaldeído são largamente utilizados em estudos envolvendo pesquisa de antígenos de baixo peso molecular e peptídeos, já que os fixadores com formulação à base de etanol podem removê-los ao invés de fixá-los (Larsson, 2000). Portanto, neste trabalho foram utilizadas amostras parafinizadas que foram previamente fixadas em fórmulas à base de formaldeído, o que permitiu que a marcação fosse realizada. No entanto, o formaldeído reduz os sítios específicos de ligação antígeno-anticorpo por estabelecer ligações cruzadas que acarretam sutis alterações na conformação tridimensional da molécula protéica, comprometendo os epítomos dos antígenos (Leong & Leong, 2007). Assim como os agentes fixadores, o processo de parafinização interfere na antigenicidade por modificar, esconder ou até mesmo extrair os antígenos, já que a maioria destes é solúvel (Larsson, 2000). Portanto, no intuito de minimizar todos estes efeitos, no nosso trabalho, antes da marcação imunohistoquímica propriamente dita, as amostras foram submetidas a uma etapa de recuperação antigênica.

A literatura descreve alguns métodos para desmascarar os antígenos, mediados pelo calor ou por ação enzimática (Mighell et al., 1998). No entanto Leong & Leong (2007)

advertem que a digestão proteolítica pode promover alterações deletérias em alguns antígenos, além de gerar protocolos mais difíceis e favorecer a perda da morfologia tecidual, altos níveis de “background” e marcação falso-positivas. Além disso, Chan (2000) afirma que os métodos induzidos pelo calor apresentam a vantagem de permitir aplicação de anticorpos em maiores diluições justamente porque preservam uma maior quantidade de antígeno durante a recuperação. No nosso estudo, todas as proteínas foram recuperadas através de calor, seja por microondas ou por *Steamer*. O pré-tratamento fornecido às amostras de tecido antes da marcação imunohistoquímica foi o aspecto que mais influenciou a aferição de vasos em um trabalho que avaliou o quanto a metodologia pode afetar a graduação de angiogênese em tumores de mama e de boca (Schor et al., 1998), demonstrando a importância dessa etapa em relação aos resultados obtidos num trabalho científico. A utilização no nosso estudo de lâminas com prévio tratamento químico adesivo (*Superfrost Plus®/Easy Path*) foi de grande valia, uma vez que em nenhuma das reações observou-se a perda das secções durante o processamento, mesmo com o tratamento sob calor.

Entre outras variantes que atestam para a qualidade do trabalho executado pela técnica imunohistoquímica, podem ser citados: os clones e diluições dos anticorpos e sistema de revelação. Nesse sentido, muitos avanços foram obtidos pela produção de uma diversidade de anticorpos monoclonais que apresentam epítomos resistentes aos fixadores à base de formol, bem como a criação de sistemas de amplificação. O sistema de detecção fundamentado num polímero indireto, como é o caso do *EnVision*, apresenta a vantagem de aumentar a sensibilidade das imunoreações, podendo amplificar o sinal da reação imunohistoquímica em até 200 vezes, além de diminuir o tempo de execução porque elimina um de seus passos (Sabattini et al., 1998). Por isso, esta foi a técnica

imunohistoquímica escolhida para pesquisas dos depósitos antigênicos neste estudo, sendo utilizados os componentes que eram até recentemente oferecidos sob apresentação de kit comercial para anticorpo primário da DAKO® que são: *EnVision Labeled Polymer HRP*, *Liquid DAB* (substrato cromógeno diaminobenzidina) e o *Peroxidase Blocking Reagent*.

Observar como certas proteínas se comportam no câncer e em que sentido elas se relacionam com aspectos da doença como: características morfológicas de agressividade, nível de sobrevivência, grau de recorrência e índice de metástase, permite enquadrá-los como fatores prognósticos e/ou preditivos, contribuindo no conhecimento de sua biologia e na elaboração de estratégias de intervenção para controle ou cura. No intuito de orientar para formulação correta de hipóteses e interpretação adequada de resultados, Hall & Going (1999) conceituaram importantes diferenças entre fator prognóstico e preditivo. Segundo eles, o primeiro corresponde a uma propriedade a partir da qual o provável curso clínico da doença pode ser inferido, enquanto o segundo concerne à relativa sensibilidade ou resistência da doença a uma terapia específica. Ou seja, proteínas podem ser consideradas fatores prognósticos quando estão diretamente correlacionadas com aspectos clínico-patológicos do tumor e fatores preditivos de forma independente informam, a partir de sua expressão, qual o melhor tratamento a ser executado. Em relação à análise das proteínas estudadas no nosso trabalho, optamos pela avaliação descritiva e semi-quantitativa porque acreditamos que esta se apresenta mais sensível como medida do conteúdo protéico celular em relação a medidas que envolvem apenas escala de densidade óptica (Katori et al., 2007).

Trabalhos como o nosso, o qual utiliza blocos de parafina armazenados em bancos de laboratório, necessitam de marcadores adequados com alta sensibilidade e especificidade biológica que identifiquem na célula ou no tecido seu alvo de forma confiável (Magdelénat, 1992). Optamos por avaliar a proliferação celular utilizando o anti

Ki-67, que identifica na célula uma proteína nuclear sem a qual a célula não entra em divisão (Schlüter et al., 1993). Além disso, apresenta a vantagem de identificar proliferação celular em quase todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M), o que atesta para a sua confiabilidade em estudos de imunohistoquímica tanto em tecidos normais quanto em tecidos neoplásicos humanos (Gerdes et al., 1984). O clone MIB-1 (Molecular Immunology Borstel), extraído do Ki-67, apresenta excelente atividade e é capaz de estabelecer boa correlação com proliferação celular utilizando-se imunohistoquímica em tecidos fixados em formol e embebidos em parafina (Cattoretti et al., 1992), porque o anticorpo original Ki-67 só pode ser usado em material fresco ou congelado (Brown & Gatter, 2002).

Nossos dados medidos pela marcação do Ki-67 expressaram maior potencial proliferativo nos CEBs moderadamente e pobremente diferenciados, com importante significância estatística entre os moderados e os bem diferenciados ($p = 0,000$). Embora Kuratomi et al., (2006) não tenham encontrado qualquer correlação entre índice proliferativo medido por Ki-67 e grau de diferenciação em CEB de gengiva, nossos resultados estão de acordo com diversos estudos na literatura que descrevem altos índices proliferativos em tumores que apresentam forte presença de alterações histopatológicas e prognósticos ruins, tanto para câncer oral (De Aguiar et al., 2007; Katori et al., 2007; Kim et al., 2007) como para cânceres em outras localizações (Mao et al., 2006), ou ainda em hiperplasia da mucosa bucal normal com alto risco para cancerização (Shah et al., 2007).

O fato de termos encontrado maiores valores proliferativos para os CEB moderadamente diferenciados em relação aos pobremente diferenciados pode ser explicado pelo fato de apresentarmos na nossa amostra um maior número de lesões moderadamente diferenciadas. Além disso, muitos dos CEB com diferenciação moderada da nossa amostra,

a despeito de possuírem pérolas de queratina remanescentes, que são um fator de apoio na diferenciação entre as lesões moderadamente e pobremente diferenciadas (Barnes et al., 2005), apresentavam alterações morfológicas acentuadas características de CEB pouco diferenciados.

Existe certa controvérsia na literatura em considerar a idade do paciente como variável relacionada ao grau de malignidade do tumor. Alguns autores acreditam que nos jovens o CEB apresenta um comportamento mais adverso quando comparados com indivíduos idosos (Broders, 1941), enquanto que outros trabalhos afirmam ser o comportamento biológico do tumor fator independente da faixa etária (Schantz et al., 1988). Autores afirmam que as regiões do cromossomo que usualmente exibem alterações genéticas importantes para a tumorigênese oral são as mesmas nos indivíduos jovens e nos adultos (Jin et al., 1999). No entanto, Wiencke et al., (1999) afirmam que fumar durante os anos da adolescência gera importantes mudanças fisiológicas que tornam o DNA mais vulnerável, além de levar a um aumento na formação e persistência de DNA *aducts* até mesmo quando existe o abandono do vício, o que não acontece em indivíduos que começaram a fumar tardiamente.

No nosso trabalho, encontramos uma associação inversa entre índice proliferativo medido pelo Ki-67 e idade dos pacientes próxima de uma significância estatística ($p=0,070$). Interessantemente, nossa amostra era composta de três pacientes jovens (<40 anos), dos quais dois (66,66%) apresentaram CEB com baixo grau de diferenciação e um (33,33%) com grau moderado. Ademais, observamos forte associação entre a idade categorial (<40 anos e >40 anos) dos indivíduos e o grau de diferenciação das lesões ($p=0,000$). Portanto, nossos achados estão de acordo com (Tsukuda et al., 1993), que acreditam na ocorrência de lesões com pior prognóstico nos indivíduos jovens.

A vasculogênese é definida como a diferenciação de células precursoras denominadas angioblastos em células endoteliais e formação *de novo* de um sistema vascular primitivo, enquanto a angiogênese se caracteriza pelo crescimento de novos capilares a partir de vasos sanguíneos maduros pré-existentes (Risau, 1997). Em tumores malignos humanos, de um modo geral, a sobrevivência de suas células se dá a partir do processo de angiogênese, ao qual está vinculada a sua capacidade de crescer e posteriormente disseminar-se. Este mecanismo se dá de forma complexa e envolve a interação entre fatores pró e anti-angiogênicos regulados pelas células endoteliais, musculares lisas e os pericitos, além de matriz extracelular e células do estroma (Conway et al., 2001; Carmeliet, 2004).

Embora diversos trabalhos desenvolvidos em modelos animais já tenham demonstrado que a angiogênese é fundamental para o crescimento do tumor e posterior disseminação à distância (Folkman, 1990), permanece controverso na literatura o estabelecimento da medida de densidade microvascular como fator prognóstico confiável para tumores malignos (Schor et al., 1998) e alguns autores não atestem confiabilidade na aferição vascular para sugerir a respeito do curso da lesão ou como fator prognóstico independente (Axelsson et al., 1995; Morphopoulos et al., 1996; Fernández et al., 2007; Calvin et al., 2007). A discrepância existente na literatura no sugestionamento de prognóstico baseado no número de vasos presentes no tecido é tamanha a ponto de diversos estudos terem associado o nível de densidade microvascular com bons prognósticos, por exemplo, para câncer oral (Pazouki et al., 1997) e tumores malignos da cabeça e do pescoço (Zatterstrom et al., 1995), além de câncer do colo de útero (Kainz et al., 1995). Outros autores afirmam, por sua vez, que não existe qualquer valor prognóstico clínico para a medida dos níveis de vascularidade, pelo menos em se tratando do câncer de mama

(Axelsson et al., 1995; Morphopoulos et al., 1996). Entretanto, diversos autores acreditam veementemente na densidade microvascular (DMV) como fator da maior importância no estabelecimento de prognóstico clínico para diversos tipos de câncer, como o de mama (Weidner et al., 1991) cólon (Takahashi et al., 1995) e boca (Brun et al., 2001); e afirmam que tratamentos envolvendo a utilização de substâncias anti-angiogênicas poderão salvar a vida de milhões de pessoas vítimas de diversas doenças, incluindo as malignidades (Carmeliet, 2004; Carmeliet, 2005).

