

**SABRINA PINOTTI FERREIRA LEITE**

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA QUEILITE ACTÍNICA,  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO E  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE INTRABUCAL**



2011

**SABRINA PINOTTI FERREIRA LEITE**

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA QUEILITE ACTÍNICA,  
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO E CARCINOMA  
EPIDERMÓIDE INTRABUCAL**

**Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.**

**Orientador: Profa. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante**

**São José dos Campos**

**2011**

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para  
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos  
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

L536e Leite, Sabrina Pinotti Ferreira.  
Estudo imunoistoquímico da queilite actínica, carcinoma  
epidermóide de lábio e carcinoma epidermóide intrabucal /  
Sabrina Pinotti Ferreira Leite. \_\_ São José dos Campos: [s.n.],  
2011.  
72 .f. : il.

Dissertação (Mestrado em Biopatologia Bucal) – Faculdade  
de Odontologia de São Jose dos Campos, Universidade  
Estadual Paulista, 2011.

Orientador: Profa. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante

1. Sistema Imunológico. 2. Linfócitos T CD4+ e T CD8+. 3.  
Mastócitos. 4. Carcinoma. 5. Epidermóide oral. 6. Queilite  
actínica. I. Cavalcante, Ana Sueli Rodrigues. II. Universidade  
Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos  
Campos. III. Título

tD79

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

## AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por  
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 27 de Junho de 2011.

Assinatura:

E-mail: sabrina\_pinotti@hotmail.com

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante** (Orientador)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Univ. Estadual Paulista

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Renata Falchete do Prado**

Faculdade Hamilton Vieira Mendes - ESC

**Prof<sup>a</sup>. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho**

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

Universidade Estadual Paulista – UNESP

São José dos Campos, 28 de julho de 2011.

## **DEDICATÓRIA**

*A **Deus**, antes de qualquer coisa, pela minha vida e por me dar a oportunidade de ser tão amada, pela força e Paz interior. E a todos os **Seres Iluminados**, obrigada.*

*Aos meus pais, **Kátia Maria Pinotti e Thelmo Ferreira Leite**, parte essencial do ar que respiro, meu porto seguro, minha vida. Agradeço por serem esses pais tão especiais e pelo grande amor por mim. Pelo carinho, paciência e dedicação.*

*Aos meus irmãos, **Bruna Pinotti Ferreira Leite e Yan Maciel Ferreira Leite**, pelo carinho e amor incondicional, meus tesouros. Obrigada, meus lindos!*

*À vovó **Doca** por trazer tanta alegria e me fazer sorrir sempre, pelos momentos ao seu lado. Tê-la ao meu lado torna minha vida muito mais alegre, és um grande presente de Deus.*

*Aos meus avós **Humberto Pinotti Filho** (in memorian), **Irene de Oliveira Ferreira Leite** (in memorian) e **Manoel Ferreira Leite** (in memorian), por tudo que me ensinaram nessa vida, pelo amor e carinho, pelas lembranças mais inesquecivelmente especiais.*

*Aos tios **Jéssie Maria Pinotti, Mônica Maria Pinotti e Alexandre José Pinotti, Nóris Sanches Pinotti**, pelo carinho e dedicação. Pelo apoio sem o qual não teria chegado tão longe, pelos exemplos, conselhos e amor.*

*Aos primos **Rafael e Liandra**, contemporâneos das minhas experiências estudantis, por todo o apoio nas horas de incerteza e dúvidas e por seu desprendimento nas dicas baseadas em suas experiências pessoais.*

*À minha “segunda-mãezinha”, **Dna. Tereza** (in memorian), por ter me acompanhado sempre, a cada segundo, com um inapagável sorriso, tornando mais macios os meus nem sempre tão suaves caminhos.*

*À **Irene Matos**, uma amiga parte da família, pelo exemplo de luta e força, pela pessoa tão iluminada que és. Valeu mesmo pela companhia de almoço de quase todos os dias, pelas conversas e risadas.*

*A todos os grandes amigos, por estarem comigo nessa caminhada, pela força, amizade e carinho, sem vocês não sou nada.*

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

*A minha orientadora, **Prof. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante**, pela dedicação e paciência, pela orientação e todo aprendizado, pelo exemplo não somente acadêmico e também pessoal e de grande valia, obrigada.*

*A **Prof. Dra. Ana Lia**, pela participação na pesquisa, pelo auxílio e atenção e pelas dicas e conselhos fundamentais para meu aprendizado.*

*Aos colegas de laboratório, **Ana Lourdes, Salete e Walter**, por todo apoio e dedicação, muito obrigada.*

*As adoradas amigas e parceiras de Pós Graduação, **Pamela Diniz, Adriana Delgado, Gabriela Lima, Márcia Gimenes, Maria José Castro**, pelos momentos e risadas, pela grande parceria, pela amizade verdadeira, pelos cafés e prosas, por todas os dias de chuva e sol, pelas farras, um beijo queridas.*

*Ao grande amigo de pós-graduação **Bruno Melo**, grande inspiração que me trouxe mais próxima dessa escolha e a quem agradeço muito pela força e amizade.*

*A pessoas especiais como **Pablo Rafael Setimi, Raquel Dias, Daniela Damiati Ferreira, Eduardo Alexandre Ferreira, Ana Clara, Gustavo Rodrigues Alves , Gustavo Costa, Celina Faig Lima Carta, Daniele Paschotto, Geraldo Miranda, Michele Santos, Roberta Obregon de Melo**, cada um com sua peculiaridade sempre muito presentes e essenciais para meu viver, agradeço muito pelo carinho, amizade e carrego comigo eternamente a gratidão pela oportunidade de tê-los em minha vida.*

*Aos monges e amigos **Kelsang Tsultrim e Kelsang Tsulma**, pelos ensinamentos e exemplos que ajudaram a tornar minha caminhada mais clara e serena e a conquista da Paz interior essencial para o meu viver.*



## **AGRADECIMENTOS**

*A Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP, especialmente ao Programa de Pós Graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa de sua coordenadora, Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito, agradeço pela oportunidade de fazer parte deste programa e todo apoio.*

*Aos professores do Programa de Pós Graduação, em especial a: Profa. Tit. Yasmin Carvalho Rodarte pela dedicação e por compartilhar suas experiências e pelo grande exemplo de sabedoria e dedicação, à Profa. Adj. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão pelo apoio e por estar sempre presente e disposta a ensinar e acrescentar, obrigada professora.*

*Ao Centro de Biociências Aplicado a Pacientes Especiais – CEBAPE, de maneira especial à Profa. Adj. Mônica Fernandes Gomes, pelas portas abertas, pela dedicação e cuidado especial com a vida.*

*Agradeço aqui também àqueles estão longe, mas compartilharam desses momentos comigo. Com quem quero dividir neste momento a felicidade e extrema satisfação de chegar ao final de mais uma etapa,*

*Muito Obrigada!*

"É melhor atirar-se à luta em busca de dias melhores, mesmo correndo o risco de perder tudo, do que permanecer estáticos como pobres de espírito que não lutam, mas também não vencem, que não conhecem a dor da derrota nem a glória de ressurgir dos escombros. Esses pobres de espírito, ao final de sua jornada na Terra, não agradecem a Deus por terem vivido, mas desculpam-se, perante Ele, por terem apenas passado pela vida"

