

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

NÁDIA DO LAGO COSTA

**Avaliação de macrófagos e suas citocinas IL-10, IL-12, IL-23,
INF- γ e TGF- β em carcinoma espinocelular de cavidade oral**

**Goiânia
2012**

NÁDIA DO LAGO COSTA

**Avaliação de macrófagos e sua citocinas IL-10, IL-12, IL-23,
INF- γ e TGF- β em carcinoma espinocelular de cavidade oral**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Doutora em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista

**Goiânia
2012**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás**

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: Nádia do Lago Costa

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista

2. Prof^a. Dr^a. Camila de Oliveira Rodini

3. Prof. Dr. José Carlos de Oliveira

4. Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça

5. Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara

OU

6. Prof^a. Dr^a. Nancy Tomoko Sacono

7. Prof. Dr. Ruy de Souza Lino Júnior

Data: 21/08/2012

Dedico este trabalho...

*Aos meus filhos, Beatriz e Heitor, por tornarem a minha vida infinitamente mais
feliz e serem a minha grande fonte de motivação.*

AGRADECIMENTOS

À minha sempre orientadora, professora e amiga, Prof^ª. Dr^ª. Aline Carvalho Batista. Pela confiança depositada e imensa dedicação, por estar sempre disponível e por acreditar em mim, os maiores e mais sinceros agradecimentos. Sua orientação tem sido fundamental para o meu crescimento profissional. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Elismauro Francisco Mendonça, agradeço por todo incentivo, dedicação, ensino, confiança e colaboração durante todos esses anos. Meus sinceros agradecimentos e carinho;

À prof^ª. Dr^ª. Marize Campos Valadares Bozinis pela sua acolhida no laboratório de Farmacologia e Toxicologia celular e pela contribuição neste trabalho;

À Prof^ª. Dr^ª. Tarcília Aparecida da Silva pela grande contribuição neste trabalho;

Aos professores Cláudio Rodrigues Leles e Rejane Faria Ribeiro-Rotta, meus sinceros agradecimentos;

Ao colega Pedro Paulo Chaves de Souza pelo grande auxílio prestado durante o desenvolvimento da técnica de qRT-PCR e pela acolhida em Araraquara.

Aos colegas de doutorado Helenisa, Polyana, Nancy, Júlio, Mariana e Andrea pela amizade que se construiu para além dos espaços da universidade;

Aos queridos alunos de iniciação científica Allisson, Andréia, Diego e Elaine pela imensa contribuição neste trabalho e confiança em mim depositada.

Ao Dr. Teylor Pedro Gerhardt pela contribuição com a coleta das amostras.

Às funcionárias do CGDB, Claudinha e Suzi, e ao funcionário do Laboratório de Patologia Bucal, Erildo, pelo apoio que nunca foi negado;

À Dra. Rita de Cássia Alencar Gonçalves e Dr. José Carlos de Oliveira por abrirem as portas da Divisão de Anátomo-Patologia e Citopatologia e Serviço de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge (HAJ-ACCG) e permitir, com isso, o desenvolvimento deste trabalho;

Aos pacientes, pois sem eles não seria possível à realização deste trabalho;

Ao meu esposo Marcos por toda dedicação, companheirismo e paciência.

A toda minha família, por acrescentar razão e beleza aos meus dias.

A Deus, por ter me dado o que tenho de mais precioso, minha vida.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

*À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás – FO/UFG - na pessoa do seu diretor **Prof. Dr. Gersinei Carlos de Freitas.***

*Ao Centro Goiano de Doenças da Boca da FO/UFG, na pessoa da coordenadora **Profa. Dra. Rejane Faria Ribeiro-Rotta.***

*Ao Laboratório de Farmacologia e Toxicologia Celular, da Faculdade de Farmácia da UFG, na pessoa da **Prof^a. Dr^a. Marize Campos Valadares Bozínis**, por permitir a utilização de toda a estrutura e equipamentos, em especial o citômetro de fluxo.*

*Ao Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP, na pessoa do coordenador **Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa**, por permitir o desenvolvimento da técnica de qRT-PCR.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FO/UFG, na pessoa da coordenadora **Profa. Dra. Aline Carvalho Batista.***

*Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da UFG, na pessoa do coordenador **Prof. Dr. Paulo César Brandão da Veiga Jardim.***

*Ao **Hospital Araújo Jorge/Associação de Combate ao Câncer em Goiás (HAJ/ACCG)**, em especial à Divisão de Anátomo-Patologia e Citopatologia e Serviço de Cabeça e Pescoço, por permitir a seleção e coleta das amostras.*

*Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)**, pela concessão das bolsas de Doutorado e Mestrado, respectivamente.*

SUMÁRIO

TABELAS E FIGURAS.....	10
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	14
1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA.....	15
1.1. PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS PELOS MACRÓFAGOS.....	23
2. JUSTIFICATIVA.....	27
3. OBJETIVOS.....	29
4. MÉTODOS.....	31
4.1. OBTENÇÃO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM.....	31
4.2. TÉCNICAS EMPREGADAS.....	35
4.2.1. TÉCNICA DE ROTINA (HEMATOXILINA E EOSINA).....	35
4.2.2. TÉCNICA DA IMUNOISTOQUÍMICA.....	35
4.2.3. qRT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE – POLIMERASE CHAIN REACTION).....	36
4.2.4. TÉCNICA DA CITOMETRIA DE FLUXO.....	40
4.3. ANÁLISE QUALITATIVA, QUANTITATIVA E ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	42
5. REFERÊNCIAS.....	44
6. PUBLICAÇÃO.....	53
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
ANEXOS E APÊNDICES.....	83

TABELAS, FIGURAS E ANEXOS

Tabela 1: Informações sobre os conjuntos de primers e sondas TaqMan pré-otimizados para PCR em tempo Real (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems).....	39
--	----

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

APCs	<i>Antigen-Presenting Cells / Células Apresentadoras de Antígenos</i>
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CCL3	<i>Macrophage Inflammatory Protein-1-alpha / Quimiocina também denominada MIP-1α</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>Complementary Deoxyribonucleic Acid / Ácido Desoxirribonucleico Complementar</i>
CEC	<i>Carcinoma Espinocelular</i>
CXCL12	<i>Stromal cell derived factor / Quimiocina também denominada SDF-1</i>
FGF-1	<i>Fibroblast Growth Factor / Fator de Crescimento Fibroblástico-1</i>
FITC	<i>Isocianato de Fluoresceína</i>
FO/UFG	<i>Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás</i>
HAJ/ACCG	<i>Hospital Araújo Jorge / Associação de Combate ao Câncer em Goiás</i>
HE	<i>Hematoxilina-Eosina</i>
INF-γ	<i>Interferon-gama</i>
IL	<i>Interleucinas</i>
INCA	<i>Instituto Nacional do Câncer</i>
LTCs	<i>Linfócitos T Citotóxicos</i>

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex / Moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade</i>
mRNA	<i>Messenger Ribonucleic Acid / Ácido ribonucleico mensageiro</i>
OMS	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
PE	<i>Ficoeritrina</i>
PE-Cy7	<i>Ficoeritrina cianina 7</i>
RT- PCR	<i>Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction</i>
SG	<i>Sobrevida Global</i>
SLD	<i>Sobrevida Livre de Doença</i>
STAT 3	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription 3 / Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3</i>
MAT	<i>Macrófagos Associados ao Tumor</i>
TGF-β	<i>Transforming Growth Factor Beta / Fator de Crescimento Transformador Beta</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor Alpha / Fator de Necrose Tumoral Alfa</i>
UICC	<i>International Union Against Câncer / União Internacional Contra o Câncer</i>
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor / Fator de Crescimento Endotelial Vascular</i>