Em geral, a quantificação do número de vasos presentes na área mais vascularizada do tecido, também chamada *hot spot*, é o método mais usualmente utilizado na medida de vascularização (Weider et al., 1991). No nosso estudo, utilizamos a proteína *von Willebrand factor* (Fator VIII) para evidenciar os vasos e assim quantificá-los (Artese et al., 2001; Brune t al., 2001; Guttman et al., 2004; Calvin et al., 2007). Proteínas como o CD31 e CD34 também são usualmente utilizadas para medir a DMV em tumores orais (Guttman et al., 2004; Fernández et al., 2007), não existindo diferenças entre a marcação pelo CD31 e F VIII quando se considera densidade microvascular, e existindo um maior marcação pelo F VIII quando a aferição é realizada considerando-se o volume microvascular (Schor et al., 1998).

Neste trabalho optamos por avaliar a angiogênese através da contagem de vasos por mm^2 de tecido, e não apenas por campo observado, por acreditarmos que o tamanho da área examinada influencia consideravelmente no cálculo da DMV (Schor et al., 1998). Dessa forma, a partir dos nossos resultados em relação às diversas localizações anatômicas, observamos que de um modo geral os maiores valores não estavam presentes na língua, apesar da predileção na ocorrência do CEB para este sítio na amostra estudada. Outras localizações, como gengiva, mucosa jugal e lábio apresentaram os valores mais

expressivos. Esses dados podem estar relacionados com o fato de a língua apresentar alta vascularização e, por isso, permitir que tumores nela cresçam sem necessariamente formar novos vasos (Vora et al., 2003).

De acordo com nossos resultados, o carcinoma *in situ* apresentou elevados índices de vascularização, não apresentando diferenças estatísticas em relação aos CEB. Estes achados estão de acordo com os de Shibata et al., (2005), que investigaram entre outros marcadores, DMV medida pelo CD34 num aumento de 200X, em tecido normal, displasias e CEB oral. Estes autores, embora não tenham encontrado diferenças significativas entre a DMV das displasias em relação aos CEB, observaram elevação significativa na DMV em displasias severas em relação às leves.

Nossos achados permitiram estabelecer uma associação inversa entre a densidade microvascular medida em aumento de 400X e o grau de diferenciação, quando comparados os CEB ‘bem’, ‘moderadamente’ e ‘pobrememente’ diferenciadas ($p=0,048$), achados também semelhantes aos de Shibata et al., (2005). Esses resultados estão de acordo com Shpitzer et al. (1996), Artese et al. (2001), Vora et al. (2003) e Guttman et al. (2004), que acreditam ser o prognóstico dos CEB relacionado ao grau de vascularização das lesões. Vairaktaris et al. (2008) afirmam que um aumento na angiogênese nos portadores de CEB apresenta relação com os elevados níveis de IL-10, o que provavelmente ocorre pela supressão da resposta imune nesses indivíduos.

Em estudo imunohistoquímico recentemente realizado com CEB de língua, Fernández et al (2007) utilizaram o CD31 como marcador de vasos e observaram em aumento de 400X, não atestando evidências na medida de vascularização tumoral como fator independente para avaliar possibilidade de recidiva ou índice de sobrevivência nos pacientes. Guttman et al. (2004) realizaram estudo semelhante utilizando fator VIII e CD34

como marcadores também em aumento de 400X e detectaram um maior número de vasos como o CD34, o que esteve significativamente correlacionado com invasão tumoral à musculatura adjacente e metástase lifonodal. Segundo eles, apenas o CD34 pode ser associado à agressividade dos tumores. Acreditamos que este resultado pode estar relacionado à vantagem deste marcador de expressar-se em vasos recém-formados, o que não ocorre na marcação pelo F VIII. Vora et al. (2003) avaliaram vascularização pelo F VIII em aumento de 400X como biomarcador de prognóstico também em CEB de língua e encontraram marcação para vasos em apenas 20% dos tumores. Eles explicam este resultado afirmando que a língua, por ser altamente vascularizada, permite crescimento tumoral sem necessariamente promover angiogênese. No entanto, nosso estudo, que apresentou maior prevalência para a língua como sítio de ocorrência, apresentou imunomarcação pelo F VIII em todas as amostras. De qualquer forma, segundo Vora et al. (2003), a partir dos resultados do seu trabalho, a aferição de angiogênese não seria adequada indicador patológico prognóstico para CEB de língua.

Gleich et al. (1997), que avaliaram vascularidade em CEB de diversas localizações mediante utilização de F VIII e CD31 em aumento de 400X, embora tenham encontrado correlação entre o tamanho do tumor e vascularidade, quando aferida pelo F VIII, não acreditam que a densidade microvascular seja bom indicador de potencial angiogênico. Todavia, Shpitzer et al. (1996) contaram vasos marcados pelo F VIII num aumento de 250X em CEB de língua e estabeleceram correlação positiva com presença de metástase, indicando a angiogênese como fator independente para predizer metástase lifonodal e decidir sobre a terapia a ser utilizada. De acordo com estes autores, pacientes com ausência clínica de lifonodos comprometidos portadores de altos índices de vascularização deveriam ser tratados com terapia adjuvante, e não apenas com ressecção cirúrgica.

Para os autores que não atestam medida de vascularidade como fator prognóstico em CEB, a angiogênese seria apenas um entre os muitos fatores que regulariam o crescimento deste tumor. De qualquer modo, há alguns anos estudos demonstram que em se tratando de tecidos orais, a presença de vasos sanguíneos é geralmente mais elevada em tumores do que no tecido normal correspondente (Pazouki et al., 1997). Assim como Fernandez et al. (2007), sugerimos uma padronização nos métodos de aferição e estabelecimento dos resultados no intuito de homogeneizar os dados e tornar os estudos mais comparáveis. Acreditamos que a ausência na literatura de consenso a respeito da medida de angiogênese como prognóstico pode estar associada às disparidades na análise envolvendo tamanho da objetiva, método de contagem (por área tecidual ou por campo), determinação de um vaso que caracterize um tumor, seleção das regiões *hot spot*, além das diferenças em relação aos marcadores utilizados e delineamento dos estudos.

Tumores sólidos apresentam, além de células neoplásicas e vasos sanguíneos, um componente celular estromal basicamente formado por fibroblastos e células imuno-competentes, sobretudo macrófagos e linfócitos (Allavena et al., 2008). No entanto, o significado biológico da presença de macrófagos no microambiente tumoral é algo ainda não totalmente esclarecido para muitos autores, principalmente por possuírem estas células funções muitas vezes contraditórias (Bianchini et al., 2007; Naito, 2008).

A partir da nossa análise descritiva observamos uma maior presença de macrófagos no estroma tumoral das porções mais periféricas dos tumores. Este dado não foi quantificado pela ausência de margens preservadas na maioria dos tumores, já que trabalhamos com biópsias incisionais de diagnóstico inicial. Nossos achados estão de acordo com outros trabalhos da literatura que atestam a preferência dos MATs pelas áreas marginais do tumor (Bianchini et al., 2007). Estudos que utilizam amostras provenientes de

cirurgias terapêuticas, nas quais a frente de invasão está sempre presente, e avaliam separadamente a presença dos MATs em áreas próximas às margens do tumor (MATs marginais) e nos tecidos mais profundos (MATs intratumorais), usualmente encontram elevação na densidade macrofágica nas áreas próximas às margens de invasão (Soeda et al., 2008). Isto pode estar relacionado com o fato das margens tumorais usualmente apresentarem-se ulceradas ou necróticas, uma vez que os MATs se acumulam preferencialmente em regiões necróticas ou pobremente vascularizadas do tumor, em virtude da existência de baixa tensão de oxigênio nessas áreas (Murdoch et al., 2004).

De acordo com Mantovani et al. (2007), esses MATs correspondem a uma subpopulação mielóide de macrófagos M2, em virtude da demonstração de que expressam funções comuns aos M2. Eles são atraídos do sangue em direção ao tumor por quimiocinas, além de VEGF, PDGF, TGF- β e o M-CSF, sendo que já no tumor sofrem acentuadas mudanças fenotípicas e expressam citocinas e enzimas mitogênicas e pró-angiogênicas que contribuem para o crescimento, angiogênese e metástase tumorais (Murdoch et al., 2004).

MATs apresentam inúmeros recursos que contribuem tanto para o início da tumorigênese quanto para a metástase, incluindo a produção de IL-1, TNF, CSF-1, COX-2 e o NF-KB, além de enzimas relacionadas à degradação da matriz extra-celular (Coussens & Werb, 2002; Mantovani, Sica et al., 2007; Allavena, Sica et al., 2008). Portanto, MATs comprometem a efetividade da imunidade tumoral e, sendo o carcinoma escamocelular de boca pobremente imunogênico e bastante imunossupressivo (Lang et al., 2007), provavelmente os MATs apresentam importante função na progressão desta lesão (Mantovani et al., 2003).

Outro mecanismo importante é a expressão de fatores pró-angiogênicos como o VEGF, PDGF, TGF- β , CCL2 (Bonizzi & Karin, 2004), TNF- α , β -FGF, IL-8 (Mantovani et

al., 2007), além do MDGF (Polverini & Leibovich, 1985). Como o potencial de induzir angiogênese no câncer oral está relacionado tanto com as células epiteliais tumorais quanto com a presença de macrófagos do estroma associado ao tumor, os MATs apresentam importante papel na progressão dos CEB também através do artifício angiogênico.

A presença elevada de macrófagos, como foi observada no nosso estudo, já esteve correlacionada com prognóstico ruim em diversos tipos de câncer (Ueno et al., 2000) e isto pode estar relacionado à ação pró-angiogêncica tumoral dos MATs. Destarte, o progresso do conhecimento referente à biologia do macrófago sem dúvidas permitirá novas estratégias para o tratamento do câncer. No entanto, esta abordagem deve ser desenvolvida com muita cautela, uma vez que estas células apresentam funções imprescindíveis dentro da fisiologia humana. Depleção de macrófagos reduz severamente a produção de bilirrubina, além de diminuir consideravelmente a resistência do indivíduo a processos infecciosos (Naito, 2008). O ideal realmente seria que as medicações utilizadas apresentassem ação seletiva para os MATs.