Bob Marley

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMO .....</b>	<b>13</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Amostra .....</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Avaliação Clínica .....</b>	<b>28</b>
<b>4.3 Procedimentos Cirúrgicos .....</b>	<b>28</b>
<b>4.4 Procedimentos laboratoriais e análise histomorfométrica .....</b>	<b>29</b>
<b>4.5 Análise estatística.....</b>	<b>32</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Perfil das Amostras .....</b>	<b>34</b>
<b>5.2 Marcação de Linfócitos e Mastócitos .....</b>	<b>35</b>
<b>5.2.1 Marcação de Linfócitos T CD4+.....</b>	<b>35</b>
<b>5.2.2 Marcação de Linfócitos T CD8+.....</b>	<b>38</b>
<b>5.2.3 Marcação de MCs.....</b>	<b>41</b>
<b>5.3 Marcação de T CD4+, TCD8+ e MCs vs. Displasia epitelial .....</b>	<b>45</b>
<b>5.4 Marcação de T CD4+, TCD8+ e MCs vs. diferenciação do CE.....</b>	<b>46</b>
<b>5.5 Marcação de T CD4+, TCD8+ e MCs subepitelial da QA de baixo e alto risco (Sistema Binário) vs. a marcação de T CD4+, TCD8+ e MCs intraepitelial e estroma do CB e CL quanto aos graus de diferenciação celular. ....</b>	<b>49</b>
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>53</b>
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>59</b>

<b>8 REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>67</b>
<b>ANEXO A .....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO B .....</b>	<b>69</b>

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Anti-CD4 = anticorpo monoclonal que cora linfócito T CD4+

Anti-CD8 = anticorpo monoclonal que cora linfócito T CD4+

AC = Actinic cheilitis

alto = alto grau de malignidade

bd = bem diferenciado

bg = baixo grau de malignidade

CB = Carcinoma epidermóide de língua

CE = Carcinoma epidermóide

CEP = Comitê de Ética em Pesquisa

Cel = células

CL = Carcinoma epidermóide de lábio inferior

DAB = diaminobenzidina

EDTA = ácido etilenodiamino tetra-acético

epi = epitelial – intraepitelial

Estro = estroma / stroma

Foxp3+ = subtipo de célula T reguladora

FPS = fator de proteção solar

HE = hematoxilina e eosina

hg = high degree of malignancy

ICAM-1 = Molécula de adesão intracelular

ie = intraepitelial / intraepithelial

IL = interleucina

INCA = Instituto Nacional de Câncer

LDP = laboratório da disciplina de patologia

LFA-1 = antígeno 1 associado a função linfocítica

lg = low degree of malignancy = baixo grau de malignidade

LSAB = kit de imunistoquímica

MC ou MCs = mastócito (s)  
Mm<sup>2</sup> = milímetro quadrado  
Mild = leve  
min. = minutos  
md = moderadamente diferenciado / moderately differentiated  
mod = moderadado (a) / moderated  
NK = células matadoras naturais  
OMS = Organização Mundial da Saúde  
PH = potencial hidrogeniônico  
QA = Queilite actínica  
SCC = squamous cell carcinoma  
SPSS = software estatístico  
Sub = subepitelial / subepithelial  
T CD4+ = Linfócito T CD4+  
T CD8+ = Linfócito T CD8+  
TCR = receptores de célula T  
TILs = Tumor infiltrating lymphocytes = linfócitos infiltrando tumores  
TNM = Classificação de tumores malignos - estadiamento tumor, linfonodo, metástase  
UICC = Union Internationale Contre le Cancer  
UK = United Kingdom  
UV = Ultravioleta  
UVA = raio ultra violeta tipo A  
UVB = raio ultra violeta tipo B  
VCAM-1 = molécula de adesão vascular  
VWR = Vlaams-Brabant-Heverlee – empresa de materiais e produtos científicos  
wd = well differentiated = bem diferenciado  
x = vezes de ampliação

Leite SPF. Estudo imunoistoquímico da queilite actínica, carcinoma epidermóide de lábio e carcinoma epidermóide intrabucal [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2011.

## RESUMO

O presente projeto de pesquisa objetiva avaliar a marcação de mastócito (MCs)s, linfócitos T CD4+ e, linfócitos T CD8+ na queilite actínica (QA), carcinoma epidermóide (CE) de lábio e CE de língua. Investigamos se há diferença na proporção dos MCs, T CD4+ e T CD8+, levando em consideração os graus de displasia epitelial da QA bem como os graus de diferenciação celular do CE de lábio e CE de língua. Estudamos ainda alterações arquiteturais e citológicas da QA e os graus de diferenciação celular CE de lábio e CE de língua. A amostra foi composta de 30 casos de QA em lábio inferior (grupo 1), 30 de CE primário em lábio inferior (grupo 2), 30 de CE primário em língua (grupo 3) com diagnóstico clínico e histopatológico e 10 casos de grupo controle. As peças foram coradas histoquimicamente com hematoxilina e eosina H&E, anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e triptase. Todos os casos foram avaliados em toda sua extensão, em microscópico de luz em 100x, 200x e 400x. A marcação de T CD4+ na QA e grupo controle subepitelial foi de  $9,2 \pm 4,64$  e  $5,2 \pm 3,25$  respectivamente; CL e CB intraepitelial foi de  $11,40 \pm 7,06$  e  $18,33 \pm 17,36$ , e CL e CB estroma foi  $9,70 \pm 5,59$  e  $15,80 \pm 15,11$  respectivamente. A marcação de T CD8+ na QA e grupo controle subepitelial foi de  $8,00 \pm 4,64$  e  $4,50 \pm 3,25$  respectivamente; CL e CB intraepitelial foi de  $21,20 \pm 35,51$  e  $17,67 \pm 17,17$ , e CL e CB estroma foi  $17,17 \pm 22,91$  e  $17,63 \pm 12,50$  respectivamente. A marcação de MCs na QA e grupo controle subepitelial foi de  $10,37 \pm 4,67$  e  $7,80 \pm 4,07$  respectivamente; CL e CB intraepitelial foi de  $11,40 \pm 7,06$  e  $10,43 \pm 5,26$ , e CL e CB estroma foi  $9,70 \pm 5,59$  e  $12,17 \pm 5,93$  respectivamente. O tratamento estatístico foi realizado pelos testes de Kruskal-Wallis x Mann Whitney, com nível de significância de 5%. Houve diferença estatisticamente significativa ( $p= 0,0001$ ): na QA leve X CB bd, QA mod X CB md, QA bg X QA sub; QA bg X CL ie; QA bg X CL estro, QA alto x CL estro e QA bg X CB estro, na marcação de T CD4+. Na marcação de T CD8+ a estatística foi significativa ( $p= 0,0001$ ): na QA mod X CL md, QA bg X QA sub; QA bg X CL ie; QA bg X CL estro, QA alto X CL estro, QA bg X CB epi e QA bg X CB estro. Para os mastócitos tivemos significância estatística ( $p= 0,0001$ ) em QA bg X QA sub; QA bg X CL ie; QA bg X CL estro, QA alto X CL estro, QA bg X CB estro. Conclui-se que a marcação das células T CD4+ e T CD8+ apresentou sinergismo que vem a

contribuir para um melhor prognóstico dos pacientes portadores de QA, CB e CL. No caso dos MCs não podemos avaliá-lo isoladamente porque não apresentaram resultado significativamente significativo, quando a marcação desses nas doenças estudadas foi comparada.

Palavras-chave: Sistema imunológico. Linfócitos T CD4+ e T CD8+. MCs,. Triptase. Carcinoma epidermóide. Queilite Actínica. Carcinoma Epidermóide Intra-oral.



Leite SPF. Actinic cheilitis immunohistochemical study, lips and intraoral squamous cell carcinoma [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – Univ. Estadual Paulista; 2011.