RESUMO

Os macrófagos associados ao tumor (MATs) podem contribuir com eventos envolvidos tanto na progressão e invasão tumoral (angiogênese, degradação da matriz extracelular e imunossupressão local), quanto para impedir ou reduzir a infiltração local e metástase através de eventos de combate ao tumor. O objetivo desse estudo foi avaliar os macrófagos (MA) presentes no microambiente do carcinoma espinocelular de cavidade oral (CECCO), bem como a relação dessas células com fatores de prognóstico clínicos e microscópicos. Além disso, objetivou-se caracterizar essas células através da expressão das citocinas pró (IL-12/23 e INF- γ) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) pelos macrófagos e na totalidade das amostras selecionadas. Considerando esses objetivos, as técnicas de imunoistoquímica, citometria de fluxo e PCR quantitativo (qRT-PCR) foram utilizadas. Os resultados revelaram, com a técnica da citometria de fluxo, que há, no microambiente do CECCO, um predomínio do macrófago fenótipo M2, pois a proporção dessas células que expressaram simultaneamente as citocinas IL-10/TGF- β (10,8%) foi maior quando comparado as citocinas IL12/23/INF- γ (5,7%). Demonstrou-se, ainda, que uma alta proporção dos MA (CD11b⁺CD11c⁻) presentes no CECCO expressaram as citocinas IL-10, INF- γ e TGF- β quando comparado ao grupo controle, no entanto esta diferença foi significativa apenas para o TGF- β (Mann-Whitney; $P = 0,016$). A avaliação da expressão do RNA mensageiro (mRNA) pela técnica do qRT-PCR revelou uma alta expressão total das citocinas TGF- β , IL-10 e IL-23 no CECCO metastático quando comparado ao controle ($P < 0,05$ para todos os grupos). A proporção de macrófagos CD68⁺, identificados pela técnica da imunoistoquímica, foi significativamente menor no grupo controle (mucosa bucal saudável) quando comparado aos grupos de CECCO com e sem metástase em linfonodo cervical (Mann-Whitney; $P = 0,00001$ e $P = 0,044$, respectivamente). Adicionalmente, a proporção dessas células foi significativamente maior no grupo de CECCO metastático quando comparado ao não metastático (Mann-Whitney; $P = 0,038$). A análise da sobrevida demonstrou que os pacientes com uma alta proporção de macrófagos CD68⁺ apresentaram uma tendência ao menor tempo de sobrevida (44 meses) do que aqueles com baixa proporção dessas células (93 meses) (Kaplan-Meier; Log Rank, $P = 0,08$). Em conclusão, os resultados sugerem que há no microambiente do CECCO um predomínio do fenótipo M2. Adicionalmente, essas células podem favorecer a metástase e reduzir a sobrevida de pacientes acometidos pelo CECCO, provavelmente contribuindo com uma imunossupressão local via produção de TGF- β .

ABSTRACT

Tumor-Associated Macrophages (TAMs) can contribute with events involved in the progression and in the invasion of the tumor (angiogenesis, degradation of the extracellular matrix and local immunosuppression), or collaborate with an effective antitumor response and reduce the progression and metastasis. The purpose of these studies was to evaluate the macrophages (MA) presence in the microenvironment of oral cavity squamous cell carcinoma (OCSCC), and the relationship of these cells with clinicopathological factors. Additionally, we aimed also to characterize these cells through the expression of pro (IL-12/23 e INF- γ) and anti-inflammatory (IL-10 and TGF- β) by macrophages and globally in selected samples. Besides that, considering these goals, the techniques of immunohistochemistry, flow cytometry and qRT-PCR were used. The results revealed, even with the flow cytometry technique, that a predominance of M2 phenotype macrophage in the tumor microenvironment of OCSCC, because the proportion of macrophages expressed both cytokines IL-10/TGF- β (10.8%) was higher compared cytokines IL12/23/INF- γ (5.7%). Demonstrated although that a high proportion of MA (CD11b⁺CD11c⁻) present in OCSCC expressed cytokines IL-10, INF- γ and TGF- β compared to the control group, however this difference was significant only for TGF- β (Mann–Whitney; $P = 0,016$). The evaluation of the expression of messenger RNA (mRNA) by qRT-PCR technique revealed a high overall expression of cytokines TGF- β , IL-10 and IL-23 in OCSCC in metastatic when compared with control ($P < 0,05$ for all groups). The proportion of macrophages (CD68⁺), identified by immunohistochemistry technique, was significantly lower in the control group (normal oral mucosa) when compared to OCSCC groups with and without cervical lymph node metastasis (Mann–Whitney; $P = 0,00001$ e $P = 0,044$, respectively). Additionally, the proportion of these cells was significantly higher in metastatic OCSCC when compared with non-metastatic (Mann–Whitney; $P = 0,038$). Survival analysis showed that patients with a high proportion of CD68⁺ cells showed a trend toward shorter survival (44 months) than those with low proportion of these cells (93 months) (Kaplan-Meier; Log Rank, $P = 0,08$). In conclusion, the results suggest that there is a predominance of the M2 phenotype on the microenvironment of OCSCC. Additionally, these cells may promote metastasis and reduce survival of patients affected by OCSCC, probably contributing to a local immunosuppression via TGF- β production.

1. CARACTERIZAÇÃO DO PROBLEMA

O câncer afeta uma parcela expressiva da população brasileira e tem sido considerado, pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), um problema de saúde pública, estando entre as causas mais frequentes de óbitos.²² Considerando as demais neoplasias malignas, o câncer de boca é um dos mais frequentes.²² Estimativa realizada pelo INCA revelou uma expectativa de aproximadamente 14.179 casos novos de câncer de boca no Brasil para o ano de 2012, sendo 9.990 homens e 4.180 mulheres.²²

Câncer de boca é uma denominação genérica que inclui tumores de variados perfis histológicos, embora majoritariamente se refira ao carcinoma espinocelular (CEC).^{6,7,24} O CEC de boca, também denominado carcinoma epidermóide, carcinoma de células escamosas ou carcinoma de células espinhosas, é uma neoplasia maligna que se origina no epitélio de revestimento que pode acometer tanto a cavidade oral (língua, mucosa jugal, assoalho da boca, gengiva, área retromolar e palato) quanto o vermelhão dos lábios.^{6,22}

O tabagismo e o etilismo compreendem os fatores mais comumente associados ao aumento do risco de CEC de cavidade oral.^{34,36,40,42} Inicialmente, os carcinógenos e co-carcinógenos propiciam o surgimento de lesões brancas (Leucoplasias) ou vermelhas (Eritroplasias), as quais apresentam um risco maior de transformação neoplásica comparativamente a uma mucosa oral normal e, microscopicamente podem apresentar alterações celulares e estruturais, denominadas de displasias.^{36,40} Assim, estas lesões são

denominadas lesões cancerizáveis e podem representar o estágio inicial ou as primeiras alterações morfológicas de um CEC.^{36,40}

Considerando os fatores de prognóstico clínico do CEC de boca, entre os anos de 1943 e 1952, o francês Pierre Denoix desenvolveu o sistema TNM para a classificação de tumores malignos, tendo sido incorporado pela “American Joint Committee on Cancer” (AJCC) e pela “International Union Against Cancer” (UICC) a partir de 1982.²³ Dessa forma, o estabelecimento do prognóstico e o plano de tratamento dos CECs de boca baseiam-se principalmente nesse sistema.²³ O sistema TNM trabalha prioritariamente com a extensão anatômica da doença determinada clinicamente.²³ O estadiamento TNM satisfaz a uma série de objetivos, tais como: ajudar o médico no planejamento do tratamento; dar alguma indicação do prognóstico; ajudar na avaliação dos resultados do tratamento; facilitar a troca de informações entre os centros de tratamento e contribuir para a pesquisa contínua sobre o câncer humano.^{23,40} Tal sistema baseia-se na avaliação de três componentes: T, o qual corresponde à extensão do tumor primário; N, que se refere à ausência ou à presença e à extensão de metástase em linfonodos regionais; M, que corresponde à ausência ou à presença de metástase à distância.^{23,40}

Segundo esse sistema, tumores de pequenas dimensões e não disseminados apresentam um melhor prognóstico em relação àqueles com maiores proporções e metástase clinicamente detectável.^{8,21} Entretanto, alguns tumores com o mesmo estadiamento clínico demonstram padrões de crescimento e evolução diferentes, sugerindo a necessidade da análise de

outros fatores complementares capazes de nortear com maior precisão o prognóstico desta doença.¹⁸

Segundo Almofti et al (2004), o CEC de boca é caracterizado por um elevado grau de invasão local e por um alto índice de metástase em linfonodos cervicais e, conseqüentemente alto índice de recorrência local.² De acordo com Okura (2002), aproximadamente 50% dos pacientes com CEC de língua avançado (estágios III ou IV, UICC) morrem em cinco anos e o fator de prognóstico mais importante é a presença de metástase em linfonodos.³⁷

Quando avaliamos os fatores de prognóstico microscópico, os sistemas de gradação histológica de malignidade são importantes, tendo em vista que enfatizam as características histopatológicas e a relação imunológica entre tumor e hospedeiro. Dentre esses sistemas, destaca-se o sistema de gradação histológica de malignidade desenvolvido por Wahi, em 1971, e publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o qual é bastante utilizado para classificação microscópica do CEC de boca. O CEC é classificado, segundo a OMS, com base no grau de diferenciação celular, que considera o grau de queratinização, o pleomorfismo nuclear e a atividade mitótica.⁴⁰ Dessa forma, os graus são: grau I- bem diferenciado, onde as células tumorais se assemelham às da camada espinhosa da mucosa bucal tanto morfológica quanto funcionalmente; grau II- moderadamente diferenciado, no qual são observados menos queratinização, mais polimorfismo nuclear, maior quantidade de células hipercromáticas e maior número de mitoses atípicas; grau III- pobremente diferenciado, com ausência de queratinização, grande

quantidade de mitoses atípicas e intenso polimorfismo nuclear.⁴⁰ Em adição aos fatores microscópicos descritos pela OMS, outros autores utilizam ainda para a classificação microscópica, a relação tumor-hospedeiro, avaliando o padrão de invasão tumoral, o estágio de invasão e a intensidade do infiltrado inflamatório peritumoral.^{3,46}