Não foi possível no nosso estudo estabelecer correlação entre a presença de macrófagos e a DMV. No entanto, uma relação entre DMV e aumento de macrófagos já foi demonstrada em diversos tipos de câncer como o de mama (Ueno et al., 2000), de pulmão (Chen et al., 2003) e adenomas do trato gastro-intestinal (Chapple et al., 2002), que são lesões cancerizáveis. Ademais, existem evidências de que o VEGF produzido pelos MATs promove linfo-angiogênese peritumoral, o que propicia a disseminação da doença e posterior metástase linfática (Schoppmann et al, 2002). Em se tratando de câncer oral, Soeda et al. (2008) encontraram correlação entre presença de macrófagos e densidade microvascular. Marcus et al. (2004) correlacionaram a presença dessas células com prognósticos ruins e, embora não tenham quantificado vasos, atribuem os resultados

principalmente à sua ação angiogênica. No nosso trabalho, encontramos ainda que sem significância estatística ($p=0,374$), maior densidade macrofágica nos tumores pouco diferenciados e menor naqueles bem diferenciados, o que demonstra que de alguma forma os MATs podem estar relacionados com o prognóstico do CEB. A ausência de correlação entre a presença de macrófagos e DMV pode ser esclarecida a partir da observação de que os macrófagos preferem as áreas hipóxicas dos tecidos, que são geralmente necróticas e atraem esta população celular para seus arredores.

Em nosso estudo descrevemos a expressão de COX-2 no citoplasma das células epiteliais do tumor e no estroma correspondente. Estudos anteriores já demonstraram a expressão desta enzima em CEB, no entanto poucos descreveram o padrão de expressão em relação ao grau de diferenciação das lesões (Shibata et al., 2005; Pannone et al., 2007; Pandey et al, 2008).

As células tumorais expressaram a COX-2 em intensidades e extensões citoplasmáticas distintas. Uma parte da nossa amostra (17,24%) não expressou COX-2 nas células tumorais, um resultado semelhante ao realizado em carcinomas avançados de nasofaringe por Chan et al. (2007), que encontraram expressão da enzima em apenas 83% dos tumores e por Atula et al. (2006), que encontraram em 88% dos casos estudando uma amostra de CEB. Este resultado não está relacionado com aspectos histológicos, uma vez que a ausência de marcação foi observada tanto no carcinoma *in situ* quanto em CEBs 'bem' e 'moderadamente' diferenciados.

Embora os autores não tenham discutido a ausência de expressão da enzima em parte da amostra, sugerimos para este trabalho que nesses casos outros mecanismos em prol do surgimento e crescimento tumorais possam estar envolvidos. Apesar de acreditarmos que a COX-2 influencia sobremaneira nos diversos estágios da carcinogênese, outras vias

estão presentes, como a indução de angiogênese e de moléculas degradadoras da matriz extracelular realizada por MATs (Hagemann et al., 2004; Mantovani et al., 2007) ou pelas próprias células tumorais.

Nos carcinomas *in situ*, a expressão imunohistoquímica da enzima se apresentou principalmente na camada intermediária e resultados semelhantes foram obtidos por Shibata et al. (2005). Acreditamos que este aspecto está relacionado com o fato das alterações no CEB estarem presentes na camada correspondente nos tecidos normais à camada escamosa, que se localiza imediatamente acima da basal.

Em nosso estudo, optamos por analisar a expressão da COX-2 através do estabelecimento de um escore baseado no produto da porcentagem de células marcadas pela intensidade de marcação, como estabelecido por Chan et al. (2007). Existe uma forte tendência por parte dos autores que avaliam expressão da COX-2 para utilização de metodologias envolvendo escores de porcentagem que levem em consideração a intensidade de marcação (Yu et al., 2003; Hemmerlein et al., 2004; Nijsten et al., 2004; Sarian et al., 2006; Katori et al., 2007; Yoshida et al., 2007). Isto porque em relação à expressão da COX-2 nas células epiteliais, a intensidade da marcação imuno-histoquímica é mais relevante do que o número de células marcadas, o que explica porque trabalhos que abrem mão de um dos parâmetros optam por manter intensidade da marcação (Bianchini et al., 2007).

A nossa análise mediante utilização de escore de marcação revelou elevação sem diferença estatística na expressão da COX-2 para todos os tumores, o que está de acordo com os achados de Chan et al. (2007) e Pandey et al. (2008), que não encontraram qualquer valor prognóstico significativo na expressão da COX-2 em carcinomas de nasofaringe avançados e CEB, respectivamente. O fato de termos encontrado elevada expressão de

COX-2 nos carcinomas *in situ*, bem como nos tumores bem, moderadamente e pobremente diferenciados sugere que no CEB, a enzima pode estar relacionada com os diversos estágios da carcinogênese. Pannone et al. (2007) avaliaram por RT-PCR os níveis de COX-2 em CEBs e, embora não tenham encontrado correlação com a graduação histológica ou índice de sobrevivência dos pacientes, afirmam que a enzima tem valor prognóstico por estar significativamente relacionada ao período livre de doença nos pacientes. Shibata et al. (2005), que realizaram avaliação por imunohistoquímica e relacionaram com a graduação histológica, encontraram maiores valores para a expressão de COX-2 nos CEB bem diferenciados. No entanto esses autores, durante análise da marcação para a COX-2, levaram em consideração apenas a porcentagem de células marcadas.

Apesar das semelhanças na proposição e nos dados obtidos, existem diferenças importantes entre o nosso trabalho e os desenvolvidos por Pannone et al. (2007) e Pandey et al. (2008). Estes últimos realizaram um estudo comparando três diferentes grupos de amostra (tumores, lesões pré-neoplásicas e mucosa bucal sadia), nós realizamos um estudo comparando tumores com diferentes graus de diferenciação entre si, incluindo os carcinomas *in situ*. Enquanto todos eles analisaram a expressão da enzima por RT-PCR e PCR, nós optamos pela imunohistoquímica. As semelhanças nos nossos resultados em relação a estes trabalhos, que foram executados com o mesmo tipo de lesão e marcador, mas com técnicas que apresentam alta sensibilidade, como é o caso das técnicas de biologia molecular, validam ainda mais os nossos achados. Estudos como o realizado por Tang et al. (2003), que observaram alta expressão da enzima em CEB, não realizaram qualquer tipo de análise de graduação histológica e encontraram elevação nos tumores em relação às áreas não-tumorais adjacentes às áreas tumorais e quando estabeleceram comparação com biópsia de indivíduos saudáveis.

Em verdade, a maior parte dos autores que avaliaram expressão de COX-2, correlacionando-a com prognósticos ruins, utilizou biópsias de tumor primário, observando variáveis de prognóstico como presença de metástase (Bianchini et al., 2007). No nosso trabalho, por se tratar de um estudo retrospectivo com biópsias incisionais de diagnóstico inicial, nos restou estabelecer como fator prognóstico apenas a graduação histológica, em virtude de sua já sabida validade como fator preditivo para CEB, além da inviabilidade durante realização do nosso estudo de acessar dados que fossem denunciadores clínicos de prognóstico.

Hemmerlein et al. (2004) quantificaram por RT-PCR e analisaram imunohistoquimicamente a expressão da COX-2 em carcinomas renais, encontrando elevada expressão da enzima no epitélio tumoral e macrófagos, e afirmam que a COX-2 favorece a proliferação e metástase tumoral. Estudando a expressão da COX-2 em lesões de cérvix uterino de diversos graus por imunohistoquímica, Sarian et al. (2006) observaram elevada expressão da enzima e, assim como no nosso estudo, não correlacionaram com a severidade da doença. Segundo eles, a resposta inflamatória desencadeada pelo HPV, que está intimamente associado às lesões estudadas, poderia contribuir para a expressão da COX-2 independentemente do curso de progressão das lesões. É interessante observar que a COX-2 é expressa apenas em condições de inflamação, e isto é um achado comum em lesões de boca, malignas ou não. Pacientes portadores de lesões malignas bucais podem apresentar condições pró-inflamatórias ou inflamatórias associadas, como a doença periodontal, que é uma doença bucal bastante prevalente de natureza bacteriana que compartilha com o câncer de boca seu principal fator etiológico: o hábito de fumar.

Embora macrófagos sejam os principais secretores de COX-2 no componente intersticial tumoral (Huang et al., 2000), outras células inflamatórias, fibroblastos e células

endoteliais também produzem COX-2 (Shibata et al., 2005; Bagloli et al., 2006). Inclusive observamos no nosso trabalho a expressão de COX-2 na parede de vasos sanguíneos. Por isso optamos no nosso estudo por não quantificar a presença de macrófagos expressando COX-2 no estroma porque acreditamos que trabalhando com imuno-histoquímica isto só seria possível mediante dupla-marcação. No entanto a literatura apresenta um estudo envolvendo análise da expressão de COX-2 por macrófagos em carcinomas de cólon e reto sem utilização de dupla marcação ou técnicas outras que não a imuno-histoquímica, com uma metodologia bastante semelhante à nossa, na qual toda a expressão estromal de COX-2 é atribuída aos macrófagos (Sheehan et al., 2005). Concordamos com a metodologia de Bianchini et al. (2007), que estudaram a expressão de COX-2 em macrófagos em melanomas cutâneos e, embora não tenham utilizado dupla marcação com os anticorpos anti-CD68 e anti-COX-2, tiveram o cuidado de realizar cortes seriados.

Observamos a presença elevada de células intersticiais expressando COX-2 nas lesões de todos os graus de diferenciação. Acreditamos, assim como Hemmerlein et al. (2004), que a COX-2 expressa pelos macrófagos principalmente em condições de hipóxia fortalece as propriedades anti-apoptóticas e proliferativas do tumor e isto pode explicar nossos achados de elevação de macrófagos nas lesões moderadamente e pobremente diferenciadas.

Nossa análise descritiva permitiu observar que os macrófagos expressaram COX-2 preferencialmente nas regiões correspondentes ao epitélio da frente de invasão, embora tenham sido observados nas diferentes lesões em toda a extensão do estroma tumoral, tanto nas áreas mais superficiais quanto nas profundas. Por se tratar de uma amostra obtida de biópsias incisionais, na maioria das vezes com volume reduzido, esta área dos tumores estava presente em apenas alguns casos, o que inviabilizou esta análise na totalidade da

amostra. Autores que analisaram MATs expressando COX-2 em biópsia excisionais, como é o caso de Bianchini et al. (2003) e Sheehan et al. (2005), observaram uma maior porcentagem ou densidade dessas células nas regiões mais superficiais dos tumores, como a frente de invasão. A identificação no nosso estudo de células com marcação para CD68 em toda a extensão do estroma tumoral, mesmo em áreas sugestivamente correspondentes à expressão negativa para COX-2, sugere que no CEB os macrófagos podem estar presentes em todo o estroma do tumor, no entanto produzem COX-2 preferencialmente no infiltrado inflamatório próximo aos epitélios mais superficiais ou áreas próximas a zonas de ulceração.