## ABSTRACT

The aim of the present research was to evaluate the expression of mast cells (MCs), CD4+ T lymphocytes and CD8+ T lymphocytes in actinic cheilitis (AQ), squamous cell carcinoma (SCC) of lip and SCC of tongue. We investigated eventual differences in the proportion of the MCs, CD4+ T and CD8+ T cells taking into consideration the degrees of the AQ epithelial dysplasia as well as the degrees of cellular differentiation of SCC of lip and SCC of tongue. We also examined the AQ architectural and cytological changes and the cellular differentiation of SCC of lip and SCC of tongue. Sampling consisted of 30 cases of AQ in lower lip (group 1), 30 cases of primary SCC in lower lip (group 2), 30 primary SCC in tongue (group 3) with clinical and histopathological diagnosis and 10 cases of control group. The specimens were histochemically stained with hematoxylin and H & E eosin, anti-CD4, and anti-CD8 antibodies and tryptase. All cases were fully evaluated, under a light microscope at 100x, 200x and 400x. The CD4+ T expression in AQ and sub epithelial control group were  $9,2 \pm 4,64$  and  $5,2 \pm 3,25$ , respectively; intraepithelial SCC of lower lip and SCC of tongue were  $11,40 \pm 7,06$  and  $18,33 \pm 17,36$ , and stroma of SCC of lower lip and stroma of SCC of tongue were  $9,70 \pm 5,59$  and  $15,80 \pm 15,11$  respectively. Expression of CD8+ T in AQ and sub epithelial control group were  $8,00 \pm 4,64$  and  $4,50 \pm 3,25$  respectively; intraepithelial SCC of lower lip and SCC of tongue were  $21,20 \pm 35,51$  e  $17,67 \pm 17,17$ , and stroma of SCC of lower lip and stroma of SCC of tongue were  $17,17 \pm 22,91$  and  $17,63 \pm 12,50$  respectively. MCs expression in AQ and sub epithelial control group were  $10,37 \pm 4,67$  and  $7,80 \pm 4,07$  respectively; intraepithelial SCC of lower lip and SCC of tongue were  $11,40 \pm 7,06$  and  $10,43 \pm 5,26$ , and stroma of SCC of lower lip and stroma of SCC of tongue were  $9,70 \pm 5,59$  and  $12,17 \pm 5,93$  respectively. Statistical analysis was performed through Kruskal-Wallis x Mann Whitney tests, with a significance level of 5%. There was a statistically significant difference ( $p= 0,0001$ ) in the cases: mild AQ X wd SCC of tongue, mod AQ X md SCC of tongue, lg AQ X sub AQ; bg AQ X ie SCC of the lower lip; lg AQ X estro SCC of the lower lip, hg AQ x estro SCC of the lower lip e lg AQ X estro SCC of tongue, in the expression of CD4+ T cells. The expression of CD8+ T cells was statistically significant ( $p= 0,0001$ ): in the mod AQ X md SCC of the lower lip, lg AQ X sub AQ; lg

AQ X ie SCC of the lower lip; Ig AQ X estro SCC of the lower lip, hg AQ X estro SCC of the lower lip, Ig AQ X epi SCC of the tongue and Ig AQ X estro SCC of the tongue. For the mast cells the statistical results were significant ( $p= 0,0001$ ) in Ig AQ X sub AQ; Ig AQ X ie SCC of the lower lip; Ig AQ X estro SCC of the lower lip, hg AQ X estro SCC of the lower lip, Ig AQ X estro SCC of the tongue. Conclusion was made that expression of cells CD4+ T and CD8+ T showed a synergism that comes to contribute for a better prognostic of patients with AQ, SCC of tongue and SCC of lower lip. As for the MCs we cannot have a separate evaluation because they did not show significant results when expressions were compared in the studied diseases.

*Keywords: Immune system. CD4+ T and CD8+ T lymphocytes. MCs. Tryptase. Squamous cell carcinoma. Actinic Cheilitis. Intra-oral squamous cell carcinoma*

## 1 INTRODUÇÃO

Queilite actínica (QA) foi descrita por Ayres em 1923 ao relatar lesões labiais caracterizadas por uma alteração inflamatória crônica, principalmente do lábio inferior provocada pela radiação solar ultravioleta (UV).

Clinicamente, o vermelhão do lábio tem um aspecto multifocal com a presença de manchas ou placas brancas, áreas eritematosas, aumento de volume (infiltração), perda da definição da linha divisória entre a pele e o vermelhão, enrugamento, descamação e sintomatologia de ressecamento e ardor (Main, Pavone, 1994; Cavalcante et al., 2008).

A prevenção é extremamente importante. Todas as pessoas devem ser orientadas quanto ao uso de agentes que protegem a pele dos raios solares UV (Thornhil, 1993), dando preferência à não exposição exagerada e prolongada à luz solar. Em muitos casos, a ocupação profissional do paciente ao ar livre, exige exposição aos raios solares UV. Por esta razão, a conduta profilática, como o uso de chapéu de abas largas e aplicação de cremes com fator de proteção solar labial (FPS), deve ser utilizada para evitar ou minimizar a radiação na face e lábios. Estas são medidas obrigatórias, em especial para indivíduos com fotossensibilidade e pacientes que já tenham tido câncer de lábio. Como a QA é uma lesão difusa, todo o lábio inferior fica susceptível a desenvolver carcinoma (Nicolau, Balus, 1964; Macfarlane, Terezhjalmy, 1982; Terezhjalmy, Naylor, 1993).

No sistema imunológico podem também ocorrer mudanças em suas funções devido à exposição à radiação UVB levando a alterações em nível molecular e a sinalização intra e extra-celular pode

ser modificada, favorecendo o desenvolvimento de respostas imunes mediadas pelas células T (Duthie, 1998). Parece existir alguma relação dessas células com a efetiva imunidade anti-tumoral e o significado clínico-patológico de linfócitos infiltrando tumores (TILs), em diversos carcinomas humanos, tem sido uma questão de grande interesse (Katon, 2007). Watanabe et al. (2010) demonstraram ser fatores prognósticos favoráveis os TILs em lesões de carcinoma bucal.

Os linfócitos T são os grandes maestros da imunidade celular. Eles apresentam-se em dois tipos: T CD4+ e T CD8+. Os T CD4+ são denominados células *helper*, uma vez que auxiliam na função das células T CD8+ e dos linfócitos B, durante a resposta imune. A diminuição de linfócitos T CD4+ acarreta perda da capacidade de coordenação desta resposta. Enquanto que, as células T CD8+ são denominadas células citotóxicas, uma vez que são capazes de reconhecer células-alvo infectadas e destruí-las, controlando, assim, o processo infeccioso (Young et al., 2006)

Estudos sobre a marcação das células T CD4+, T CD8+ e MCs em condições com potencial de transformação maligna, como a QA, podem ajudar a entender a patogênese e provável transformação da QA em neoplasias, como CE de lábio e língua.

O objetivo desse trabalho foi analisar as marcações de T CD4+, T CD8+ e MCs em QA, CE de lábio e CE de língua considerando os diferentes níveis de displasia epitelial da QA, bem como os graus de diferenciação celular do CE de lábio e língua.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

A QA ocorre mais freqüentemente em indivíduos acima dos 45 anos de idade, leucodermas, com predileção pelo sexo masculino e não fumantes (Cavalcante et al., 2008). O lábio inferior é o local mais envolvido (Main; Pavone, 1994; Ibsen; Phelan, 1996) por estar mais exposto à radiação UV devido à protrusão (Scheinberg, 1992). Este fato é relevante ao Brasil, pois sua economia está baseada na agricultura, pecuária e pesca onde os trabalhadores são constantemente expostos aos raios solares UV (Batista et al., 2010)

A pele é um órgão capaz de iniciar a resposta do sistema imune contra antígenos externos e um grande número de células dermais e epidermais participam das reações imunes da pele. Células de Langerhans e queratinócitos são responsáveis por iniciar a atividade imune, enquanto fibroblastos dermais, células dendríticas, mastócitos e células endoteliais mantêm e medeiam a resposta imune. A exposição à radiação UV pode alterar diretamente a função destas células, resultando em supressão da resposta imune (Ch'ng et al., 2006).

Há outros aspectos clínicos para a QA referidos na literatura, tais como quadro agudo com edema e eritema, úlceras com cicatrização lenta (Main, Pavone, 1994; Laskaris, 2004), atrofia e perda de elasticidade (Bentley et al., 2003). É ainda descrita como uma condição difusa e discreta (Robinson, 1989) e úlceras em cicatrização, porém sem seu desaparecimento por completo (Girard et al., 1980).