Atualmente, outro relevante critério microscópico a ser considerado no prognóstico do CEC de boca é a avaliação da densidade de células em mitose ou em proliferação, que pode ser facilmente verificada através de imunomarcadores contra alvos específicos expressos durante o ciclo celular, tais como as proteínas Ki-67 e Ciclinas.^{48,49}

Apesar de parâmetros clínicos^{6,23} e microscópicos^{3,40,46,49} serem importantes para avaliação da agressividade tumoral, hoje se sabe que a resposta imunológica inata e adaptativa tumoral^{1,4,7,12,29,50-54} são fundamentais para o estabelecimento do real prognóstico da doença.^{4,29,50-54}

Dados sobre a influência das células imune-inflamatórias, bem como seus mediadores químicos, na patogênese e prognóstico do CEC de boca ainda são escassos. Assim, considerando a importância desse microambiente na modulação de eventos envolvidos tanto na progressão e invasão do tumor (angiogênese, degradação da matriz extracelular e imunossupressão local) quanto para impedir ou reduzir a infiltração local e metástases (imunidade antitumoral)^{4,8,12,20,29,50-54} tem-se investido em caracterizar as populações celulares e seus mediadores, bem como, avaliar a relação desses com o

prognóstico dos pacientes acometidos pelo CEC de boca.^{15,38,39,45} Até o presente momento, nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que os mastócitos estão envolvidos com fenômenos imunoregatórios que podem favorecer a imunidade tumoral local e a sobrevida dos pacientes acometidos pelo CEC de boca³⁸ e que algumas quimiocinas, tais como a CCL3, CXCL12 e CCL2, estão associadas com metástase em linfonodos cervicais e progressão tumoral.^{15,39} Demonstramos, ainda, que pacientes com CEC com alta densidade de linfócitos T citotóxicos (LTCs), e seus grânulos citotóxicos granzima B e perforina, apresentam um menor índice de metástase linfonodal e maior sobrevida, quando comparado aos pacientes com baixa contagem dessas células e proteínas.^{10,11,56} Mais recentemente, considerando alguns dados, obtidos por nosso grupo^{15,45} e por outros pesquisadores^{28,31,33} sobre a possível relação dos macrófagos, no prognóstico do paciente acometido pelo CEC de boca, temos investido em estudar melhor o papel dessas células neste tumor.

Dentre os inúmeros leucócitos presentes no microambiente tumoral, os macrófagos representam a maior quantidade em número dessas células.^{32,55} Os macrófagos podem participar ativamente da patogênese tumoral contribuindo com a imunidade antitumoral local através da secreção do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), do interferon gama (INF- γ) e das interleucinas (IL) -2, -12, -18 e -23.^{1,12,17,35,55} Em contrapartida, essas células podem produzir fatores de crescimento e citocinas, que incluem o fator de crescimento fibroblástico-1 (FGF-1), fator de crescimento derivado de plaquetas, IL-1, IL-10 e fator de crescimento transformador beta (TGF- β), atuam de diferentes maneiras

promovendo o seu crescimento.^{17,28,35,55} Adicionalmente, os macrófagos, sob algumas condições secretam enzimas proteolíticas (metaloproteinases), capazes de degradar a matriz extracelular, e fatores angiogênicos [FGF-1, fator de crescimento endotelial-vascular (VEGF), prostaglandinas, fator de crescimento insulina-like 1 e a timidina fosforilase (TP)], os quais podem oferecer suporte ao crescimento e progressão do tumor facilitando, desta maneira, a disseminação das células tumorais.^{26,28,31}

Neste contexto, é importante ressaltar que recentes descobertas demonstraram que os macrófagos representam um grupo heterogêneo de população celular, podendo apresentar diferentes fenótipos de acordo com a disponibilidade de oxigênio (hipóxia x normóxia) e progressão tumoral (estágios iniciais X avançados): os macrófagos M1 e M2, os quais são subdivididos de acordo com sua capacidade de produzir diferentes respostas.^{17,35,41,55}

Os macrófagos M1, também denominados de classicamente ativados, predominam principalmente em estágios iniciais do desenvolvimento de diferentes tipos tumorais. Este fenótipo é caracterizado pela produção de altos níveis de IL-12, INF- γ e IL-23 e baixos níveis de IL-10.^{17,35,41,55} Em adição, essas células exercem atividades antiproliferativas e citotóxica – resultante particularmente da capacidade de secretar NO, peroxinitritos, peróxido de hidrogênio e superóxidos – e citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 e IL6).^{17,35}

Ao contrário, em estágios tumorais avançados ou em locais de hipóxia, há um predomínio para o direcionamento do fenótipo M2, também denominados

de alternativamente ativados, sendo estes caracterizados pela capacidade de secretar citocinas anti-inflamatórias e imunossupressoras, tais como IL-3, IL-4, IL-10 e TGF- β .^{17,41,55} Portanto, o M2 é capaz de inibir as funções do M1, particularmente, as funções inflamatórias citotóxicas.^{17,55} Adicionalmente, o M2 é capaz de promover a angiogênese e o reparo tecidual, através do metabolismo da arginina em ornitina e consequente produção de colágeno.^{17,44,55}

Resumidamente, os macrófagos associados ao tumor (MATs) podem ter ações pró-inflamatórias com o fenótipo M1, promovendo o recrutamento e crescimento de células imune-inflamatórias através da secreção de citocinas como IL-6, TNF- α , INF- γ , IL-23 e IL-12, as quais contribuirão com o combate às células tumorais, ou anti-inflamatórias, com o fenótipo M2, contribuindo, dessa forma, com a angiogênese e inibição da imunidade antitumoral, através da produção de TGF- β e IL-10, favorecendo, assim, a progressão tumoral.^{17,35,41,55}

Embora a presença de MATs esteja bem relatada^{8,28,31,33}, sua participação na patogênese do câncer ainda é controversa. Enquanto alguns estudos demonstram que a alta densidade de macrófagos (CD68⁺) intra e peritumoral está associada a um pior prognóstico, representado pela maior proliferação e invasão tumoral, maior densidade de vasos sanguíneos (angiogênese), menor sobrevida e metástase linfonodal em pacientes com CEC de esôfago,^{25,26} orofaringe³³ e de boca^{28,31,33} outros estudos evidenciam que uma maior densidade e atividade destas células no microambiente tumoral

estão relacionadas a um melhor prognóstico (maior sobrevida) de pacientes com cânceres colorretal¹⁶ e próstata.⁴³

A aplicação clínica de agentes imunoterápicos tem sido alvo de investigação no tratamento de neoplasias, devido à percepção de que muitos antígenos tumorais são sensíveis à ação de células imunes potencialmente funcionais. Desta forma, destaca-se a capacidade do sistema imune em reconhecer, processar e apresentar os antígenos tumorais desencadeando, desta forma, respostas antitumorais. Neste contexto, modelos experimentais em animais com células apresentadoras de antígenos, dentre estas os macrófagos, têm sido desenvolvidos e representam uma boa maneira para indução de respostas em linfócitos T, explorando as enormes capacidades dessas células para a estimulação do sistema imune.⁵

Feinmesser et al. (2004) e Timár et al. (2005), recentemente, demonstraram que a imunoterapia, através da administração local de linfocinas naturais (*multikine*, *CelSci*), como a IL-2, pode modular a densidade de várias células no CEC de boca, dentre elas os macrófagos.^{14,47} Esse tratamento coadjuvante contribui para a diminuição da extensão tumoral e o aumento da sobrevida dos pacientes, sendo os macrófagos os maiores organizadores na seqüência de eventos para o reconhecimento, morte e eliminação tumoral.¹⁴

Desta forma, estes autores consideram que os CECs de boca, os quais tipicamente demonstram progressão locoregional, são excelentes candidatos para a imunoterapia local, devido sua acessibilidade e à capacidade de

infiltração intratumoral de substâncias de defesa susceptíveis a imunomodulação.^{14,47}

A análise da efetiva participação dos macrófagos no controle do tumor é importante, pois pode revelar meios de intervenção e de proteção contra a doença e também indicar marcadores de predição do desenvolvimento e agressividade tumoral. O entendimento destes mecanismos poderá ainda auxiliar na compreensão da fisiopatologia dos processos neoplásicos com potencial para utilização no desenvolvimento de imunoterápicos e quimioterápicos.