Células estromais como os macrófagos produzem COX-2 e se constituem em células funcionais que iniciam a mitogênese após serem estimuladas por prostaglandinas (Nolan et al., 1998; Lewis et al., 2000), sendo o PGE₂ o principal produto da COX-2 associado às transformações malignas. De acordo com Huang et al. (2000), macrófagos que expressam COX-2 em tumores humanos correspondem a uma subpopulação que sofreu ativação pela interleucina-1 (IL-1) e pelo fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α).

Levando-se em consideração que a densidade macrofágica medida pela marcação do CD68 em nosso estudo se apresentou, ainda que sem significância estatística, mais elevada nos tumores pouco diferenciados; e que a COX-2 se apresentou elevada de uma forma geral em todos os tumores, acreditamos que a expressão de COX-2 em CEB está intrinsecamente relacionada com as células epiteliais, ao contrário de Bianchini et al. (2007), que encontraram validade da COX-2 como fator prognóstico em melanomas apenas para a expressão nos MATs e não para a expressão nas células tumorais.

Portanto, a partir dos nossos achados, sugerimos que no CEB os MATs presentes nas lesões menos diferenciadas estão induzindo a expressão de outras moléculas que não a

COX-2, como moléculas relacionadas à degradação da matriz extracelular (Hagemann et al., 2004) ou como as pró-angiogências VEGF, PDGF TGF- β (Bonizzi & Karin, 2004) e TNF- α , β -FGF e IL-8 (Mantovani et al., 2007), embora não tenhamos estabelecido correlação entre a densidade macrofágica e a densidade microvascular.

Em nosso trabalho não foi possível estabelecer correlação significativa entre a densidade microvascular e os níveis de expressão de COX-2, um resultado semelhante ao obtido por Shibata et al. (2005) com lesões de boca, que utilizaram o CD34 para marcar os vasos. Embora a COX-2 influencie a angiogênese, por exemplo, através da indução da expressão do VEGF (Tsuji et al., 1998), os autores explicam que esta ausência de correlação no CEB pode ser de natureza tumor-específica ou órgão-específica, o que consideramos uma explicação bastante razoável e que se aplica ao nosso trabalho. Hemmerlein et al. (2004), que utilizaram o CD31 para marcar vasos e estudaram a COX-2 em carcinomas renais, também não encontraram correlação entre expressão de COX-2 e DMV. Eles afirmam que isto pode ser explicado em parte pelo fato de regiões pobres em vasos sanguíneos nos tumores serem geralmente relacionadas com áreas necróticas, o que aumenta a infiltração de macrófagos, principais secretores de COX-2 no interstício.

Também não observamos correlação entre a expressão da COX-2 e o índice proliferativo medido pelo Ki-67, um resultado semelhante ao de Yoshida et al. (2007), que investigaram os dois marcadores por imunohistoquímica em tumores benignos e malignos de ovário. A afirmação destes autores de que a COX-2, embora esteja relacionada com a carcinogênese, deve neste caso transitar por mecanismos patogênicos que não a promoção da proliferação celular, nos parece adequada e aplicável aos nossos resultados. A COX-2 interfere no crescimento e disseminação tumoral não apenas através da estimulação da mitogênese (Coffey et al., 1997), mas estimulando angiogênese (Tsuji et al., 1998),

diminuindo a expressão de moléculas de adesão (Rao et al., 2006), auxiliando a célula na resistência à apoptose (Tsuji & Dubois, 1995), aumentando o potencial de invasividade pela indução de metaloproteinases (Tsuji et al., 1997) e mediando imunossupressão (Sheehan et al., 2005). Parece-nos que um ou mais desses mecanismos possam estar envolvidos na carcinogênese oral mediada pela COX-2.

Nossos resultados apontaram altos índices de Ki67 nos tumores moderadamente e pobremente diferenciados, ou seja, naqueles que apresentam um maior número de alterações celulares e pior prognóstico, no entanto não encontramos correlação entre a expressão do Ki67 e da COX-2, uma vez que esta última apresentou em nosso estudo expressão elevada na maior parte dos tumores, independente do grau de diferenciação. Esses achados corroboram com os de Mao et al. (2006), que observaram em tumores pulmonares de fumantes ativos um decréscimo no índice proliferativo medido pelo Ki67 após utilização de um inibidor de COX-2, sem redução significativa na expressão imunohistoquímica da enzima, embora eles afirmem que o decréscimo na proliferação se relacione com a inibição da enzima.

A questão de se a COX-2 está relacionada com o prognóstico dos tumores ou não é extremamente contundente dentro da literatura. Alguns autores acreditam que a enzima interfere na iniciação, transformação, progressão e metástase do câncer (Pandey et al., 2008); outros associam sua expressão apenas com a iniciação da carcinogênese (Yu et al., 2003; Shibata et al., 2005); enquanto outros a relacionam preferencialmente com a disseminação à distância (Bianchini et al., 2007).

Em se tratando restritamente de câncer oral, autores afirmam que o prognóstico da lesão não está na dependência dos níveis de COX-2 porque estes não se relacionam com o grau de diferenciação ou estágio dos tumores (Pandey et al., 2008). Os trabalhos que

demonstraram diferença na expressão da COX-2 estabeleceram comparação do CEB com tecido sadio e displasias (Shibata et al., 2005). Portanto, nossos dados estão de acordo com os resultados publicados até então.

A expressão da COX-2 é pouco estudada em tumores de origem não epitelial (Sheehan et al., 2003), inclusive Comunoğlu et al. (2007) raramente encontraram expressão imunohistoquímica da enzima em estudo realizado com leiomiomas e leiomiosarcomas do útero, ressaltando a impossibilidade de considerar a COX-2 como alvo importante no tratamento ou prevenção destas lesões. No entanto, a validade prognostica da COX-2 relatada em diversos estudos tem levado à sua utilização como importante alvo para a quimioprevenção e tratamento de alguns tipos de neoplasia de origem epitelial em humanos (Akita et al., 2004). O papel dos inibidores farmacológicos de COX-2 em neoplasias malignas de natureza epitelial já está bem definido e a utilização de terapias envolvendo esta enzima tem crescido consideravelmente (Cuendete & Pezzuto, 2000), embora nem todos os grupos de populações humanas possuam acesso a esta modalidade de tratamento. Inibição ou bloqueio da COX-2 podem ser realizados através da ligação do seu sítio ativo com determinadas drogas, como a aspirina ou antiinflamatórios não-esteróides, a exemplo do *celecoxib* e do *rofecocib*, na imunoterapia primária, na terapia complementar para prevenir a recorrência de determinados cânceres ou como agente preventivo na redução do risco para o desenvolvimento da doença (Ma et al., 2002; Lang et al., 2007).

Nosso trabalho apresentou um dado intrigante, que foi a elevação com extrema relevância estatística nos níveis de Ki-67 nos pacientes melanodermas. Podemos afirmar, então, que os afro-descendentes da nossa amostra apresentaram um padrão mais agressivo de tumores, uma vez que o Ki67 está associado ao grau de diferenciação das lesões, significativamente mais elevado nas lesões moderadas e pouco diferenciadas.

Curiosamente, todos os indivíduos melanodermas da nossa amostra apresentaram tumores moderadamente diferenciados, os quais apresentaram no nosso trabalho níveis mais elevados de proliferação celular e de DMV até mesmo em relação aos tumores pobremente diferenciados.

Trabalhos na literatura que investigaram raça ou etnia em relação ao câncer oral já encontraram maior incidência (Liu et al, 2008) ou pior prognóstico em negros, quando comparados com brancos, por exemplo, nos EUA (Arbes et al. 1999, Shiboski et al, 2007). Moore et al. (2001) investigaram a raça como fator prognóstico em 909 americanos brancos e africanos tratados de CEB e carcinoma de orofaringe, encontrando significativa diminuição no índice de sobrevivência nos afro-descendentes, mesmo sendo a amostra constituída de apenas 10% deles. Segundo Shiboski et al (2007) a possível explicação para os afro-descendentes de sua amostra apresentarem menor grau de sobrevida residiria nas diferenças de possibilidade de acesso e utilização dos serviços de saúde em relação aos brancos. Arbes et al. (1999) relaciona piores prognósticos encontrados em seu trabalho para os negros a diferenças no status sócio-econômico e no tratamento recebido. Liu et al. (2008) por outro lado, que analisaram uma amostra mais heterogênea, acreditam que nas discrepâncias para incidência de CEB em relação às diversas raças e etnias residem em diferenças culturais e de comportamento em relação ao hábito de fumar ou de consumir bebidas alcoólicas, o que já foi observado por Warnakulasuriya et al. (2005). Embora Liu et al. (2008) não descartem diferenças sócio-econômicas entre negros e brancos, eles observaram que estatísticas realizadas no ano de 2002 nos EUA apontaram uma maior prevalência no hábito de fumar entre os americanos afro-descendentes em relação aos hispânicos, asiáticos e brancos não-hispânicos, tanto para mulheres quanto para homens, o que Moore et al. (2001) também afirmam.

Um aspecto interessante é que tanto o hábito de fumar quanto o de ingerir bebidas alcoólicas são inversamente relacionados ao o nível de instrução, de acesso à informação e de recursos financeiros do indivíduo (Liu et al., 2008). Isto poderia explicar, em parte, os nossos resultados, uma vez que os afro-descendentes, tanto da Bahia quanto do Rio de Janeiro, apresentam recursos inferiores e diferenças sócio-econômicas relevantes em relação ao restante da população. Ademais, os mais pobres apresentam, além de menor acesso aos serviços de saúde, menos informações sobre auto-exames e formas de prevenção de doenças (Petti & Scully, 2007).

Disparidades na saúde se constituem num problema de todos os países em desenvolvimento. Mesmo admitindo-se que existem subgrupos de pessoas nos quais os cuidados com a saúde oral são precários, como viajantes, prisioneiros, mendigos e portadores de deficiências físicas e mentais, as diferenças nos níveis de saúde ao longo dos diversos grupos sócio-econômicos são claras e marcantes (Crombie et al., 2005). As ações em saúde para o câncer oral devem levar em consideração estas importantes dissidências (Kingsley et al., 2008).