Microscopicamente, caracteriza-se por hiperkeratose (orto ou para), atrofia ou hiperplasia epitelial e acantose (Stanley, Roenigk, 1988; Main, Pavone, 1994; Kaugars et al., 1999; Cavalcante et al., 2008). Na lâmina própria apresenta elastose e na maioria dos casos inflamação

(Lundeen et al., 1985; Kaugars et al., 1999), sendo que vasos telangiectásicos podem ser observados (Cavalcante et al., 2008). Essa alteração degenerativa (elastose solar ou degeneração basofílica) irreversível, evidencia desintegração das fibras colágenas e formação de massas de material basofílico na lâmina própria (Cavalcante et al., 2008). A produção de material anormal decorrente da elastose solar pode evoluir para a formação da área espessada que se mostra na área da pele logo abaixo do vermelhão (Main, Pavone, 1994).

Essa lesão corresponde a uma condição com potencial de transformação maligna de 10 a 20% dos casos (Kronic et al., 1998; Pontes et al., 2005) sendo que a progressão para o carcinomas epidermóide (CE) de lábio pode ocorrer num período de 1 a 20 anos, caso não seja diagnosticada e tratada adequadamente (Santos et al., 2003). O CE de lábio representa 25 a 30% de todos os cânceres orais (Bork et al., 1993; Regezi; Sciubba, 2000), a maioria surge no vermelhão (Moore et al., 1999) e envolvem com freqüência o lábio inferior (Ibsen; Phelan, 1996; Neville et al., 1998).

No Brasil as estimativas para o ano de 2010 e 2011 indicam a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer, sendo a região sul e sudeste as que apresentam as maiores taxas. Na cavidade oral foram 14.120 novos casos em 2010 (INCA, 2009).

O CE de lábio se apresenta como uma lesão ulcerada ou não, endurecida, com necrose central e, de crescimento lento. Pode ainda se apresentar como placas, firmes, verrucosas, brancas ou avermelhadas (Bork et al., 1993; Bentley et al., 2003). Histologicamente é caracterizado por ilhas e cordões de células epiteliais malignas, que mostram diferenciação em direção a uma morfologia escamosa e invadem os tecidos adjacentes (Neville et al., 1998).

Selecionamos os linfócitos T CD4+, que parece ter papel essencial na resposta imunológica anti-cancer (Chikamatsu et al., 2008; Hung et al., 1998); os linfócitos T CD8+, que são fundamentais para a

imunidade efetiva antitumoral (Zancope et al., 2010; Kondratiev et al., 2004) e os mastócitos (MCs), que revelam uma diversidade de papéis que contribuem para alterações do microambiente do estroma durante a progressão tumoral (Ch'ng et al., 2006; Gomes et al., 2008), para avaliação de suas expressões em CE de lábio, língua, comparado a QA e grupo controle, visando realizar um estudo funcional dessas células em relação à sua localização nessas lesões. A presença dessas células em tumores como carcinomas vem estimulando pesquisas a fim de esclarecer seu papel na progressão e desenvolvimento de neoplasias.

Todas as células T (CD4+ e CD8+) expressam proteínas nas suas superfícies, as quais são denominadas “receptores de célula T” (TCR). Esses receptores reconhecem regiões de refugos protéicos presentes na superfície de outras células. Também foi demonstrado que, embora os queratinócitos sejam as células responsáveis pela resposta imunológica da pele, são as células T que apresentam maior fotossensibilidade à radiação UV (Young, 2006).

Tem sido observado que as células inflamatórias participam da degeneração de tumores. Quatro casos de CE de lábio e 1 caso de hiperqueratose foram corados em HE e método de Van Gieson, que diferencia colágeno de outros tecidos. Os linfócitos, células do plasma e mononucleares foram encontrados circundando o tumor, com predominância de linfócitos em 4 dos 5 casos. A ocorrência de degeneração no tecido tumoral foi paralela à presença de reação inflamatória. Os resultados mostraram que no processo inflamatório do CE de lábio, interpretado como expressão celular de uma reação imunológica contra as células tumorais, houve predominância de células linfóides, principalmente linfócitos. As observações morfológicas são consistentes com a hipótese atual que defende o papel dos linfócitos no desenvolvimento de cânceres, mas ainda há pouco estudo a respeito da resposta imune nos tumores de pele e melanomas (Boncinelli et al., 1978).



A intensidade do infiltrado imunocompetente: MCs, subpopulações de linfócitos B ou T e fagócitos mononucleares foi analisada, considerando a origem do hospedeiro e do tumor, com atenção especial às implicações prognósticas no CE labial. As metástases pareceram ocorrer em menor frequência nos CE labiais com infiltrado intenso no estroma em comparação aos infiltrados moderados e fracos. Reações imunes contra câncer constituem interação íntima entre os mecanismos humorais e celulares e técnicas mais sofisticadas são necessárias para analisar essa dinâmica (Karja et al., 1987).

Duthie et al. (1999) realizaram uma revisão da modulação induzida pela radiação UV, no sistema imunológico humano, na apresentação de antígenos pelas células de Langerhans e macrófagos, atividades das células T, matadoras naturais (NK) e na regulação das citocinas. As respostas das células T CD4+ e T CD8+ foram inibidas pelas células de Langerhans tratadas com UVB. Verificaram também um aumento no índice de T CD4+/T CD8+ com o aumento da exposição à radiação UV.

Dorrego et al. (2002) desenvolveram um estudo visando analisar a imunoexpressão de algumas moléculas de adesão e marcadores de linfócitos. Biópsias de 18 casos de líquen plano oral e 10 de mucosa oral normal foram tratados imunohistoquimicamente para T CD4+, T CD8+, CD1a, LFA-1, VCAM-1 e ICAM-1. Os resultados mostraram um número aumentado de T CD4+, T CD8+, CD1a+ nos casos de líquen plano oral. Algumas amostras demonstraram células T CD4+ e T CD8+ e também LFA-1. A expressão de ICAM-1 e VCAM-1 foram significativamente altas nos casos de líquen plano oral. A reação imunológica se inicia com a ativação das células de Langerhans que apresentam antígeno para os linfócitos T CD4+. Essas células através de ICAM-1 e LFA-1 promovem destruição epitelial. Mais tarde a produção de citocinas e a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 podem ativar linfócitos T CD8+ conduzindo a forma crônica da doença.



As células T CD8+ são as principais células na imunidade antitumoral devido a sua habilidade em lisar as células tumorais diretamente; enquanto as T CD4+ exercem um papel de suporte à ativação destas células (Behrens et al., 2004). Existem evidências de que as células T CD4+ atuam na imunidade antitumoral de maneira independente das T CD8+. O mecanismo pelo qual as T CD4+ podem eliminar as células tumorais está longe de ser totalmente elucidado, porém há relato de que as citocinas suprimem a angiogênese e atuam como fatores quimiotáticos para células tumorocidas, como as matadoras naturais, macrófagos e granulócitos (Mattes et al., 2003).

Foi avaliado o estado imunológico do estágio III e IV de CE da cabeça e pescoço. Dentre outros achados desse estudo, foi evidenciado que as células T CD4+ e T CD8+ estavam muito diminuídas. Porém a proporção das células T CD4+, CD25+, Foxp3+ células T reguladoras, que tem a função supressora, estava aumentada. Estudos do grau de disfunção imune podem ajudar a projetar protocolos imunoterapêuticos através da incorporação de agentes imunomoduladores contra a função dessas células (Bose et al., 2008).