1.1. PRODUÇÃO DE CITOCINAS PRÓ E ANTI-INFLAMATÓRIAS PELOS MACRÓFAGOS

Como citado anteriormente, dependendo do perfil de citocinas produzidas pelo fenótipo predominante de macrófagos (M1 x M2), a direção e balanço do crescimento tumoral poderá seguir vias distintas: promoção e crescimento tumoral com a produção das citocinas imunossupressoras TGF- β e IL-10 ou uma resposta antitumoral efetiva através das citocinas pró-inflamatórias IL-12, IL-23 e INF- γ .^{1,12,19,25,28,31}

A IL-12 e IL-23 pertencem ao grupo das citocinas pró-inflamatórias heterodímeras da família IL-12 e são compostas pelas subunidades IL-12p40/IL-12p35 e IL-12p40/IL-23p19, respectivamente. As principais células produtoras

destas citocinas são os macrófagos e as células dendríticas, sendo seus principais receptores os IL-12R β –IL-12R β 2 para a IL-12 e as IL-12R β 1–IL-23R para a IL-23. Os receptores de ambas, IL-12 e IL-23, são expressos principalmente por células T e Natural Killer (NK).^{9, 30}

Embora as ILs-12 e 23 possuam similaridades nas subunidades de seus receptores e vias de sinalização, recentes estudos demonstraram que elas apresentam vias de respostas imunológicas divergentes e parecem exercer funções distintas no desenvolvimento tumoral.^{9,30} A IL-12 parece contribuir principalmente com a resistência do hospedeiro contra os tumores. A atividade antitumoral desta citocina tem sido bastante estudada em modelos experimentais com camundongos; esses estudos têm demonstrado a direta relação desta citocina com a inibição da tumorigênese e indução da regressão de tumores já estabelecidos.^{9,30} A principal atividade antitumoral da IL-12 remete a sua capacidade em promover respostas imunes adaptativas Th1 e ativar LTCs.³⁰

A citocina IL-23 parece contribuir principalmente com eventos que levam ao crescimento tumoral.^{27,30,32} Neste contexto, Langowski et al (2006) desenvolveram um estudo de carcinogênese química em peles de camundongos com dois grupos experimentais: animais *knockout* para IL23 e animais *knockout* para IL-12.²⁷ Os autores evidenciaram que em camundongos que não possuíam a IL-23 (*knockout* para IL23) o tumor não desenvolvia, ao contrário, nos animais *knockout* para IL-12 observou-se um grande desenvolvimento tumoral.²⁷ Adicionalmente, neste mesmo estudo, os autores

também demonstraram que a IL-23 contribui com o aumento da angiogênese e com a diminuição do recrutamento de LTCs para o microambiente tumoral.²⁷

Acredita-se que o IFN- γ desempenhe um importante papel na inibição e morte de células tumorais, impedindo, desta forma, o seu crescimento e progressão.⁵⁵ A importância do IFN- γ na imunidade tumoral é demonstrada por achados de incidência tumoral elevada em camundongos *knockout* desprovidos dessa citocina ou do seu receptor.¹

A IL-10 e o TGF- β são exemplos de citocinas anti-inflamatórias e imunossupressoras, cuja principal função no microambiente tumoral é contribuir com a atividade e manutenção de células Tregs e inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6, IL-12, IFN- γ e TNF- α .^{30,55} Adicionalmente, estudos demonstraram que estas citocinas possuem um efeito direto sobre as células tumorais, favorecendo, assim, o crescimento e a sobrevivência das mesmas. A base deste efeito é a ativação do Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 3 (STAT 3), o qual promove uma alta expressão de genes antiapoptóticos, como o Bcl-2, por células tumorais.³⁰

Adicionalmente, estudos demonstraram que a alta expressão de IL-10 e TGF- β por MATs e células tumorais relacionam-se com um maior índice de invasão tumoral e metástase, aumento da angiogênese e inibição das células imunes efetoras, como os LTCs, conseqüentemente, com um pior prognóstico dos pacientes.^{30,32,44,55} Desta forma, a IL-10 e TGF- β estariam relacionadas com

eventos que contribuem com a imunossupressão local, favorecendo, assim, o escape das células tumorais à vigilância imunológica.^{30,32,44,55}

Apesar do importante papel que os macrófagos podem desempenhar na patogênese tumoral^{15,26-28,31,33,43,47} há escassos estudos que objetivaram avaliar essas células em CECs de boca^{28,31,33} e, especialmente, investigar a significância clínico-patológica das mesmas em pacientes acometidos com esta patologia. Adicionalmente, não há na literatura estudos que caracterizaram a população de macrófagos em CECs de boca.

2. JUSTIFICATIVA

Considerando:

1- A elevada taxa de ocorrência, morbidade e mortalidade associada ao CEC de boca, em particular no Estado de Goiás²² e a necessidade da busca de marcadores de predição do comportamento biológico dessa neoplasia;

2- A presença, no microambiente do CEC de boca, de um infiltrado imune-inflamatório cuja participação na patogênese deste tumor ainda não está esclarecida.^{20,29,50,51} Importante ressaltar que dependendo do tipo celular, do status de ativação destas células e dos mediadores químicos secretados neste microambiente tumoral, este infiltrado poderá contribuir tanto para a progressão e invasão do tumor, através, por exemplo, do estímulo a angiogênese, degradação da matriz extracelular e imunossupressão local, quanto impedir ou reduzir a infiltração local e metástases através de eventos antitumorais;

3- Dados prévios sobre uma controversa associação dos macrófagos com um melhor prognóstico de pacientes com câncer de próstata⁴³ e colorectal,¹⁶ e um pior prognóstico de pacientes com CEC de esôfago,^{25,26} orofaringe³³ e de boca,^{28,31,33} bem como a possibilidade de imunomodulação local destas células,^{14,47}

5- Os poucos dados sobre a população de macrófagos, bem como os mediadores produzidos por eles, no CEC de boca^{28,31,33} e, especialmente, de

investigação da significância clinico-patológica dessas células em pacientes acometidos por essa neoplasia.

3. OBJETIVOS

Desta forma, o presente estudo tem como OBJETIVO GERAL:

Avaliar os macrófagos e a relação dessas células com fatores de prognóstico clínico e microscópico do CEC de cavidade oral.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS / DELINEAMENTO EXPERIMENTAL:

1. Identificar, utilizando a técnica de imunoistoquímica, quantificar e avaliar comparativamente a densidade de macrófagos em amostras de CEC de cavidade oral de pacientes que apresentaram metástase em linfonodo cervical, CEC de cavidade oral de pacientes que não apresentaram metástase em linfonodo cervical e em amostras de mucosa gengival clinicamente e microscopicamente sem alterações (controle);
2. Avaliar a relação dos macrófagos com fatores de prognóstico microscópico tais como gradação microscópica segundo a OMS, invasão local e índice de proliferação celular avaliado pela densidade de células Ki67⁺ e ciclina B1⁺ e com fatores de prognóstico clínico, como o tamanho da lesão primária, metástase para linfonodo regional e sobrevida do paciente;
3. Avaliar a atividade dos macrófagos, utilizando a técnica da citometria de fluxo, através da análise da expressão de citocinas pró (IL-12/23 e INF- γ) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) expressas por essas células em amostras de CEC de cavidade oral e controle;

4. Avaliar a expressão gênica de mRNA das proteínas IL-10, IL-12, IL-23, INF- γ e TGF- β , através do qRT-PCR, em amostras de CEC de cavidade oral e controle.

4. MÉTODOS

4.1. OBTENÇÃO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM

O presente trabalho trata-se de um estudo de coorte retrospectivo realizado entre os anos de 1998 a 2011. As amostras foram selecionadas, conforme descrito detalhadamente nos próximos tópicos, em dois momentos, sendo o primeiro realizado entre os anos de 1998 a 2006 e o segundo nos anos 2010 e 2011.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Araújo Jorge / Associação de Combate ao Câncer em Goiás (HAJ/ACCG) com o protocolo número 008/2010. Todos os sujeitos participantes da etapa II da pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

A obtenção, seleção e caracterização da amostragem consistiram de duas etapas:

4.1.1. ETAPA I

Para a primeira etapa deste trabalho, foram obtidas dos arquivos de blocos e laudos do Serviço da Anatomopatologia e Citopatologia do HAJ/ACCG, amostras de CEC de cavidade oral (n=45) de pacientes diagnosticados, tratados e acompanhados no Serviço de Cabeça e Pescoço do HAJ/ACCG entre os anos de 1998 a 2006. Nesta etapa, foram selecionados apenas pacientes submetidos à remoção cirúrgica do tumor primário e de linfonodos cervicais, os quais foram avaliados microscopicamente pela técnica de rotina de

Hematoxilina e Eosina (HE). Considerando as amostras de CEC de cavidade oral selecionadas, 2 (dois) grupos foram constituídos: grupo 1- amostras de CEC primário de cavidade oral de pacientes que apresentaram metástase em linfonodo cervical; grupo 2- amostras de CEC primário de cavidade oral de pacientes que não apresentaram linfonodos com metástase. As amostras selecionadas nessa etapa foram submetidas à técnica da imunoistoquímica para a avaliação da densidade de macrófagos CD68⁺ presentes tanto na região intratumoral quanto no estroma peritumoral. Adicionalmente, amostras de amígdalas foram incluídas como controle da reação.

Adicionalmente, foram selecionadas do arquivo de blocos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG) amostras controle (n = 10), caracterizadas por mucosa bucal clinicamente e microscopicamente sem alterações, coletadas durante exodontia de terceiros molares totalmente inclusos e, também, e submetidas à técnica da imunoistoquímica para a avaliação da densidade e proporção de macrófagos CD68⁺.