Considerando-se que o aumento na incidência global de câncer de boca acarreta, entre outras, implicações de natureza econômica, o desenvolvimento de estratégias preventivas para o combate à doença, que é viabilizado através de pesquisas envolvendo as bases moleculares do câncer, além de melhorar a qualidade de vida de milhares de pessoas em todo o mundo, apresenta relevante papel também desonerando os serviços públicos de saúde (Conway et al., 2006).

É importante ressaltar que, a despeito de todos os avanços obtidos até então pelas pesquisas envolvendo investigação de proteínas no CEB, se constitui em grande desafio estabelecer para esta patologia um perfil molecular definido, devido a sua complexa

patogênese e às inúmeras alterações nos diversos sistemas de controle celular necessárias para que ela se estabeleça.

7. CONCLUSÃO

Com base nos dados aqui apresentados e discutidos, podemos concluir que:

- 1- O índice de proliferação dos tumores, medido pelo Ki-67, mostrou-se associado ao seu grau histológico de malignidade, sugerindo sua importância como valor prognóstico para o CEB.
- 2- A DMV se mostrou associada ao grau histológico de malignidade dos tumores, sugerindo sua importância como valor prognóstico para o CEB.
- 3- A densidade de macrófagos, embora elevada, não se mostrou associada ao grau histológico de malignidade dos CEBs, sugerindo que estas células desempenham papel nos diversos estágios da carcinogênese oral.
- 4- Uma elevação na expressão da COX-2 está presente em CEBs *in situ* ou invasivos independente do grau de diferenciação, sugerindo que esta oncoproteína está relacionada, no câncer oral, aos diversos estágios da carcinogênese.
- 5- Proliferação celular, DMV, presença de macrófagos e expressão de COX-2 parecem não estar correlacionadas entre si no CEB.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

Abdollahi A, Hlatky L, Huber PE. Endostatin: the logic of antiangiogenic therapy. *Drug Resist Updat*. 2005; 8(1-2):59-74.

Akita Y, Kozaki K, Nakagawa A, Saito T, Ito S, Tamada Y, Fujiwara S, Nishikawa N, Uchida K, Yoshikawa K, Noguchi T, Miyaishi O, Shimozato K, Saga S, Matsumoto Y. Cyclooxygenase-2 is a possible target of treatment approach in conjunction with photodynamic therapy for various disorders in skin and oral cavity. *Br J Dermatol*. 2004; 1(2):472-80.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: Artmed, 2004.

Albuquerque RL Jr, Miguel MC, Costa AL, Souza LB. Correlation of c-erbB-2 and S-100 expression with the malignancy grading and anatomical site in oral squamous cell carcinoma. *Int J Exp Pathol*. 2003; 84(6):259-65.

Allavena P, Sica A, Solinas G, Porta C, Mantovani A. The inflammatory micro-environment in tumor progression: the role of tumor-associated macrophages. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2008; 66(1):1-9.

Al-Rawi MA, Watkins G, Mansel RE, Jiang WG. Interleukin 7 upregulates vascular endothelial growth factor D in breast cancer cells and induces lymphangiogenesis in vivo. *Br J Surg*. 2005; 92(3):305-10.

Alvarez Gómez GJ, Alvarez Martínez E, Jiménez Gómez R, Mosquera Silva Y, Gaviria Núñez AM, Garcés Agudelo A, Alonso Duque A, Zabala Castaño A, Echeverri González E, Isaac Millán M, Ramírez Ossa D. Reverse smokers's and changes in oral mucosa. Department of Sucre, Colômbia. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008; 13(1):1-8.

Anneroth G, Batsakis JG, Luna M. Malignancy grading of squamous cell carcinoma in the floor of the mouth related to clinical evaluation. *Scand J Dent Res*. 1986; 94(4):347-56.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*. 1987; 95(3):229-49.

Anneroth G, Hansen LS. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. *Scand J Dent Res*. 1984; 92(5):448-68.

Anneroth G, Hansen LS, Silverman S Jr. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. I. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. *J Oral Pathol.* 1986; 15(3):162-8.

Arbes SJ Jr, Olshan AF, Caplan DJ, Schoenbach VJ, Slade GD, Symons MJ. Factors contributing to the poorer survival of black Americans diagnosed with oral cancer (United States). *Cancer Causes Control.* 1999; 10(6):513-23.

Artese L, Rubini C, Ferrero G, Fioroni M, Santinelli A, Piattelli A. Microvessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor expression (VEGF) in human oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2001; 21(1B):689-95.

Asahara T, Isner JM. Endothelial progenitor cells for vascular regeneration. *J Hematother Stem Cell Res.* 2002;11(2):171-8.

Atula, T.; Hedstrom, J.; Ristimaki, A.; Finne, P.; Leivo, I.; Markkanen-Leppanen, M.; Haglund, C. Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity and pharynx: association to p53 and clinical outcome. *Oncol Rep.* 2006; 16(3):485-490.

Axelsson K, Ljung BM, Moore DH 2nd, Thor AD, Chew KL, Edgerton SM, Smith HS, Mayall BH. Tumor angiogenesis as a prognostic assay for invasive ductal breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 1995; 87(13):997-1008.

Azenshtein E, Luboshits G, Shina S, Neumark E, Shahbazian D, Weil M, Wigler N, Keydar I, Ben-Baruch A. The CC chemokine RANTES in breast carcinoma progression: regulation of expression and potential mechanisms of promalignant activity. *Cancer Res.* 2002; 62(4):1093-102.

Baglole CJ, Ray DM, Bernstein SH, Feldon SE, Smith TJ, Sime PJ, Phipps RP. More than structural cells, fibroblasts create and orchestrate the tumor microenvironment. *Immunol Invest.* 2006;35(3-4):297-325.

Barnes L.; Eveson, J. W.; Reichart, P.; Sidransky, D.; World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.

Bell RB, Kademani D, Homer L, Dierks EJ, Potter BE. Tongue cancer: Is there a difference in survival compared with other subsites in the oral cavity? *J Oral Maxillofac Surg.* 2007;65(2):229-36.

Bernasconi S, Peri G, Sironi M, Mantovani A. Involvement of leukocyte (beta 2) integrins (CD18/CD11) in human monocyte tumoricidal activity. *Int J Cancer.* 1991;49(2):267-73.

Bianchini F, Massi D, Marconi C, Franchi A, Baroni G, Santucci M, Mannini A, Mugnai G, Calorini L. Expression of cyclo-oxygenase-2 in macrophages associated with cutaneous melanoma at different stages of progression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2007; 83(4):320-8.

Bonizzi G, Karin M. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 2004; 25(6):280-8.

Brandes D, Anton E. An electron microscopic cytochemical study of macrophages during uterine involution. *J Cell Biol.* 1969; 41(2):450-61.

Brandwein-Gensler, M.; Teixeira, M. S.; Lewis, C. M.; Lee, B.; Rolnitzky, L.; Hille, J. J. 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.* 2005; 29(2):167-78.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005. 94p

Broders, AC. The microscopic grading of cancer. *Surg Clin North Am.* 1941; 21(4):947-62.
Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology.* 2002; 40(1):2-11.

Brun E, Zätterström U, Kjellén E, Wahlberg P, Willén R, Brun A, Perfekt R, Tennvall J. Prognostic value of histopathological response to radiotherapy and microvessel density in oral squamous cell carcinomas. *Acta Oncol.* 2001; 40(4):491-6.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1989; 18(8):432-7.

Cadden IS, Atkinson AB, Johnston BT, Pogue K, Connolly R, McCance D, Ardill JE, Russell CF, McGinty A. Cyclooxygenase-2 expression correlates with pheochromocytoma malignancy: evidence for a Bcl-2-dependent mechanism. *Histopathology.* 2007; 51(6):743-51.

Calvin DP, Hammond ME, Pajak TF, Trotti AM, Meredith RF, Rotman M, Jones CU, Byhardt RW, Demas WF, Ang KK, Fu KK; Radiation Therapy Oncology Group 90-03 Trial. Microvessel density ≥ 60 does not predict for outcome after radiation treatment for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: results of a correlative study from the Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 90-03 Trial. *Am J Clin Oncol.* 2007; 30(4):406-19.

Carmeliet P. Manipulating angiogenesis in medicine. *J Intern Med.* 2004; 255(5):538-61.

Carmeliet P. Angiogenesis in life, disease and medicine. *Nature.* 2005; 438(7070):932-6.

Carvalho AL, Singh B, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head Neck*. 2004; 26(1):31-8.

Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schlüter C, Galle J, Gerdes J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol*. 1992; 168(4):357-63.

Chan CM, Ma BB, Hui EP, Wong SC, Mo FK, Leung SF, Kam MK, Chan AT. Cyclooxygenase-2 expression in advanced nasopharyngeal carcinoma--a prognostic evaluation and correlation with hypoxia inducible factor 1alpha and vascular endothelial growth factor. *Oral Oncol*. 2007; 43(4):373-8.

Chan JK. Advances in immunohistochemistry: impact on surgical pathology practice. *Semin Diagn Pathol*. 2000; 17(3):170-7.

Chapple KS, Scott N, Guillou PJ, Coletta PL, Hull MA. Interstitial cell cyclooxygenase-2 expression is associated with increased angiogenesis in human sporadic colorectal adenomas. *J Pathol*. 2002; 198(4):435-41.

Chen JJ, Yao PL, Yuan A, Hong TM, Shun CT, Kuo ML, Lee YC, Yang PC. Up-regulation of tumor interleukin-8 expression by infiltrating macrophages: its correlation with tumor angiogenesis and patient survival in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2003; 9(2):729-37.

Cho NP, Han HS, Soh Y, Son HJ. Overexpression of cyclooxygenase-2 correlates with cytoplasmic HuR expression in salivary mucoepidermoid carcinoma but not in pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med*. 2007; 36(5):297-303.

Choi KK, Kim MJ, Yun PY, Lee JH, Moon HS, Lee TR, Myoung H. Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults. *Oral Oncol*. 2006; 42(2):208-17.

Classificação Internacional de Doenças (CID-10), adaptada pela 43.^a Assembleia Mundial de Saúde em 17 de Maio de 1990. Genebra, 1990.

Cleaver O, Melton DA. Endothelial signaling during development. *Nat Med*. 2003; 9(6):661-8.

Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L, Graves-Deal R, Daniel VC, Dempsey PJ, Chinery R, Kirkland SC, DuBois RN, Jetton TL, Morrow JD. Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997; 94(2):657-62.