Estabeleceu-se uma linhagem celular de carcinoma epidermóide (CE) da hipofaringe com culturas de células tumorais linfocíticas mistas usando células tratadas com mitomicina C e linfócitos autólogos do sangue periférico. A amostra foi de 42 pacientes de 80 anos de idade com CE de hipófise e então foi analisada a resposta dos linfócitos T CD4+. Os resultados sugeriram que as células imunes específicas para tumores autólogos bem como os epítomos derivados do wt p53 estão presentes na circulação periférica da paciente. Observou-se que o linfócito T CD4+ apresentou resposta anti-tumoral predominante. Mas há necessidade do desenvolvimento de novas estratégias para superar impedimentos funcionais induzidos *in vivo* em células imunes. É necessário descobrir a resposta das células T CD8+ citotóxicas bem

como as respostas das células T CD4+ helper, tendo como alvo os tumores autólogos (Chikamatsu et al., 2008).

A diferenciação do câncer de lábio foi analisada a partir da intensidade do infiltrado inflamatório incluindo os mastócitos (MC) e as subpopulações, linfócitos B ou T e fagócitos mononucleares. A quantidade de expressão destas células demonstrou estar aparentemente relacionada diretamente com os 5 anos de sobrevida assim como a intensidade do infiltrado imunocompetente do estroma. As metástases foram as determinantes mais fortes do prognóstico, influenciado tanto pela intensidade do infiltrado imunocompetente do estroma como pela diferenciação do tumor. A análise das relações entre tumores usando a variedade de técnicas morfológicas e de imunohistoquímica pode ser de grande valia para prever o curso clínico do carcinoma de lábio (Syrgänen, 1986).

Os MCs exercem um papel fundamental na defesa do hospedeiro por causa de sua habilidade em armazenar mediadores químicos pré formados que contribuem para modular a resposta imune, a angiogênese e degradar a matriz extracelular (Mattes et al., 2003; Grimbaldston et al., 2006; Costa et al., 2009), especialmente na derme humana exposta cronicamente aos raios solares (Grimbaldston et al., 2006).

Os raios UV induzem os MC a sintetizar e liberar diversos mediadores tais como: histamina, interleucinas (IL 3, 6, 8 e 10), metaloproteinases e triptase (Grimbaldston et al., 2006). A relevância dos MC como reservatório de IL 10 ainda não está claro, evidências sugerem que essas células podem ter funções imunorregulatórias. Os MC e o seu produto, a IL 10, podem exercer funções imunossupresivas ou anti-inflamatórias, limitando os danos à pele devido a exposição crônica a radiação UVB em camundongos (Grimbaldston et al., 2007).

Rojas et al. (2009) reportaram que o aumento na expressão gênica e protéica da triptase de MC podem contribuir para a

progressão da QA em CE de lábio em pacientes expostos cronicamente ao sol.

Existem muitas controvérsias no papel das células inflamatórias na imunidade tumoral. Embora alguns estudos sugiram que o CE de lábio deva ser considerado um câncer distinto do CE intrabucal devido a diferenças no curso clínico e nos aspectos histopatológicos e, conseqüentemente no prognóstico (Batista et al., 2010; Zancope et al., 2010). Há poucos estudos na literatura que investigam a progressão da QA em CE de lábio e poucos relatos que comparam as características histopatológicas e immunoistoquímicas da QA (lesão pré-maligna), CE de lábio e o CE intrabucal.

### 3 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo foram:

- a) Analisar a marcação de MCs, T CD4+ e T CD8+ na QA, CE de lábio e CE de língua.
- b) Analisar a gradação histológica da displasia epitelial da QA (OMS-2005) e a classificação histopatológica dos CE de lábio e Língua (Barnes et al., 2005)
- c) Comparar os dados encontrados entre os grupos estudados.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos - UNESP sob o protocolo nº 003/2010-PH/CEP. Os sujeitos da pesquisa foram apresentados ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo A) e somente após a total compreensão dos objetivos e métodos aplicados, os mesmos poderão integrar a amostra do presente projeto. Todos os procedimentos estão adequados a Resolução 196/96 do Ministério da Saúde de forma que nenhum dos procedimentos acarretará danos físicos, psíquicos ou mentais aos participantes.

### **4.1 Amostra**

Este estudo constou de 30 casos de QA em lábio inferior (grupo 1), 30 de CE primário em lábio inferior (grupo 2) e 30 de CE primário em língua (grupo 3) com diagnóstico clínico e histopatológico do Ambulatório da Disciplina de Propedêutica Estomatológica, da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. O grupo controle correspondeu a 10 casos sem alteração clínica ou histopatológica no tecido epitelial e sem presença de inflamação, este material foi proveniente de biópsias realizadas para confirmação do diagnóstico de mucocele. Os dados relativos à idade, gênero, uso de drogas, presença de co-morbidades e ocupação profissional foram coletados durante a anamnese, em ficha própria (Anexo B).

## **4.2 Avaliação clínica**

Os pacientes que participaram desta pesquisa foram avaliados clinicamente e foi realizado o preenchimento de uma ficha clínica individual, para obtenção de informações a respeito do estado de saúde geral e bucal dos pacientes, além da descrição detalhada da(s) lesão(ões).

Os pacientes receberam diagnóstico clínico de QA e CE foram informados a respeito da doença e antes de procedermos a biópsia incisional para confirmação do diagnóstico, os pacientes foram esclarecidos a respeito da pesquisa e caso concordem em participar da mesma assinarão o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

Este projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista.

Os pacientes que já foram submetidos à biópsia em que o material encontra-se no arquivo da Disciplina de Patologia, retornaram periodicamente para proervação. Mesmo os casos de CE, em que os pacientes são tratados em outras instituições.

## **4.3 Procedimentos cirúrgicos**

Após o completo exame clínico e preenchimento da ficha, os pacientes com diagnóstico clínico de QA e CE (Anexo 2) foram submetidos a biópsia incisional para confirmação do diagnóstico.

Como a QA é uma lesão multifocal, a semimucosa labial pode ter pontos atróficos e/ou eritematosos, manchas ou placas brancas,

palidez, ressecamento (com aspecto sulcado ou descamação), infiltração e/ou úlcera. A biópsia realizada envolverá a área de maior expressividade clínica da lesão segundo a seguinte prioridade:

- a) área ulcerada;
- b) área eritematosa;
- c) mancha ou placa branca.

Os espécimes de biópsias foram enviados para o Laboratório da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP para análise anátomo-patológica em microscópio de luz após coloração com Hematoxilina-Eosina e diagnóstico final.

#### **4.4 Procedimentos laboratoriais e análise histomorfométrica**

Os espécimes de novas biópsias foram fixados em formol a 10% e enviados para o Laboratório da Disciplina de Patologia (LDP), da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP para serem incluídas em blocos de parafina e posterior procedimento histotécnico. Para coloração e análise imunoistoquímica foram realizados cortes semi-seriados de 3 µm.

As lâminas de QA coradas em hematoxilina-eosina (HE), que encontram-se no LDP terão o grau histopatológico de displasia analisado seguindo o sistema binário de gradação da displasia dividido em categorias (Kujan et al., 2006) (Anexo B). A leitura microscópica foi realizada pelos alunos de pós-graduação e graduação, **bem treinados** e sob a orientação de professores **qualificados**. A avaliação por escore baseou-se em critérios de arquitetura e citologia descritos na classificação

da Organização Mundial de Saúde de 2005, sendo os critérios de arquitetura:

Quadro 1 – Classificação da Displasia Epitelial (OMS -2006)

Descrição citológica	Descrição arquitetura
Estratificação Epitelial irregular	Variação anormal de tamanho do núcleo
Perda de polaridade das células basais	Variação anormal da forma nuclear
Projeções epiteliais em forma de gota	Variação anormal do tamanho celular
Número aumentado de figuras mitóticas	Variação anormal da forma celular
Mitoses superficiais em localização anormal	Aumento na proporção núcleo / citoplasma
Queratinização prematura em células isoladas	Aumento do tamanho nuclear
Pérolas córneas dentro das projeções epiteliais	Figuras mitóticas atípicas
	Aumento do número e tamanho dos nucléolos
	Hipercromatismo

A graduação histopatológica do CE utilizada neste estudo foi a mesma adotada nos laudos anátomo-patológicos. As lesões foram graduadas em uma escala que varia de I a III .