As características clínicas analisadas das amostras selecionadas foram: tamanho da lesão primária (T); sobrevida global (SG) e a presença ou não de metástase em linfonodos (confirmadas microscopicamente). Todos os dados referentes às características clínicas da doença foram obtidos junto aos prontuários médicos de atendimento e, quando necessário, em consulta aos laudos.

As características microscópicas consideradas no presente estudo foram: gradação tumoral segundo OMS;⁴⁰ invasão local; índice de proliferação celular que foi avaliado pela porcentagem de células Ki-67+ e Ciclina B1+ e a intensidade do infiltrado inflamatório.

Para a seleção dos casos de CEC nesta etapa do estudo, os critérios de inclusão foram: lâminas e blocos em bom estado de conservação; lâminas com tecido íntegro; pacientes com CEC primário de boca que foram submetidos ao esvaziamento cervical; casos com prontuários que apresentavam todos os dados necessários para o estudo; tempo de acompanhamento do paciente de no mínimo 18 meses. Como critérios de exclusão foram considerados: lâminas e blocos defeituosos, os quais impossibilitavam as análises; casos sem seguimento clínico; casos que foram submetidos a tratamentos prévios (quimioterápicos, radioterapia etc) e recidivas.

4.1.2. ETAPA II

Para a realização da etapa II foram obtidas amostras de CEC de cavidade oral primário (n = 20) de pacientes atendidos no Serviço de Cabeça e Pescoço do HAJ/ACCG nos anos 2010 e 2011. Em adição, amostras de mucosa gengival clinicamente e microscopicamente sem alterações (controles) (n=5) foram obtidas durante exodontia de terceiros molares totalmente inclusos. A coleta do material foi realizada durante o procedimento cirúrgico para exérese do tumor, onde o cirurgião responsável coletou 2 (dois) fragmentos da peça cirúrgica. Os fragmentos foram removidos utilizando um Punch Keyes estéril

com 6 mm de diâmetro, em áreas distantes de úlceras e das bordas, para que não compromettesse as análises.

Um dos fragmentos foi imerso em meio RPMI-1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) e armazenado a uma temperatura de 4⁰C, por um período máximo de 6 horas. Essas amostras coletadas foram submetidas à técnica de Citometria de Fluxo para determinar as populações de macrófagos, através da expressão dos marcadores de superfície celular CD11b e CD11c, e também, para a análise da expressão das citocinas IL-10, IL-12, IL-23, INF- γ e TGF- β por essas células.

O outro fragmento coletado foi imerso em reagente Trizol (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA) e armazenado a uma temperatura de -80⁰C (MDF-C8V, Sanyo Scientific, USA). Posteriormente, essas amostras foram submetidas à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa (Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction – RT-PCR), em tempo real, para a avaliação da expressão gênica do mRNA das proteínas IL-10, IL-12, IL-23, INF- γ e TGF- β .

O critério de inclusão desta etapa consistiu em pacientes com CEC primário de boca que foram submetidos ao esvaziamento cervical e de exclusão os casos que foram submetidos a tratamentos prévios (quimioterápicos, radioterapia etc) e recidivas.

4.2. TÉCNICAS EMPREGADAS

4.2.1. TÉCNICA DE ROTINA (HEMATOXILINA E EOSINA)

O material selecionado, incluído em parafina, foi seccionado em micrótomo (Leica RM2165), obtendo-se de cada bloco cortes consecutivos de 5µm, colocados sobre lâminas histológicas e corados pelo método de HE. Esses cortes foram utilizados para caracterização microscópica das amostras.

4.2.2. TÉCNICA DA IMUNOISTOQUÍMICA

Para a técnica da imunoistoquímica foram obtidos cortes seriados de 3µm, estendidos sobre lâminas de vidro silanizadas (A3648 - EasyPath) e submetidos à técnica da imunoistoquímica, utilizando o método do polímero (Starr Trek Universal HRP Detection System), para identificação dos seguintes antígenos: CD68, Ciclina B1 e Ki-67. Inicialmente, os cortes sobre as lâminas foram desparafinizados em xilol e hidratados em banhos crescentes de álcool etílico. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão citrato, pH=6.0 (SIGMA, P4809, Saint Louis – USA) aquecidas a uma temperatura de 95°C, com auxílio de Banho Maria Digital (DeLeo), por 45 minutos, para exposição antigênica. Após lavagem com TBS, as lâminas foram mergulhadas em peróxido de hidrogênio a 3%, por aproximadamente 45 minutos. Posteriormente as lâminas foram lavadas com TBS e, em seguida, incubadas com solução para bloqueio das proteínas endógenas (BIOCARE's Background Sniper) por 15 minutos. Novamente as lâminas foram lavadas com TBS e, em seguida, incubadas com os anticorpos primários, por 18 horas e mantidas na

temperatura de 4°C. Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpo monoclonal de camundongo anti-CD68 humano (clone KP1, Novocastra, Newcastle, UK;) a 1:1000; anticorpo monoclonal de camundongo anti-Ki-67 humano (clone MM1, Novocastra) a 1:100; anticorpo monoclonal de camundongo anti-Ciclina B1 humana (clone 7A9, Novocastra) a 1:40. Todas as diluições foram realizadas utilizando PBS associado a soro albumina bovina (PBS-BSA) a 1%. Todos os anticorpos utilizados foram previamente submetidos a testes para padronização. Após o período de 18 horas, lavagens consecutivas foram realizadas e, posteriormente, as lâminas foram incubadas com o Sistema Trek Universal Link por 20 minutos. Novamente as lâminas foram lavadas com TBS e incubadas com o Sistema TrekAvidin-HRP (Label) por 20 minutos. Em seguida, procedeu-se à revelação da reação utilizando o 3.3'-Diaminobenzidina (DAB) em uma solução cromogênica, por 1 minuto à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina, por 30 segundos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água corrente por 10 minutos, as lâminas foram desidratadas com álcoois, passadas em xilol e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck).

4.2.3. qRT-PCR (REVERSE TRANSCRIPTASE – POLIMERASE CHAIN REACTION)

O RNA total dos tecidos coletados foi extraído com o reagente Trizol segundo o protocolo do fabricante (Gibco BRL, Life Technologies, Rockville, MD, USA). O tecido coletado foi macerado em 500 µL de trizol em tubo de

centrífuga de 1,5 mL com o auxílio de pilão plástico. Foram adicionados 100 µL de clorofórmio RNAase free (Sigma) ao tecido lisado e misturado vigorosamente na mão por 15 segundos. Essa mistura foi mantida em temperatura ambiente por 2 minutos e posteriormente centrifugada a 12.000g por 15 minutos a 4 °C (em centrífuga Eppendorf modelo 5810R). Após a centrifugação, a mistura foi dividida em uma fase baixa vermelha correspondente ao fenol/clorofórmio, uma interfase, e uma fase aquosa superior sem cor que corresponde à fase onde está o RNA. O volume desta fase incolor corresponde a 60% do volume de Trizol usado na homogeneização. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de microcentrífuga. Foram adicionados 500 µL de isopropanol ao sobrenadante para precipitar o RNA da fase aquosa. Após 10 minutos em temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada a 12.000 g por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e o pellet de RNA lavado uma vez com 500 µL de etanol 75%. A amostra foi misturada em vórtex e centrifugada a 7500g por 5 minutos a 4°C. O etanol foi removido sem tocar no pellet e o tubo foi deixado por 10 minutos na capela para evaporação do restante do etanol e secagem do pellet de RNA. O RNA total foi redissolvido em 30 µL de água tratada com Dietilpirocarbonato (DEPC). O RNA foi, então, incubado em banho seco a 55°C por 5 minutos e transferido imediatamente para o gelo.

A solução obtida foi tratada com 3 µL de tampão de DNase 1 e 3 µL de DNase, para cada amostra. Em seguida, incubada por 15 minutos a temperatura ambiente.

Os passos seguintes objetivaram inativar a DNase da preparação com a adição de 3 µL de solução de EDTA 25 mM (quantidade igual a 10% do volume total da solução), agitação cuidadosa do tubo (para dispersar o reagente) e incubação por 10 minutos a 65 °C.

A quantidade e pureza do RNA foram determinadas em biofotômetro de luz UV (Eppendorf, Hamburg, Germany) por meio da avaliação das absorbâncias a 260 nm e da relação entre as absorbâncias a 260/280 nm, respectivamente.

A síntese de cDNA foi realizada subsequente em termociclador (MyCycler - Bio-Rad), utilizando o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription. Foram utilizados 400 ng de RNA total por amostra na presença de água livre de nucleases, tampão Tris, primers de hexâmeros randômicos, dNTPs, inibidor de RNase e enzima de transcriptase reversa, de acordo com o protocolo do fabricante (Applied Biosystems) nas seguintes condições de ciclagem: 25°C por 10 minutos, 60°C por 120 minutos e 85°C por 5 minutos.