Comunoğlu NU, Durak H, Comunoğlu C, Ekici AI, Ozkan F, Akyildiz EU, Ilvan S, Calay Z, Molinas N. Expression of cyclooxygenase-2, c-kit, progesterone and estrogen receptors in uterine smooth muscle tumors: differential diagnosis. *APMIS*. 2007; 115(6):726-35.

Conway DI, Stockton DL, Warnakulasuriya KA, Ogden G, Macpherson LM. Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) -- recent trends and regional variation. *Oral Oncol*. 2006; 42(6):586-92.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002; 420(6917):860-7.

Crombie IK, Irvine L, Elliott L, Wallace H, editors. Closing the health inequalities gap: an international perspective. Copenhagen: World Health Organization Regional Office for Europe; 2005.

Cuendet M, Pezzuto JM. The role of cyclooxygenase and lipoxygenase in cancer chemoprevention. *Drug Metabol Drug Interact*. 2000; 17(1-4):109-57.

Dantas DD, Ramos CC, Costa AL, Souza LB, Pinto LP. Clinical-pathological parameters in squamous cell carcinoma of the tongue. *Braz Dent J*. 2003;14(1):22-5.

De Aguiar AF Jr, Kowalski LP, de Almeida OP. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. *Oral Oncol*. 2007; 43(6):593-601.

Dohadwala M, Yang SC, Luo J, Sharma S, Batra RK, Huang M, Lin Y, Goodglick L, Krysan K, Fishbein MC, Hong L, Lai C, Cameron RB, Gemmill RM, Drabkin HA, Dubinett SM. Cyclooxygenase-2-dependent regulation of E-cadherin: prostaglandin E(2) induces transcriptional repressors ZEB1 and snail in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2006; 15;66(10):5338-45.

DuBois RN, Tsujii M, Bishop P, Awad JA, Makita K, Lanahan A. Cloning and characterization of a growth factor-inducible cyclooxygenase gene from rat intestinal epithelial cells. *Am J Physiol*. 1994; 266(5 Pt 1):G822-7.

Fernández MM, García-Rozado A, Parente PL. [Is microvascular density an independent prognostic factor in squamous cell carcinoma of the tongue?]. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2007; 58(8):341-6.

Fischer C, Jonckx B, Mazzone M, Zacchigna S, Loges S, Pattarini L, Chorianopoulos E, Liesenborghs L, Koch M, De Mol M, Autiero M, Wyns S, Plaisance S, Moons L, van Rooijen N, Giacca M, Stassen JM, Dewerchin M, Collen D, Carmeliet P. Anti-PIGF inhibits growth of VEGF(R)-inhibitor-resistant tumors without affecting healthy vessels. *Cell*. 2007; 131(3):463-75.

Folkman J. New perspectives in clinical oncology from angiogenesis research. *Eur J Cancer*. 1996; 32A(14):2534-9.

Folkman, J. Angiogenesis. *Annual Review of Medicine*. 2006; 57:1-18.

Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, Fava AS, Torloni H. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer*. 1989; 43(6):992-1000.

Gabriel HE, Liu Z, Crott JW, Choi SW, Song BC, Mason JB, Johnson EJ. A comparison of carotenoids, retinoids, and tocopherols in the serum and buccal mucosa of chronic cigarette smokers versus nonsmokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006; 15(5):993-9.

Gasparini G, Harris AL. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. *J Clin Oncol*. 1995; 13(3):765-82.

Gasparini G, Toi M, Verderio P, Ranieri G, Dante S, Bonoldi E, Boracchi P, Fanelli M, Tominaga T. Prognostic significance of p53, angiogenesis, and other conventional features in operable breast cancer: subanalysis in node-positive and node-negative patients. *Int J Oncol*. 1998; 12(5):1117-25.

Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol*. 1990; 1(3):199-206.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol*. 1984; 133(4):1710-5.

Gervásio OL, Dutra RA, Tartaglia SM, Vasconcellos WA, Barbosa AA, Aguiar MC. Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. *Braz Dent J*. 2001; 12(1):57-61.

Gleich LL, Biddinger PW, Duperier FD, Gluckman JL. Tumor angiogenesis as a prognostic indicator in T2-T4 oral cavity squamous cell carcinoma: a clinical-pathologic correlation. *Head Neck*. 1997; 19(4):276-80.

Goodwin JS, Ceuppens J. Regulation of the immune response by prostaglandins. *J Clin Immunol*. 1983; 3(4):295-315.

Gupta PC, Mehta FS, Daftary DK, Pindborg JJ, Bhonsle RB, Jalnawalla PN, Sinor PN, Pitkar VK, Murti PR, Irani RR, Shah HT, Kadam PM, Iyer KS, Iyer HM, Hegde AK, Chandrashekar GK, Shiroff BC, Sahiar BE, Mehta MN. Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1980; 8(6):283-333.

Guttman D, Stern Y, Shpitzer T, Ulanovski D, Druzd T, Feinmesser R. Expression of MMP-9, TIMP-1, CD-34 and factor-8 as prognostic markers for squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol*. 2004; 40(8):798-803.

Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, Trümper L, Balkwill FR, Binder C Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis*. 2004; 25(8):1543-9.

Hall PA, Going JJ. Predicting the future: a critical appraisal of cancer prognosis studies. *Histopathology*. 1999; 35(6):489-94.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000; 100(1):57-70.

Harrold CC Jr. Management of cancer of the floor of the mouth. *Am J Surg*. 1971; 122(4):487-93.

Hashibe M, Straif K, Tashkin DP, Morgenstern H, Greenland S, Zhang ZF. Epidemiologic review of marijuana use and cancer risk. *Alcohol*. 2005; 35(3):265-75.

Hemmerlein B, Galuschka L, Putzer N, Zischkau S, Heuser M. Comparative analysis of COX-2, vascular endothelial growth factor and microvessel density in human renal cell carcinomas. *Histopathology*. 2004; 45(6):603-11.

Hindle I, Downer MC, Moles DR, Speight PM. Is alcohol responsible for more intra-oral cancer? *Oral Oncol*. 2000; 36(4):328-33.

Högmo A, Kuylenstierna R, Lindholm J, Munck-Wikland E. Predictive value of malignancy grading systems, DNA content, p53, and angiogenesis for stage I tongue carcinomas. *J Clin Pathol*. 1999; 52(1):35-40.

Horak ER, Leek R, Klenk N, LeJeune S, Smith K, Stuart N, Greenall M, Stepniewska K, Harris AL. Angiogenesis, assessed by platelet/endothelial cell adhesion molecule antibodies, as indicator of node metastases and survival in breast cancer. *Lancet*. 1992; 340(8828):1120-4.

Hotchkiss KA, Ashton AW, Klein RS, Lenzi ML, Zhu GH, Schwartz EL. Mechanisms by which tumor cells and monocytes expressing the angiogenic factor thymidine phosphorylase mediate human endothelial cell migration. *Cancer Res*. 2003; 63(2):527-33.

Huang CH, Chu ST, Ger LP, Hou YY, Sun CP. Clinicopathologic evaluation of prognostic factors for squamous cell carcinoma of the buccal mucosa. *J Chin Med Assoc*. 2007; 70(4):164-70.

Huang ZF, Massey JB, Via DP. Differential regulation of cyclooxygenase-2 (COX-2) mRNA stability by interleukin-1 beta (IL-1 beta) and tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in human in vitro differentiated macrophages. *Biochem Pharmacol*. 2000; 59(2):187-94.

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Censo 2000. Disponível em: www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao. Acesso em 20 de março de 2008, 16:45:05

Jakobsson P. A.; Eneroth, G. M.; Killander, D.; Moberger, G.; Artenson, B. Histologic classification and gradin of malignancy in carcinoma of the larynx (a pilot study). *Acta Radiol Ther Phys Biol.* 1973; 12(1): 1-8.

Jin YT, Myers J, Tsai ST, Goepfert H, Batsakis JG, el-Naggar AK. Genetic alterations in oral squamous cell carcinoma of young adults. *Oral Oncol.* 1999; 35(3):251-6.

Jones A. The molecular cell biology of head and neck cancer with clinical applications. Section 1: Fundamental biology and the basis of cancer. *Clin Otolaryngol Allied Sci.* 2004; 29(5):475-91.

Jones MK, Wang H, Peskar BM, Levin E, Itani RM, Sarfeh IJ, Tarnawski AS. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. *Nat Med.* 1999; 5(12):1418-23.

Kademani D, Baltali E, Lewis J, Keller E. Analysis of death certification in patients with early stage oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65(6):1191-7.

Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(6):422-33.

Katori, H.; Nozawa, A.; Tsukuda, M. Increased expression of cyclooxygenase-2 and Ki-67 are associated with malignant transformation of pleomorphic adenoma. *Auris Nasus Larynx.* 2007; 34(1):79-84.

Keski-Säntti H, Atula T, Tikka J, Hollmén J, Mäkitie AA, Leivo I. Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral Oncol.* 2007; 43(10):1007-13.

Kim MM, Glazer CA, Mambo E, Chatterjee A, Zhao M, Sidransky D, Califano JA. Head and neck cancer cell lines exhibit differential mitochondrial repair deficiency in response to 4NQO. *Oral Oncol.* 2006; 42(2):201-7.

Kim SJ, Shin HJ, Jung KY, Baek SK, Shin BK, Choi J, Kim BS, Shin SW, Kim YH, Kim JS, Oosterwijk E. Prognostic value of carbonic anhydrase IX and Ki-67 expression in squamous cell carcinoma of the tongue. *Jpn J Clin Oncol.* 2007; 37(11):812-9.

Kimura YN, Watari K, Fotovati A, Hosoi F, Yasumoto K, Izumi H, Kohno K, Umezawa K, Iguchi H, Shirouzu K, Takamori S, Kuwano M, Ono M. Inflammatory stimuli from macrophages and cancer cells synergistically promote tumor growth and angiogenesis. *Cancer Sci.* 2007; 98(12):2009-18.

Kingsley K, O'Malley S, Ditmyer M, Chino M. Analysis of oral cancer epidemiology in the US reveals state-specific trends: implications for oral cancer prevention BMC Public Health. 2008; 8(1):87.

Kujan O, Khattab A, Oliver RJ, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. Oral Oncol. 2007; 43(3):224-31.

Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, Lim RW, Herschman HR. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. J Biol Chem. 1991; 266(20):12866-72.

KUMAR V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO N. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 7 ed. Philadelphia: Elsevier. 2005.

Kuratomi K, Yano H, Tsuneoka M, Sakamoto K, Kusukawa J, Kojiro M. Immunohistochemical expression of p53 and Ki67 proteins in human primary gingival squamous cell carcinoma. Kurume Med J. 2006; 53(3-4):71-8.

La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. Oral Oncol. 1997; 33(5):302-12.