- Grau I, grau baixo ou bem diferenciado: Neoplasia madura que se assemelha ao tecido de origem com crescimento lento e metastatizará mais tardiamente;
- Grau II, grau moderado: Neoplasia intermediária entre o grau I e III;
- Grau III, grau baixo ou pobremente diferenciado: Neoplasia imatura com muito pleomorfismo celular e nuclear, pouca ou nenhuma produção de queratina.

Após a revisão histopatológica das lâminas, foram realizados cortes histológicos de 3 µm que foram montados em lâminas



de vidro tratadas com organossilano a fim de se evitar o descolamento durante a imunocoloração. A desparafinização foi realizada com xilol por 5 min. e reidratação em álcool etílico em concentrações decrescentes. Em seguida, os cortes foram lavados em álcool a 95% e hidróxido de amônia a 10% por 5 min. De acordo com o anticorpo de interesse, as lâminas foram submetidas a métodos de recuperação antigênica que diferirão tanto nos procedimentos (banho termostático, panela de pressão ou forno microondas) como nas soluções tampão utilizado (Tris-EDTA pH 9.0; EDTA pH 8.0 ou citrato pH 6.0) (Tabela 1). Posteriormente, bloqueia-se a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 1% (VWR International, Lutterworth, UK) em água deionizada por 20 mn. Os cortes foram incubados com os anticorpos primários (Tabela 1) por 1 h em temperatura ambiente. Incubação por 30 min com cada reagente do kit LSAB (DakoCytomation) e em seguida, com o cromógeno diaminobenzidina Impact DAB TM (Vector, Peterborough, UK) por aproximadamente 10 min. Contra cora-se com Hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich, Gillingham, UK). Finalmente, desidrata-se em série de alcóois etílicos, passagem em xilol e montagem das lâminas com Vectamount H-5000 (Vector, Peterborough, UK). Os controles positivos e negativos (ausência do anticorpo primário) foram realizados nas reações imunoistoquímicas (Quadro 2).

Quadro 2 – Resumo dos anticorpos primários a serem utilizados

Anticorpos	Clone	Recuperação antigênica	Diluição	Controle positivo	Fabricante
anti-CD4	4B12	EDTA	1:80	Tonsila	Dako
anti-CD8	C8/144 B	Citrato	1:100	Tonsila	Dako
Triptase	AA1	-----	1:2000	-----	Dako

A Reação Imunoistoquímica foi realizada em todos os casos corados com anticorpos anti-CD4, anti-CD8 e Triptase, obedecendo aos seguintes critérios:

- a) Espécimes de QA e Controle: Todos os espécimes de QA e do grupo controle foram analisados histomorfologicamente em objetivas de 10x e 20x. Após a escolha do corte foi realizada a contagem em três campos, na região do tecido conjuntivo logo abaixo do epitélio, com objetiva de 40x.
- b) Espécimes de CE: Todos os espécimes de CE foram analisados histomorfologicamente em microscópio ótico com objetivas de 10x e 20x para a escolha do melhor corte a ser analisado. Após a escolha do corte realizou-se a contagem em três campos intraepiteliais e três campos no estroma, com objetiva de 40x, na área de tecido conjuntivo adjacente a zona de invasão tumoral (*front* de invasão).

A análise histomorfométrica foi realizada em todos os casos corados pela técnica imunoistoquímica com os anticorpos seguindo a coloração expressa pelo marcador castanho, em maior ou menor intensidade, obedecendo aos seguintes critérios: as imagens obtidas a partir de um microscópio de luz no aumento final de 400x, sob um foco fixo com clareza de campo. Em seguida as imagens foram capturadas através da câmera fotográfica digital AxioCam modelo MRc-5 acoplada ao fotomicroscópio AxioShop 40 (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) e avaliadas em monitor Siemens Fujitsu. A contagem manual das células marcadas foi feita pelo programa Imagem J. Após sua individualização pelo *software* Axiovision 4.7. Os resultados foram expressos em Cels/mm<sup>2</sup>.

#### 4.5 Análise estatística

Os dados coletados foram submetidos à análise estatística por meio do programa GraphPad Prism. Os testes utilizados foram de Kruskal Wallis e Mann Whitney, com 5% de significância.

Os riscos relativos e obtenção dos possíveis fatores prognósticos independentes serão estimados e espera-se:

1- Que o aumento da expressão de T CD4+ e T CD8+ seja menor nos casos de QA com atipia grave e nos casos de CE indiferenciado e de pior prognóstico.

2- Que as marcações imunoistoquímicas estudados possam favorecer indicadores de prognóstico, não apenas por este método, mas que contribua para a leitura histomorfológica do material corado com hematoxilina-eosina e avaliado através do sistema binário.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Perfil das amostras

Neste estudo avaliou-se 30 casos de QA em lábio inferior (grupo 1), 30 casos de CE primário em lábio inferior (grupo 2), 30 casos de CE primário de língua (grupo 3) e 10 casos de mucocele (grupo controle).

Dos 30 casos de QA avaliados, através da gradação de displasia, 10 foram classificados como displasia leve, 13 como displasia moderada e 7 como displasia grave. (Tabela 1, 2 e 3)

Tabela 1 – Classificação das lesões de QA quanto aos graus de displasia epitelial

Classificação	Contagem	Porcentagem (%)
Leve	10	33,3
Moderada	13	43,3
Grave	7	23,3
Total	30	100

A amostra de CE de lábio inferior, pela classificação recomendada pela OMS, foi dividida em CE bem diferenciado, CE moderadamente diferenciado e CE pobremente diferenciado. (Tabela 2)

Tabela 2 – Classificação das lesões de CE de lábio inferior quanto aos graus de diferenciação celular

Classificação	Contagem	Porcentagem (%)
Bem diferenciado	14	46,6
Moderadamente diferenciado	9	30
Pobremente diferenciado	7	23,3
Total	30	100

O CE de língua, pela mesma classificação, foi dividido em CE bem diferenciado, CE moderadamente diferenciado e CE pobremente diferenciado. (Tabela 3)

Tabela 3 – Classificação das lesões de CE de língua quanto aos graus de diferenciação celular

Classificação	Contagem	Porcentagem (%)
Bem diferenciado	15	50
Moderadamente diferenciado	8	26,6
Pobremente diferenciado	7	23,3
Total	30	100

Os 10 casos do grupo controle foram de amostras que não apresentam alteração histopatológica de potencial de malignidade ou malignidade e clínica e sem inflamação tecidual.

## **5.2 Marcação de linfócitos e mastócitos**

### **5.2.1 Marcação de linfócitos T CD4+**

A marcação dos linfócitos T CD4+ corados através da técnica de imunohistoquímica pelo anticorpo monoclonal anti-CD4 foi avaliada em ambos os grupos, de QA, de CE (lábio inferior e língua) e de controle. A contagem foi realizada em duas faixas: subepitelial e profunda para QA e Controle e intraepitelial e estroma para CE de lábio inferior e CE de língua. Esses grupos foram comparados entre si.