Um microlitro (1 µL) do produto da reação de transcrição reversa foi utilizado no volume total de reação de PCR de 20 µL. Este volume incluiu, além do produto da reação de RT, 8 µL de água livre de nucleases, 10 µL de mix de reagentes para análise de expressão gênica por PCR em tempo real (TaqMan gene expression master mix) (Applied Biosystems) e 1 µL de ensaio de expressão gênica (TaqMan gene expression assays) (Applied Biosystems) para os genes alvo de humano (Tabela 1).

Tabela 1 - Informações sobre os conjuntos de primers e sondas TaqMan pré-otimizados para PCR em tempo Real (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems)

Genes	Código Applied	Nº de acesso	Pares de base
IL-10	Hs99999035_m1	NM_000572.2 (1-2)	86
IL-23	Hs00900829_g1	NM_016584.2 (3-4)	82
TGF-β	Hs00998133_m1	NM_000660.4 (6-7)	57
INF- γ	Hs00174143_m1	NM_000619.2 (1-2)	79
β-actina	Hs99999903_m1	NM_001101.3	171

As condições pré-otimizadas de ciclagem utilizadas foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. O PCR em tempo real foi realizado em um equipamento “Step One Real Time PCR System” (Applied Biosystems). Os níveis relativos da expressão dos genes foram calculados de acordo com as instruções da Applied Biosystems, utilizando a β -actina como gene normalizador.

Os dados foram expressos usando o método de Ciclo limite (Ct ou Cycle threshold), ou seja, o número de ciclos no qual a curva logarítmica de PCR cruza uma linha de corte arbitrariamente calculada. Os valores foram normalizados subtraindo-se o Ct obtido da amplificação específica do gene alvo pelo Ct do gene normalizador (ΔCt). Devido à característica logarítmica desse valor, houve a utilização do parâmetro $2^{-\Delta Ct}$ para a expressão dos dados.

Para cada amostra, as análises da expressão gênica foram realizadas em duplicada. Os experimentos foram realizados com 6 genes-alvos diferentes em cada grupo experimental. O nível de expressão relativo de cada gene avaliado foi arbitrariamente definida como 100% para mucosa gengival (controle).

4.2.4. TÉCNICA DA CITOMETRIA DE FLUXO

As amostras obtidas na etapa II do presente estudo foram submetidas à técnica da Citometria de Fluxo para avaliação e quantificação dos macrófagos (CD11b⁺/CD11c⁻) e de suas citocinas pró (IFN- γ ⁺/IL-12⁺23⁺) e anti-inflamatórias (TGF- β ⁺/ IL-10⁺).

Preparação da Suspensão Celular

As amostras foram removidas, seguindo o protocolo de assepsia, com auxílio de um Punch Keyes estéril com 6 mm de diâmetro e seccionadas em pequenos pedaços a 4°C. Esses tecidos foram incubados em meio RPMI-1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) e complementado com 50 µg/mL de Liberase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) a 37°C em dois períodos de 1 hora. Posteriormente, foi realizada a dissociação do tecido durante 1 minuto utilizando o equipamento Medimachine (BD Biosciences, San Diego, CA, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O tecido homogeneizado foi filtrado através de uma malha de nylon (Cell Strainer - 70µm; BD Biosciences, CA). A viabilidade celular foi realizada pela técnica de exclusão do azul de tripan junto utilizando uma Câmara de Neubauer.

Após centrifugação, a 1500 rpm durante 5 minutos, o sedimento celular formado foi incubado à temperatura ambiente por 30 minutos com PBS-10% de soro de coelho e, em seguida, a suspensão foi dividida em três eppendorfs, com 100 µL cada, para a formação dos painéis, sendo 1 tubo controle não marcado.

Análise dos macrófagos (CD11b⁺/CD11c⁻) e das citocinas IFN- γ , IL-12/23, TGF- β e IL-10 por Citometria de Fluxo

No primeiro passo foram pipetados em cada tubo 5 µL de anti-CD11b/PE-Cy7 (ICRF44; BD Pharmingen) e 5 µL de anti-CD11c/APC (3.9; e-Bioscience; San Diego, CA, USA) e mantidos incubados no escuro por 30 minutos a 4°C. Posteriormente foram acrescentados 250 µL de Cytofix/Cytoperm (554722; BD Bioscience) por 20 minutos a 4°C. Depois de centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos 4°C, 100 µL de Perm Wash (554723; BD Bioscience) foram adicionados a cada tubo e incubado a 4°C. Foi realizada nova centrifugação a 1500 rpm por 5 minutos a 4°C e adicionados no primeiro tubo 5 µL de anti-IL-10/PE (3F9; BD Pharmingen) e 5 µL de anti-TGF- β biotinilado (A75-3; BD Pharmingen) e FITC-streptavidin (e-Bioscience) para o painel 1 e no segundo tubo 5 µL de anti-IL-12/PE (C8.6; e-Bioscience) e 5 µL de INF- γ /FITC (4S.B3; e-Bioscience) para o painel 2. Posteriormente, as células foram ressuspensas em paraformaldeído a 1% para fixação e posterior leitura no Citômetro de Fluxo. As aquisições foram realizadas em Citômetro de fluxo Canto (FACSCanto II/BD Benckton e Dickinson) e 100.000 eventos foram analisados em cada experimento através do software BDFACSDiva.

4.3. ANÁLISE QUALITATIVA, QUANTITATIVA E ESTATÍSTICA DOS DADOS

Na etapa I, do presente estudo, todas as amostras submetidas à técnica da imunoistoquímica foram avaliadas considerando os macrófagos CD68⁺. Na avaliação qualitativa investigamos principalmente a distribuição destas populações celulares. Assim, a partir da análise qualitativa, a quantificação das células CD68⁺ foi realizada separadamente nas regiões intratumoral (em íntima associação com as células neoplásicas) e no estroma peritumoral. Essa análise quantitativa foi realizada utilizando um microscópio óptico contendo um retículo de integração em rede quadrada (CARL ZEISS, Germany) acoplado na objetiva de 40x. A área do retículo no aumento de 40x corresponde a 0,0961mm². Para cada amostra, foram analisados 10 campos microscópicos alternados, com área total de 0,961mm². A análise quantitativa foi realizada considerando tanto as células positivas quanto negativas, possibilitando, assim, a avaliação da proporção dos macrófagos. Adicionalmente, determinamos a porcentagem das células neoplásicas Ki-67⁺ e Ciclina B1⁺. O resultado foi expresso como média ± DP e a análise comparativa da quantificação das células entre os grupos analisados foi realizada utilizando o teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

A influência das células CD68⁺ no prognóstico de pacientes com CEC de cavidade oral foi avaliada através do teste de Kaplan-Meier. O período de sobrevida foi obtido calculando-se a quantidade de meses a partir da data da cirurgia até a última data de seguimento ou óbito do paciente. O número de células CD68⁺ foi dicotomizado pelo valor médio e as diferenças na sobrevida

entre os grupos foram avaliadas pelo teste de Long rank. Em adição, foi avaliada a correlação entre a proporção dessas células e os fatores de prognóstico clínico (como o tamanho da lesão primária, sobrevida e metástase) e microscópico (gradação tumoral, invasão local, proporção de células ciclinas B1+, células Ki-67⁺ e intensidade do infiltrado inflamatório) através do teste de correlação de Spearman.

Na etapa II, os dados referentes a quantificação dos macrófagos (CD11b⁺/CD11c⁻) e das citocinas (IL-10⁺, IL-12⁺23⁺, IFN-γ⁺ e TGF-β⁺) foram avaliados utilizando o programa BD FACSDiva Software 6.0 e 100.000 eventos foram registrados em cada experimento. Os resultados de cada grupo experimental foram expresso como média ± DP e, posteriormente, submetidos ao teste estatístico não-paramétrico de Mann-Whitney. Adicionalmente, os dados obtidos a partir da avaliação quantitativa da expressão gênica de mRNA das proteínas IL-10, IL-23, INF-γ e TGF-β nas amostras de CEC de cavidade oral e nas amostras controles, foram submetidos ao teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

Todos os testes estatísticos foram aplicados utilizando-se o programa SPSS 17.0 for Windows (Chicago, IL, USA), e os gráficos desenvolvidos através do programa Origin 6.0. (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Apenas valores de P<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

5. REFERÊNCIAS¹

1. ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S. Imunidade contra tumores. In: ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S, editores Imunologia Celular e Molecular. 6^o ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008. p. 397-417.
2. ALMOFTI A, UCHIDA D, BEGUM NM, TOMIZUKA Y, IGA H, YOSHIDA H, et al. The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. Int J Oncol 2004; 25: 65-71.
3. 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: 229-49.
4. BALKWILL F, MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? The Lancet 2001; 357: 539-45.
5. BANCHEREAU J, STEINMAN RM. Dendritic cells and the control of immunity. Nature 1998; 392: 245-52.
6. BARNES L, EVESON JW, REICHART P, SINDRANSKY D. Pathology & genetics head and neck tumours. World health organization classification of tumours. In: Slootweg PJ, Eveson JW. Tumours of the oral cavity and oropharynx: Introduction. In: Johnson N et al. Squamous cell carcinoma Lyon: IARCPress, 2005. p.166-7, p.168-75.