Lam L, Logan RM, Luke C, Rees GL. Retrospective study of survival and treatment pattern in a cohort of patients with oral and oropharyngeal tongue cancers from 1987 to 2004. Oral Oncol. 2007; 43(2):150-8.

Lang S, Tiwari S, Andratschke M, Loehr I, Lauffer L, Bergmann C, Mack B, Lebeau A, Moosmann A, Whiteside TL, Zeidler R. Immune restoration in head and neck cancer patients after in vivo COX-2 inhibition. Cancer Immunol Immunother. 2007; 56(10):1645-52.

LARSSON, L-I. **Immunocytochemistry: Theory and Practice**. Florida: CRC Press, 2000.

Lee S, Chen TT, Barber CL, Jordan MC, Murdock J, Desai S, Ferrara N, Nagy A, Roos KP, Iruela-Arispe ML. Autocrine VEGF signaling is required for vascular homeostasis. Cell. 2007; 130(4):691-703.

Leong TY, Leong AS. How does antigen retrieval work? Adv Anat Pathol. 2007; 14(2):129-31.

Lewis JS, Landers RJ, Underwood JC, Harris AL, Lewis CE. Expression of vascular endothelial growth factor by macrophages is up-regulated in poorly vascularized areas of breast carcinomas. J Pathol. 2000; 192(2):150-8.

Li W, Ding F, Zhang L, Liu Z, Wu Y, Luo A, Wu M, Wang M, Zhan Q, Liu Z. Overexpression of stefin A in human esophageal squamous cell carcinoma cells inhibits

tumor cell growth, angiogenesis, invasion, and metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005; 11(24 Pt 1):8753-62.

Lim SC, Zhang S, Ishii G, Endoh Y, Kodama K, Miyamoto S, Hayashi R, Ebihara S, Cho JS, Ochiai A. Predictive markers for late cervical metastasis in stage I and II invasive squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res.* 2004; 10(1 Pt 1):166-72.

Lin EY, Nguyen AV, Russell RG, Pollard JW. Colony-stimulating factor 1 promotes progression of mammary tumors to malignancy. *J Exp Med.* 2001; 193(6):727-40.

Lingen M, Sturgis EM, Kies MS. Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers: clinical and biologic characteristics and implications for management. *Curr Opin Oncol.* 2001; 13(3):176-82.

Liu L, Kumar SK, Sedghizadeh PP, Jayakar AN, Shuler CF. Oral squamous cell carcinoma incidence by subsite among diverse racial and ethnic populations in California. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105(4):470-80.

Liu SY, Chang LC, Pan LF, Hung YJ, Lee CH, Shieh YS. Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2008; 44(3):277-85.

Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review . *Oral Oncol.* 2001;37(5):401-18.

Lutfiyya MN, Shah KK, Johnson M, Bales RW, Cha I, McGrath C, Serpa L, Lipsky MS. Adolescent daily cigarette smoking: is rural residency a risk factor? *Rural Remote Health.* 2008; (1): 875.

Ma L, del Soldato P, Wallace JL. Divergent effects of new cyclooxygenase inhibitors on gastric ulcer healing: Shifting the angiogenic balance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002; 99(20):13243-7.

Mackenzie J, Ah-See K, Thakker N, Sloan P, Maran AG, Birch J, Macfarlane GJ . Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? *Oral Oncol.* 2000; 36(4):387-9.

Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Onoda N, Sawada T, Kato Y, Nitta A, Arimoto Y, Kondo Y, et al Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *Br J Cancer.* 1995; 72(2):319-23.

Magdelénat H. Tumour markers in oncology: past, present and future. *J Immunol Methods.* 1992; 150(1-2):133-43.

Maniotis AJ, Folberg R, Hess A, Seftor EA, Gardner LM, Pe'er J, Trent JM, Meltzer PS, Hendrix MJ. Vascular channel formation by human melanoma cells in vivo and in vitro: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol.* 1999;155(3):739-52.

Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. *Immunol Today.* The origin and function of tumor-associated macrophages. 1992; 13(7):265-70.

Mantovani A, Schioppa T, Biswas SK, Marchesi F, Allavena P, Sica A. Tumor-associated macrophages and dendritic cells as prototypic type II polarized myeloid populations. *Tumori.* 2003; 89(5):459-68.

Mantovani A, Marchesi F, Porta C, Sica A, Allavena P. Inflammation and cancer: breast cancer as a prototype. *Breast.* 2007; 16 Suppl 2:S27-33.

Mao JT, Fishbein MC, Adams B, Roth MD, Goodglick L, Hong L, Burdick M, Strieter ER, Holmes C, Tashkin DP, Dubinett SM. Celecoxib decreases Ki-67 proliferative index in active smokers. *Clin Cancer Res.* 2006; 12(1):314-20.

Marcus B, Arenberg D, Lee J, Kleer C, Chepeha DB, Schmalbach CE, Islam M, Paul S, Pan Q, Hanash S, Kuick R, Merajver SD, Teknos TN . Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer.* 2004; 101(12):2779-87.

Martin L, Green B, Renshaw C, Lowe D, Rudland P, Leinster SJ, Winstanley J. Examining the technique of angiogenesis assessment in invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 1997;76(8):1046-54.

Masuda M, Ruan HY, Ito A, Nakashima T, Toh S, Wakasaki T, Yasumatsu R, Kutratomi Y, Komune S, Weinstein IB. Signal transducers and activators of transcription 3 up-regulates vascular endothelial growth factor production and tumor angiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2007; 43(8):785-90.

Mighell AJ, Hume WJ, Robinson PA. An overview of the complexities and subtleties of immunohistochemistry. *Oral Dis.* 1998;4(3):217-23.

Minden A, Karin M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1997;1333(2):F85-104.

Moore RJ, Doherty DA, Do KA, Chamberlain RM, Khuri FR. Racial disparity in survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and pharynx. *Ethn Health.* 2001; 6(3-4):165-77.

Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of mouth cancer: a review of global incidence. *Oral Dis.* 2000; 6(2):65-74

Moore TO, Moore AY, Carrasco D, Vander Straten M, Arany I, Au W, Tyring SK. Human papillomavirus, smoking, and cancer. 2001; 5(4):323-8.

Moreno-López LA, Esparza-Gómez GC, González-Navarro A, Cerero-Lapiedra R, González-Hernández MJ, Domínguez-Rojas V. Risk of oral cancer associated with tobacco smoking, alcohol consumption and oral hygiene: a case-control study in Madrid, Spain. *Oral Oncol.* 2000;36(2):170-4.

Morphopoulos G, Pearson M, Ryder WD, Howell A, Harris M. Tumour angiogenesis as a prognostic marker in infiltrating lobular carcinoma of the breast. *J Pathol.* 1996; 180(1):44-9.

Murdoch C, Giannoudis A, Lewis CE. Mechanisms regulating the recruitment of macrophages into hypoxic areas of tumors and other ischemic tissues. *Blood.* 2004; 104(8):2224-34.

Naito M. Macrophage differentiation and function in health and disease. *Pathol Int.* 2008;58(3):143-55.

Nakashima E, Mukaida N, Kubota Y, Kuno K, Yasumoto K, Ichimura F, Nakanishi I, Miyasaka M, Matsushima K. Human MCAF gene transfer enhances the metastatic capacity of a mouse cachectic adenocarcinoma cell line in vivo. *Pharm Res.* 1995; 12(11):1598-604.

Nemes JA, Redl P, Boda R, Kiss C, Márton IJ . Oral Cancer Report from Northeastern Hungary. *Pathol Oncol Res.* 2008 [In Press].

Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002; 52(4):195-215.

Nijsten T, Colpaert CG, Vermeulen PB, Harris AL, Van Marck E, Lambert J. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases. *Br J Dermatol.* 2004;151(4):837-45.

Nolan RD, Danilowicz RM, Eling TE. Role of arachidonic acid metabolism in the mitogenic response of BALB/c 3T3 fibroblasts to epidermal growth factor. *Mol Pharmacol.* 1988;33(6):650-6.

Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. Risk of head and neck cancer and the alcohol dehydrogenase 3 genotype. *Carcinogenesis.* 2001;22(1):57-61.

O'Reilly MS. Angiostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and of tumor growth. *EXS.* 1997;79:273-94.

O'Reilly MS, Boehm T, Shing Y, Fukai N, Vasios G, Lane WS, Flynn E, Birkhead JR, Olsen BR, Folkman J. Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell.* 1997;88(2):277-85.

Pandey M, Prakash O, Santhi WS, Soumithran CS, Pillai RM. Overexpression of COX-2 gene in oral cancer is independent of stage of disease and degree of differentiation. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008; 37(4):379-83.

Pannone G, Sanguedolce F, De Maria S, Farina E, Lo Muzio L, Serpico R, Emanuelli M, Rubini C, De Rosa G, Staibano S, Macchia L, Bufo P. Cyclooxygenase isozymes in oral squamous cell carcinoma: a real-time RT-PCR study with clinic pathological correlations. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2007; 20(2):317-24.

Parkin, D.M.; Whelan, S.L.; Ferlay, J.; Storm, H. Cancer incidence in five continents. Lyon (France):IARC; 2005 (Scientific Publications IARC Cancer Base No. 7).

Pazouki S, Chisholm DM, Adi MM, Carmichael G, Farquharson M, Ogden GR, Schor SL, Schor AM. The association between tumour progression and vascularity in the oral mucosa. *J Pathol*. 1997; 183(1):39-43.

Petti S, Scully C. Oral cancer knowledge and awareness: primary and secondary effects of an information leaflet. *Oral Oncol*. 2007 ;43(4):408-15.

Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. *Ann Oncol*. 2004;15(9):1319-29.

Pina A, Bernardino S, Calich VL. Alveolar macrophages from susceptible mice are more competent than those of resistant mice to control initial *Paracoccidioides brasiliensis* infection. *J Leukoc Biol*. 2008; 83(5):1088-99.

Polverini PJ, Leibovich SJ. Induction of neovascularization in vivo and endothelial proliferation in vitro by tumor-associated macrophages. *Lab Invest*. 1984; 51(6):635-42.

Polverini PJ, Leibovich SJ. Induction of neovascularization and nonlymphoid mesenchymal cell proliferation by macrophage cell lines. *J Leukoc Biol*. 1985; 37(3):279-88.

Pugh CW, Ratcliffe PJ. The von Hippel-Lindau tumor suppressor, hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) degradation, and cancer pathogenesis. *Semin Cancer Biol*. 2003; 13(1):83-9.

Rao DS, Gui D, Koski ME, Popoviciu LM, Wang H, Reiter RE, Said JW. An inverse relation between COX-2 and E-cadherin expression correlates with aggressive histologic features in prostate cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2006; 14(4):375-83.