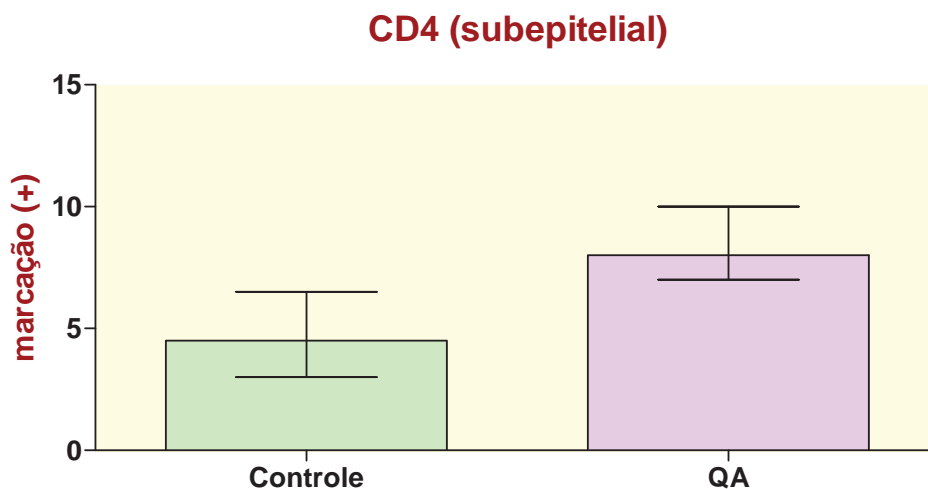


Figura 1 - Distribuição dos valores da marcação de T CD4+ corados nos 2 grupos na faixa subepitelial

Tabela 4 – Resultados da comparação QA vs. Controle subepitelial.

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
QA	30	9,2	4,642	8
C	10	5,2	3,259	4,5

Teste de Mann Whitney(5%), $p=0,033<0,05$ .QA=Queilite actínica; C=Controle.Estatisticamente significativa.

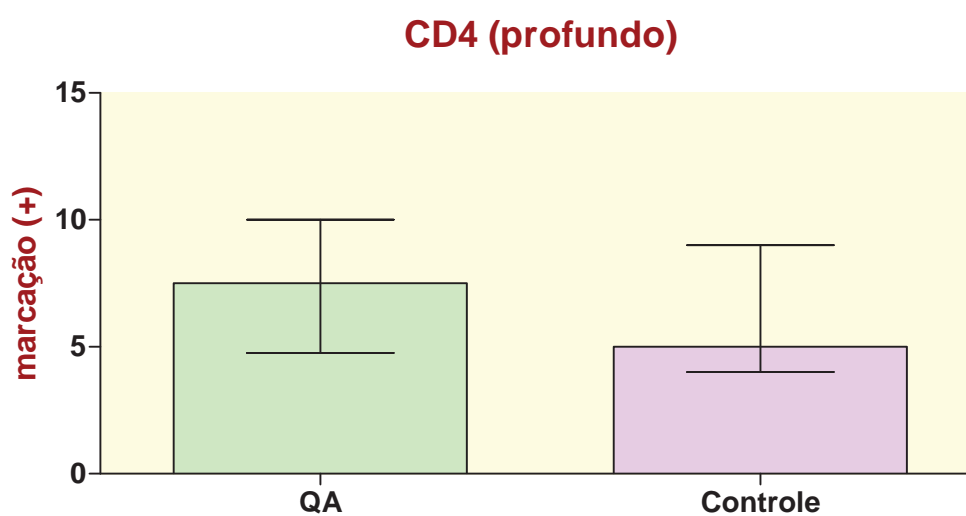


Figura 2 – Distribuição dos valores da marcação de T CD4+ corados nos 2 grupos na faixa profunda.

Tabela 5 – Resultados da comparação QA vs. Controle profundo.

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
QA	30	7,7	3,734	7,5
Controle	10	6,5	2,991	6,5

Teste de MannWhitney(5%), $p=0.3545>0,05$ .QA=Queilite actínica;C=Controle.Estatisticamente não significativa.

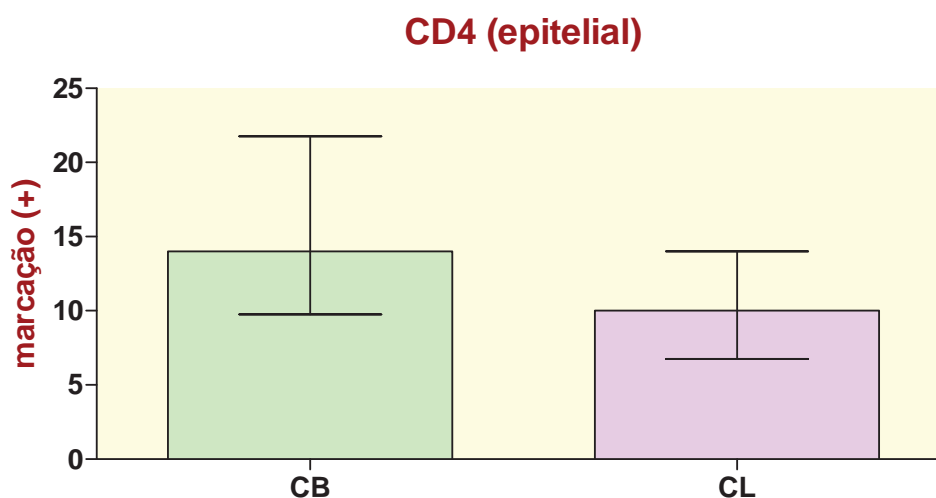


Figura 3 – Distribuição dos valores da marcação de T CD4+ corados nos 2 grupos na faixa epitelial

Tabela 6 – Resultados da comparação de CB e CL epitelial

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
CE de lábio	30	11,40	7,064	10
CE de língua	30	18,33	17,36	14

Teste de Mann Whitney (5%),  $p = 0,0367 < 0,05$ . CE = Carcinoma epidermóide. Estatisticamente significativa

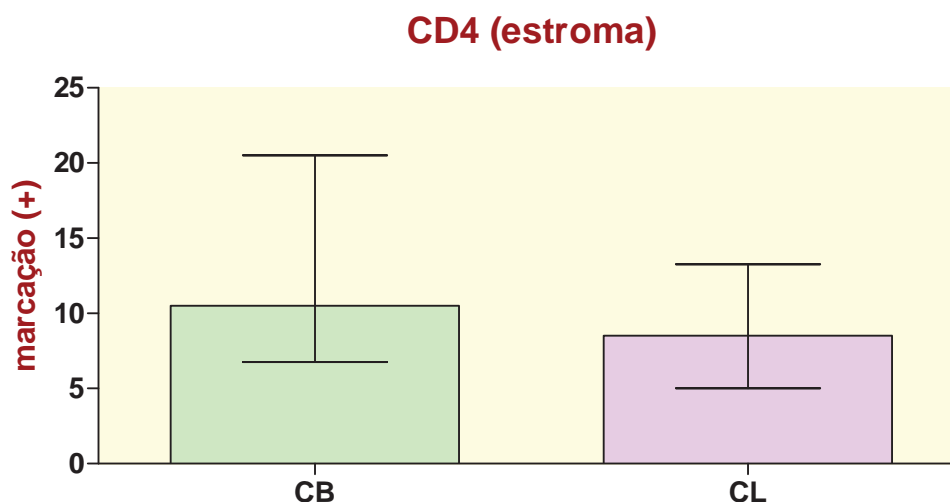


Figura 4 – Distribuição dos valores da marcação de T CD4+ corados nos 2 grupos na faixa estroma.

Tabela 7 – Resultados da comparação de CB e CL no estroma.

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
CE de lábio	30	9,7	5,59	8,5
CE de língua	30	15,8	15,11	10,5

Teste de Mann Whitney (5%),  $p=0,0875>0,05$ . CE = Carcinoma epidermóide. Estatisticamente não significativo.

### 5.2.2 Marcação de linfócitos T CD8+

A marcação dos linfócitos T CD8+ corados através da técnica imunohistoquímica pelo anticorpo monoclonal anti-CD8 foi avaliada em ambos os grupos, de QA, de CE (lábio inferior e língua) e de controle. A contagem foi realizada em duas faixas: subepitelial e profunda para QA e Controle e epitelial e estroma para CE de lábio inferior e de língua. Esses grupos comparados foram comparados entre si.