1- As referências apresentadas nesse capítulo se referem àquelas citadas na Caracterização do problema, Justificativa e Métodos, e não às apresentadas no artigo científico. Referências seguindo as normas Vancouver.

7. BRENER S, JEUNON FA, BARBOSA AA, GRANDINETTI HAM. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Rev Bras Cancerol* 2007; 53: 63-9.
8. BRIGATI C, NOONAN DM, ALBINI A, BENELLI R. Tumor and inflammatory infiltrates: friends or foes. *Clin Exp Metastasis* 2002; 19: 247-58.
9. BUI JD, SCHREIBER RD. Cancer immunosurveillance, immunoediting and inflammation: independent or interdependent processes? *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 203-8.
10. COSTA NL, ALENCAR RC, VALADARES MC, SILVA TA, MENDONÇA EF, BATISTA AC. The clinicopathological significance of the expression of Granzyme B in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2010; 46: 185-9.
11. COSTA NL, GONÇALVES AS, SOUZA-LIMA NC, JAIME-PAIVA LG, JUNQUEIRA-KIPNIS AP, SILVA TA, et al. Distinct expression of perforin and granzyme B in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2011; 40: 380-4.
12. COUSSENS LM, WERB Z. Inflammation and Cancer. *Nature* 2002; 420: 19-26.
13. DORTA RG, LANDMAN G, KOWALSKI LP, LAURIS JR, LATORRE MR, OLIVEIRA DT. Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology* 2002; 41: 152-7.

14. FEINMESSER M, OKON E, SCHWARTZ A, KAGANOVSKY E, HARDY B, AMINOV E, et al. Histologic and immunohistochemical characterization of tumor and inflammatory infiltrates in oral squamous cell carcinomas treated with local multikine immunotherapy: the macrophage at the front line. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004; 261: 359-68.
15. FERREIRA FO, RIBEIRO FLL, BATISTA AC, LELES CR, ALENCAR RCG, SILVA TA. Association of CCL2 with lymph node metastasis and macrophage infiltration in oral cavity and lip squamous cell carcinoma. *Tumor Biol* 2008; 29: 114-21.
16. FUNADA Y, NOGUCHI T, KIKUCHI R, TAKENO S, UCHIDA Y, GABBERT HE. Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2003; 10: 309-13.
17. GINDERACHTER JOA, MOVAHEDI K, GHASSABEH GH, MEERSCHAUT S, BESCHIN A, RAES G, et al. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. *Immunobiology* 2006; 211: 487-501.
18. GOLDSMITH MM, BELCHIS DA, CRESSON DH, MERRITT WD, ASKIN FB. The importance of eosinophil in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1992; 106: 27-33.
19. GRIVENNIKOV SI, GRETEN FR, KARIN M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140: 883-99.

20. HANAHAN D, LANZAVECCHIA A, MIHICH E. Fourteenth Annual Pezcoller Symposium: the novel dichotomy of immune interactions with tumors. *Cancer Res* 2003; 63: 3005-8.
21. HIRATSUKA H, MIYAKAWA A, NAKAMORI K, KIDO Y, SUNAKAWA H, KOHAMA G. Multivariate analysis of occult lymph node metastasis as a prognostic indicator for patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1997; 80: 351-6.
22. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Estimativa 2012: Incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2011. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>
23. INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER. TNM classification of malignant tumours. 4.ed. Berlin: Springer-Verlag; 1987.
24. JORDAN RC, DALEY T. Oral squamous cell carcinoma: new insights. *J Can Dent Assoc* 1997; 63: 517-8.
25. KOIDE N, NISHIO A, HIRAGURI M, KISHIMOTO K, NAKAMURAT, ADACHI W, et al. Differences and relationship of thymidine phosphorylase expression in tumorassociated macrophages and cancer cells in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Dis Esophagus* 2002; 15: 57-73.
26. KOIDE N, NISHIO A, SATO T, SUGIYAMA A, MIYAGAWA S. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage

infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus. *Am J Gastroenterol* 2004; 99: 1667-74.

27. LANGOWSKI JL, ZHANG X, WU L, MATTSON JD, CHEN T, SMITH K, et al. IL-23 promotes tumour incidence and growth. *Nature* 2006; 442: 461-5.

28. LI C, SHINTANI S, TERAOKA N, NAKASHIROKI, HAMAKAWA H. Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep* 2002; 9: 1219-23.

29. LIOTTA LA, KOHN EC. The microenvironment of the tumor-host interface. *Nature* 2001; 411: 375-9.

30. LIN WW, KARIN M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest* 2007; 117: 1175-83.

31. 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: 277-85.

32. MANTOVANI A, BOTTAZZI B, COLOTTA F, SOZZANI S, RUCO L. The origin and function of tumor associated macrophages. *Immunology Today* 1992; 137: 265–70.

33. MARCUS B, ARENBERG D, LEE J, KLEER C, CHEPEHA DB, SCHMALBACH CE, et al., Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2004; 101: 2779-87.

34. MASSANO J, REGATEIRO FS, JANUÁRIO G, FERREIRA A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102: 67-76.
35. MILLS CD, KINCAID K, ALT JM, HEILMAN MJ, HILL AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. *J Immunol* 2000; 164: 6166-73.
36. NEVILLE BW, DAY TA. Oral Cancer and Precancerous Lesions. *CA Cancer J Clin* 2002; 52: 195-215.
37. OKURA M. Lymph node metastasis. *Recent Res Devel Cancer* 2002; 4: 331-7.
38. OLIVEIRA-NETO HH, LEITE AFO, COSTA NL, ALENCAR RCG, SILVA TA, LELES CR, et al. Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: possible failure in the migration of these cells. *Oral Oncol* 2007, 43: 484-90.
39. OLIVEIRA-NETO HH, SILVA ET, LELES CR, MENDONÇA EF, ALENCAR RCG, SILVA TA, et al. Involvement of CXCL12 and CXCR4 in lymph node metastasis and tumor proliferation in oral squamous cell carcinomas. *Tumour Biol* 2008; 29: 262-71.
40. PINDBORG JJ, WAHI PN. Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. World Health Organization Classification of Tumours. 2th ed. Berlin: Springer-Verlag, 1997.
41. REZENDE TMB, VIEIRA LQ, CARDOSO FP, OLIVEIRA RR, OLIVEIRA MENDES ST, JORGE MLR, et al. The effect of mineral trioxide aggregate on

phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. *Int Endod J* 2007; 40: 603-11.

42. SANDERSON RJ, DE BOER MF, DAMHUIS RA, MEEUWIS CA, KNEGT PP. The influence of alcohol and smoking on the incidence of oral and oropharyngeal cancer in women. *Clinical Otolaryngol Allied Scienc* 1997; 22: 444-8.

43. SHIMURA S, YANG G, EBARA S, WHEELER TM, FROLOV A, THOMPSON TC. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. *Cancer Res* 2000; 60: 5857-61.

44. SICA A, SCHIOPPA T, MANTOVANI A, ALLAVENA P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur J Cancer* 2006;42: 717-72.

45. SILVA TA, RIBEIRO FLL, OLIVEIRA-NETO HH, WATANABE S, ALENCAR RCG, FUKADA S, et al. Dual role of CCL3/CCR1 in oral squamous cell carcinoma: implications in tumour metastasis and local host defense. *Oncol Rep* 2007, 18: 1107-13.

46. SPIRO RH, GUILLAMONDEGUI OJR, PAULINO AF, HUVOS AG. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head Neck* 1999; 21: 408-13.

47. TÍMÁR J, LADÁNYI A, FORSTER-HORVÁTH C, LUKITS J, DOME B, REMENÁR E, et al. Neoadjuvant immunotherapy of oral squamous cell carcinoma modulates intratumoral CD4/CD8 ratio and tumor microenvironment: a multicenter phase II clinical trial. *J Clin Oncol* 2005; 23: 3421-31.
48. TUMULURI V, THOMAS GA, FRASER IS. The relationship of proliferating cell density at the invasive tumour front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2004; 33: 204-8.
49. VAN DIEST PJ, BRUGAL G, BAAK JP. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J Clin Pathol* 1998; 51: 716-24.
50. VAN KEMPEN LC, RHEE JS, DEHNE K, LEE J, EDWARDS DR, COUSSENS LM. Epithelial carcinogenesis: dynamic interplay between neoplastic cells and their microenvironment. *Differentiation* 2002; 70: 610-23.
51. VAN KEMPEN LC, RUITER DJ, VAN MUIJEN GN, COUSSENS LM. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. *Eur J Cell Biol* 2003; 82: 539-48.
52. VISSCHER JDAM, WAN DER WAAL I. Etiology of cancer of the lip. A review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1998; 27: 199-203.
53. VISSER KE, COUSSENS LM. The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. *Cancer Immunol Immunother* 2005; 54: 1143-52.