Renan MJ. How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. *Mol Carcinog*. 1993;7(3):139-46.

Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature*. 1997; 386(6626):671-4.

Risau W. Angiogenesis is coming of age. *Circ Res*. 1998; 82(8):926-8.

Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:73-91.

Rundhaug, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. *J.Cell Mol.Med.* 2005; 9:267-285.

Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S, Poggi S, Piccioli M, Ceccarelli C, Pieri F, Fraternali-Orcioni G, Pileri SA. The EnVision++ system: a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol.* 1998; 51(7):506-11.

Sarian LO, Derchain SF, Yoshida A, Vassallo J, Pignataro F, De Angelo Andrade LA. Expression of cyclooxygenase-2 (COX-2) and Ki67 as related to disease severity and HPV detection in squamous lesions of the cervix. *Gynecol Oncol.* 2006;102(3):537-41.

Schantz SP, Byers RM, Goepfert H, Shallenberger RC, Beddingfield N. The implication of tobacco use in the young adult with head and neck cancer. *Cancer.* 1988; 62(7):1374-80.

Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol.* 1993;123(3):513-22.

Schoppmann SF, Birner P, Stöckl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjaschki D. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol.* 2002;161(3):947-56.

Schoppmann SF, Fenzl A, Nagy K, Unger S, Bayer G, Geleff S, Gnant M, Horvat R, Jakesz R, Birner P. VEGF-C expressing tumor-associated macrophages in lymph node positive breast cancer: impact on lymphangiogenesis and survival. *Surgery.* 2006;139(6):839-46.

Schor AM, Pendleton N, Pazouki S, Smither RL, Morris J, Lessan K, Heerkens E, Chandrachud LM, Carmichael G, Adi M, Chisholm DM, Stevenson H. Assessment of vascularity in histological sections: effects of methodology and value as an index of angiogenesis in breast tumours. *Histochem J.* 1998; 30(12):849-56.

Shah NG, Trivedi TI, Tankshali RA, Goswami JA, Shah JS, Jetly DH, Kobawala TP, Patel KC, Shukla SN, Shah PM, Verma RJ. Molecular alterations in oral carcinogenesis: significant risk predictors in malignant transformation and tumor progression. *Int J Biol Markers.* 2007; 22(2):132-43.

Sheehan KM, Sabah M, Cummins RJ, O'Grady A, Murray FE, Leader MB, Kay EW. Cyclooxygenase-2 expression in stromal tumors of the gastrointestinal tract. *Hum Pathol.* 2003; 34(12):1242-6.

Sheehan KM, Steele C, Sheahan K, O'Grady A, Leader MB, Murray FE, Kay EW. Association between cyclooxygenase-2-expressing macrophages, ulceration and microvessel density in colorectal cancer. *Histopathology.* 2005;46(3):287-95.

Shibata M, Kodani I, Osaki M, Araki K, Adachi H, Ryoke K, Ito H. Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. *Oral Oncol.* 2005; 41(3):304-12.

Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Racial disparity in stage at diagnosis and survival among adults with oral cancer in the US. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2007;35(3):233-40.

Shpitzer T, Chaimoff M, Gal R, Stern Y, Feinmesser R, Segal K. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in early oral tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1996;122(8):865-8.

Siitonen SM, Haapasalo HK, Rantala IS, Helin HJ, Isola JJ. Comparison of different immunohistochemical methods in the assessment of angiogenesis: lack of prognostic value in a group of 77 selected node-negative breast carcinomas. *Mod Pathol.* 1995; 8(7):745-52.

Silveira EJ, Godoy GP, Lins RD, Arruda Mde L, Ramos CC, Freitas Rde A, Queiroz LM. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol.* 2007;15(4):376-83.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem.* 2000; 69:145-82.

Smith WL, Meade EA, DeWitt DL. Pharmacology of prostaglandin endoperoxide synthase isozymes-1 and -2. *Ann N Y Acad Sci.* 1994; 714:136-42.

Snoussi K, Strosberg AD, Bouaouina N, Ben Ahmed S, Chouchane L. Genetic variation in pro-inflammatory cytokines (interleukin-1beta, interleukin-1alpha and interleukin-6) associated with the aggressive forms, survival, and relapse prediction of breast carcinoma. *Eur Cytokine Netw.* 2005;16(4):253-60.

Soeda S, Nakamura N, Ozeki T, Nishiyama H, Hojo H, Yamada H, Abe M, Sato A. Tumor-associated macrophages correlate with vascular space invasion and myometrial invasion in endometrial carcinoma. *Gynecol Oncol.* 2008; 109(1):122-8.

Stich HF, Parida BB, Brunnemann KD. Localized formation of micronuclei in the oral mucosa and tobacco-specific nitrosamines in the saliva of "reverse" smokers, Khaini-tobacco chewers and gudakhu users. *Int J Cancer.* 1992; 50(2):172-6.

Stolina M, Sharma S, Lin Y, Dohadwala M, Gardner B, Luo J, Zhu L, Kronenberg M, Miller PW, Portanova J, Lee JC, Dubinett SM. Specific inhibition of cyclooxygenase 2 restores antitumor reactivity by altering the balance of IL-10 and IL-12 synthesis. *J Immunol.* 2000;164(1):361-70.

Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.* 1995; 55(18):3964-8.

Takahashi K, Naito M, Takeya M. Development and heterogeneity of macrophages and their related cells through their differentiation pathways. *Pathol Int.* 1996; 46(7):473-85.

Tan FL, Ginsburg D. What a polyclonal antibody sees in von Willebrand factor. *Thromb Res.* 2008;121(4):519-26.

Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002; 68:95-114.

Tang DW, Lin SC, Chang KW, Chi CW, Chang CS, Liu TY. Elevated expression of cyclooxygenase (COX)-2 in oral squamous cell carcinoma--evidence for COX-2 induction by areca quid ingredients in oral keratinocytes. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32(9):522-9.

Tauber AI, Chernyak L. Metchnikoff and a theory of medicine. *J R Soc Med.* 1989; 82(12):699-701.

Tsujii M, DuBois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell.* 1995; 83(3):493-501.

Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(7):3336-40.

Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998; 93(5):705-16.

Tsukuda M, Ooishi K, Mochimatsu I, Sato H. Head and neck carcinomas in patients under the age of forty years. *Jpn J Cancer Res.* 1993; 84(7):748-52.

Ueno T, Toi M, Saji H, Muta M, Bando H, Kuroi K, Koike M, Inadera H, Matsushima K. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 in macrophage recruitment, angiogenesis, and survival in human breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2000; 6(8):3282-9.

Vairaktaris E, Serefoglou Z, Yapijakis C, Stathopoulos P, Vassiliou S, Derka S, Nkenke E, Vylliotis A, Ragos V, Neukam FW, Patsouris E. The interleukin-1 beta gene polymorphism +3953 C/T is not associated with risk for oral cancer. *Anticancer Res.* 2007; 27(6B):3981-6.

Vairaktaris E, Yapijakis C, Serefoglou Z, Derka S, Vassiliou S, Nkenke E, Vylliotis A, Spyridonidou S, Neukam FW, Schlegel KA, Patsouris E. The interleukin-10 (-1082A/G) polymorphism is strongly associated with increased risk for oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2008; 28(1A):309-14.

Van Diest PJ, Brugal G, Baak JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value *J Clin Pathol.* 1998; 51(10):716-24.

Vane, J. R.; Bakhle, Y. S.; Botting, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1998;38:97-120.

Vokes EE, Weichselbaum RR, Lippman SM, Hong WK. Head and neck cancer. *N Engl J Med.* 1993; 328(3):184-94.

Vora HH, Shah NG, Patel DD, Trivedi TI, Chikhlikar PR. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis. *J Surg Oncol.* 2003; 82(1):34-50.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Toi M, Martin L, McCulloch P, Pezzella F, Viale G, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation. *Eur J Cancer.* 1996; 32A(14):2474-84.

Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral Oncol.* 2005; 41(3):244-60.

Webb DS, Mostowski HS, Gerrard TL. Cytokine-induced enhancement of ICAM-1 expression results in increased vulnerability of tumor cells to monocyte-mediated lysis. *J Immunol.* 1991; 146(10):3682-6.

Weidner N. The importance of tumor angiogenesis: the evidence continues to grow. *Am J Clin Pathol.* 2004; 122(5):675-7.

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med.* 1991; 324(1):1-8.

Wiencke, J. K.; Thurston, S. W.; Kelsey, K. T. et al. Early age at smoking initiation and tobacco carcinogen DNA damage in the lung. *J Natl Cancer Inst* 1999, 91: 614-619.

Williams CS, Mann M, DuBois RN. The role of cyclooxygenases in inflammation, cancer, and development. *Oncogene.* 1999; 18(55):7908-16.

Wu Y, Luo H, Kanaan N, Wu J. The proteasome controls the expression of a proliferation-associated nuclear antigen Ki-67. *J Cell Biochem.* 2000; 76(4):596-604.

Yao JG, Gao LB, Liu YG, Li J, Pang GF. Genetic variation in interleukin-10 gene and risk of oral cancer. *Clin Chim Acta.* 2008; 388(1-2):84-8.

Yoshida A, Sarian LO, Andrade LA, Pignataro F, Pinto GA, Derchain SF. Cell proliferation activity unrelated to COX-2 expression in ovarian tumors. *Int J Gynecol Cancer*. 2007;17(3):607-14.

Yu HP, Xu SQ, Liu L, Shi LY, Cai XK, Lu WH, Lu B, Su YH, Li YY. Cyclooxygenase-2 expression in squamous dysplasia and squamous cell carcinoma of the esophagus. *Cancer Lett*. 2003;198(2):193-201.

Yuan A, Yang PC, Yu CJ, Chen WJ, Lin FY, Kuo SH, Luh KT. Interleukin-8 messenger ribonucleic acid expression correlates with tumor progression, tumor angiogenesis, patient survival, and timing of relapse in non-small-cell lung cancer. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000; 162(5):1957-63.

Zätterström UK, Brun E, Willén R, Kjellén E, Wennerberg J. Tumor angiogenesis and prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck*. 1995; 17(4):312-8.

Zhang L, Zhu H, Lun Y, Yan D, Yu L, Du B, Zhu X Proteomic analysis of macrophages: a potential way to identify novel proteins associated with activation of macrophages for tumor cell killing. *Cell Mol Immunol*. 2007; 4(5):359-67.

Ziegler-Heitbrock HW, Thiel C, Haas JG, Möller A, Riethmüller G. Tumor necrosis factor in human monocyte-mediated antitumor cytotoxicity. *Nat Immun Cell Growth Regul*. 1988; 7(5-6):280-6.