54. VISSER KE, EICHTEN A, COUSSENS LM. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature* 2006; 6: 24-36.
55. ZAMARRON BF, CHEN W. Dual roles of immune cells and their factors in cancer development and progression. *Int J Biol Sci* 2011; 7: 651-8.
56. ZANCOPE E, COSTA NL, JUNQUEIRA-KIPNIS AP, VALADARES MC, SILVA TA, LELES CR, et al. Differential infiltration of CD8+ and NK cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2010; 39: 162-7.

6. PUBLICAÇÃO

Título - Tumor-associated macrophages and profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma

Autores - Costa NL, Valadares MC, Souza PC, Mendonça EF, Oliveira JC, Silva TA, Batista AC.

Artigo aceito para publicação no periódico Oral Oncology (Normas - Anexo 4)

Site: <http://www.oraloncology.com/>

DOI: 10.1016/j.oraloncology.2012.09.012

Ref.: Ms. No. OO-D-12-482R1

TUMOR-ASSOCIATED MACROPHAGES AND THE PROFILE OF INFLAMMATORY
CYTOKINES IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Oral Oncology

Dear Dr. Batista,

Thank you for submitting your manuscript to Oral Oncology. We are pleased to accept it for publication in the journal.

Your manuscript has been sent to Elsevier's Production Department. In due course you will receive one set of page proofs in PDF format via email, which should be checked for typesetting and editing errors. Proofs will only be sent to the corresponding author.

Each issue of Oral Oncology features a figure - or part of a figure - on the front cover. The figure is chosen from one of the papers published in the issue. If you do not want the figures in your paper to be featured on the front cover, please inform the Editorial Office and we will note this information.

You will receive email alerts informing you of changes to your paper's production status and receive links to the online version of your paper in press and in its final version on ScienceDirect.

Congratulations on an interesting piece of research, and thank you for allowing us to publish this valuable material in Oral Oncology. We hope that you will consider submitting further high quality manuscripts to the journal.

Yours sincerely,

Dr. Ezra Cohen

Editor-in-Chief
Oral Oncology

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conclusão, nossos resultados sugerem que no microambiente do CEC de cavidade oral há um predomínio do fenótipo M2. Adicionalmente, essas células podem favorecer a metástase e, conseqüentemente, reduzir a sobrevida dos pacientes, provavelmente contribuindo com uma imunossupressão local via produção de TGF- β .

ANEXOS E APÊNDICES

Anexo 1 – Artigos Adicionais

Conforme as normas do programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do título de doutora em Ciências da Saúde é necessário a publicação de pelo menos 2 artigos científicos, sendo o segundo e demais artigos vinculados, ou não, a tese. Desta forma, segue-se abaixo a lista dos artigos adicionais desenvolvidos durante o curso de doutorado.

Artigo 1: Artigo publicado na revista Journal of Oral Pathology and Medicine.

Costa NL, Gonçalves AS, Souza-Lima NC, Jaime-Paiva LG, Junqueira-Kipnis AP, Silva TA, Mendonça EF, Batista AC. **Distinct expression of perforin and granzyme B in lip and oral cavity squamous cell carcinoma.** J Oral Pathol Med. 2011 May;40(5):380-4.

Artigo 2: Artigo publicado na revista Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.

Batista AC, **Costa NL**, Oton-Leite AF, Mendonça EF, Alencar RC, Silva TA.
Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2010 Mar;109(3):e74-9.

Artigo 3: Artigo publicado na revista Journal of Oral Pathology and Medicine.

Jham BC, **Costa NL**, Silva JM, de Miranda AC, Oliveira JC, Silva TA, Batista AC. **Midkine expression in oral squamous cell carcinoma and leukoplakia.**
J Oral Pathol Med. 2011 Jan;41(1):21-6.

Artigo 4: Artigo submetido ao periódico Histology and Histopathology.

Gonçalves AS, **Costa NL**, Arantes DAC, Alencar RCG, Silva TA, Batista AC.

Immune cell response in cervical lymph oral cavity squamous cells carcinoma.

Anexo 2 – Parecer do Comitê de Ética

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Cirurgiã Dentista: Nádia do Lago Costa

ORIENTADORA: Dra. Aline Carvalho Batista

TÍTULO: “Caracterização das populações de macrófagos e avaliação da relação dessas células com o prognóstico do carcinoma espinocelular de boca”.

Área Temática: Grupo III

Área de Conhecimento: Ciências Humanas/Odontologia

Local de Realização: Setor de Cabeça e Pescoço – Hospital Araújo Jorge/ACCG

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG **analisou e aprovou** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa (*Resolução 340/2004 – item VI.3*).

O Pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, **relatórios semestrais** do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão (ões) e publicação (ões).

Dra. Juliana Castro Dourado Pinezi

Coordenadora do CEP/ACCG



(62) 3878-7000 | 3243-7000
Rua 239, nº 206, St. Universitário
Goiânia · Goiás · Brasil · CEP 74.605-070
www.accg.org.br

Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Meu nome é Nádia do Lago Costa, sou a pesquisadora responsável e minha área de atuação é como cirurgiã-dentista e doutoranda da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás.

Após ler com atenção este documento e ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato comigo, Dra. Nádia do Lago Costa, nos telefones: (62) 3209-6327 e/ou (62) 8578-0932. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás, no telefone: (62) 3243-7050.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE A PESQUISA:

- **Título:** Caracterização das populações de macrófagos e avaliação da relação dessas células com o prognóstico do carcinoma espinocelular de boca.
- O termo de consentimento será aplicado por mim, Nádia do Lago Costa, doutoranda do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás e pesquisadora responsável pela execução do presente projeto.
- A pesquisa tem como objetivos caracterizar as populações de macrófagos (um tipo de célula) e avaliar a relação dessas células com algumas características do carcinoma espinocelular de boca (um tipo de câncer).
- Ao participar deste estudo o(a) sr.(sra.) permitirá que eu obtenha um pequeno pedaço da lesão que foi removida de sua cirurgia e uma pequena quantidade de sangue (4 mL). Nós realizaremos alguns estudos em laboratório com esse pequeno pedaço da sua lesão.
- A participação do sr.(sra.) nesta pesquisa não traz complicações legais. Os procedimentos adotados obedecem aos Critérios da Ética em Pesquisa com Seres Humanos conforme Resolução no. 196/96 do Conselho Nacional de Saúde. Os procedimentos usados não oferecem riscos à sua dignidade ou integridade física, prejuízos ou lesões.
- Em caso de algum dano decorrente de sua participação na pesquisa o sr.(sra.) terá o direito de pedir indenização.
- O(A) sr.(sra.) não terá nenhum tipo de despesa para participar desta pesquisa, bem como nada será pago por sua participação.
- A sua participação no referido projeto não acarretará em algum tipo de pagamento ou gratificação financeira;
- Ao participar desta pesquisa o(a) sr.(sra.) não terá nenhum benefício direto. Entretanto, esperamos que este estudo traga informações importantes sobre o câncer de boca, de forma que o conhecimento que será construído a partir desta pesquisa possa contribuir para o entendimento dessa doença e para a realização de novos estudos no tratamento dessa lesão, onde a pesquisador se compromete a divulgar os resultados obtidos.

- Para sua participação não serão necessárias nenhum tipo de intervenção e tratamentos adicionais, bem como métodos alternativos;
- O projeto terá duração de 48 meses, mas sua participação será apenas durante a aplicação deste TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO;
- Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente CONFIDENCIAIS. Somente o(a) pesquisador(a) e o(a) orientador(a) terão conhecimento dos dados.
- O(A) sr.(sra.) possui a garantia expressa de liberdade de não aceitação, bem como de retirar o consentimento, sem qualquer prejuízo da continuidade do acompanhamento/tratamento usual;
- Todos os dados coletados serão utilizados apenas para esta pesquisa e não serão armazenados para estudos futuros.

Nome e Assinatura do pesquisador _____

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____, RG _____
 CPF _____ nº de prontuário _____ nº
 de matrícula _____, abaixo assinado, concordo em participar do
 estudo **Caracterização das populações de macrófagos e avaliação da relação dessas
 células com o prognóstico do carcinoma espinocelular de boca**, sob a
 responsabilidade da Dra. Aline Carvalho Batista, como sujeito voluntário. Fui
 devidamente informado e esclarecido pelo pesquisadora, Nádia do Lago Costa, sobre a
 pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios
 decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu
 consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou
 interrupção de meu acompanhamento/ assistência/ tratamento.

Local e data _____

Nome e Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Assinatura Dactiloscópica:



Nome e assinatura do Pesquisador Responsável _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e
 aceite do sujeito em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

Anexo 4 – Normas de publicação do periódico ORAL ONCOLOGY