### CD8 (subepitelial)

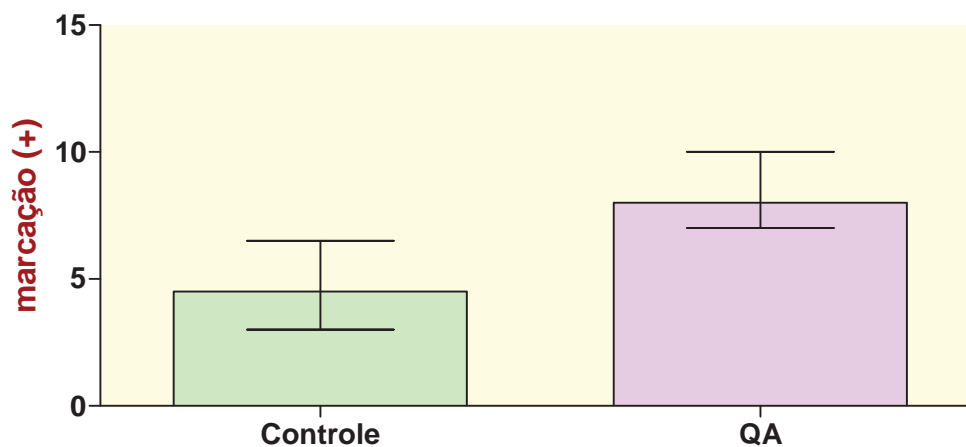


Figura 5 – Distribuição dos valores das marcações de T CD8+ corados nos 2 grupos na faixa subepitelial.

Tabela 8 – Resultados da comparação QA vs. Controle subepitelial

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
QA	30	8	4,642	8
C	10	4,5	3,259	4,5

Teste de Mann Whitney (5%),  $p=0,0033 < 0,05$ . QA=Queilite actínica; C=Controle. Estatisticamente significativo

### CD8 (profundo)

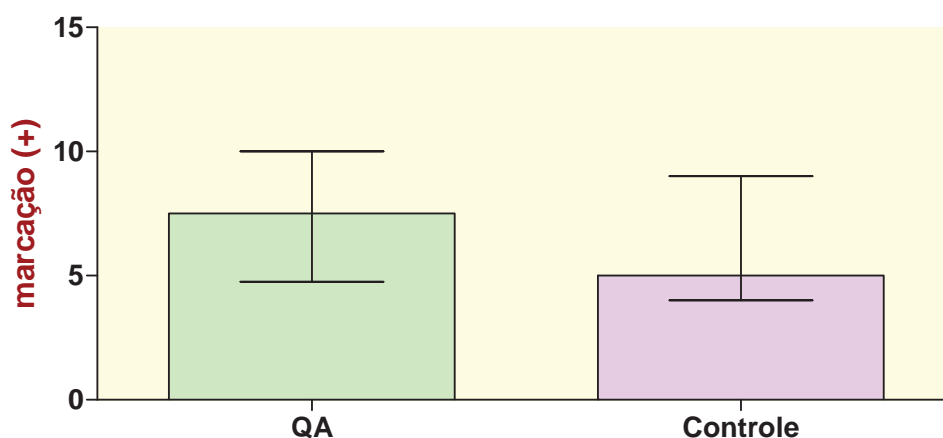


Figura 6 – Distribuição dos valores da marcação de T CD8+ corados nos 2 grupos na faixa profunda

Tabela 9 – Resultados da comparação QA vs. Controle profundo.

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
QA	30	7,7	3,734	7,5
Controle	10	6,5	2,991	5

Teste de Mann Whitney (5%),  $p = 0,3545 > 0,05$ . QA= Queilite actínica; C = Controle. Estatisticamente não significante.

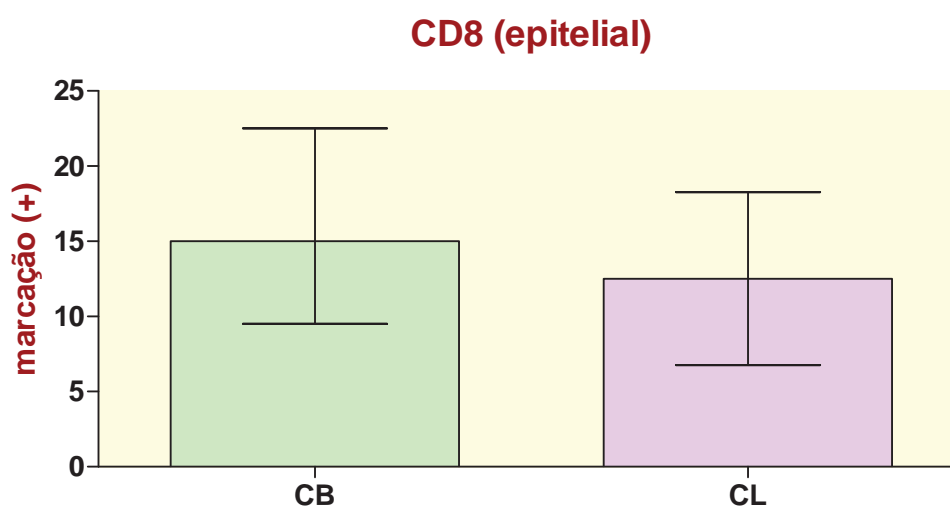


Figura 7 – Distribuição dos valores da marcação de T CD8+ corados nos 2 grupos na faixa epitelial.

Tabela 10 – Resultados da comparação CE de lábio vs. CE de língua epitelial

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
CE de lábio	3	21,20	35,51	12,5
CE de língua	30	17,67	17,17	15

Teste de Mann Whitney (5%),  $p = 0,5489 > 0,05$ . CE = Carcinoma epidermóide. Estatisticamente não significante.

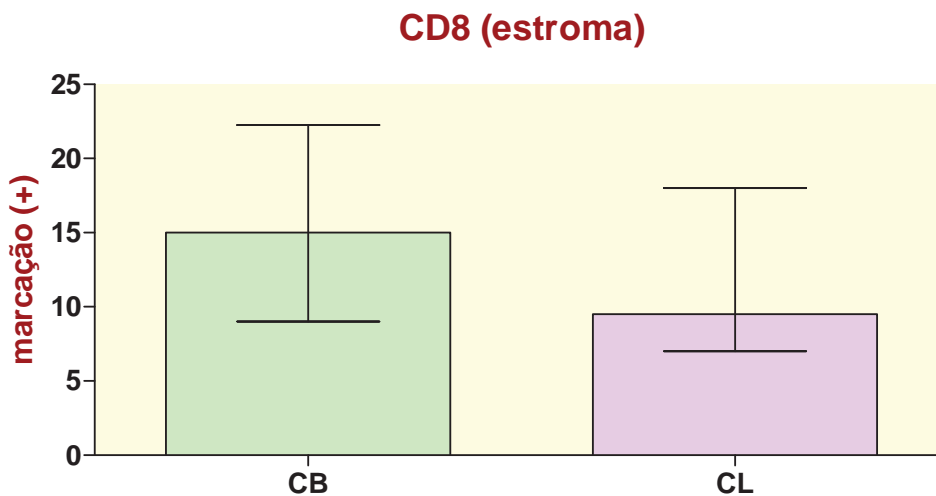


Figura 8 – Distribuição dos valores da marcação de T CD8+ corados nos 2 grupos na faixa estroma.

Tabela 11 – Resultados da comparação CE de lábio vs. CE de língua estroma

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
CE de lábio	30	17,17	22,91	9,5
CE de língua	30	17,63	12,5	15

Teste de Mann Whitney (5%),  $p=0,1218 > 0,05$ . CE = Carcinoma epidermóide. Estatisticamente não significativo.

### 5.2.3 Marcação de MCs

A marcação dos MCs através da técnica imunohistoquímica pelo anticorpo monoclonal Triptase foi avaliada em ambos os grupos de QA, CE (lábio inferior e língua) e controle. A contagem foi realizada em duas faixas: subepitelial e profunda para QA e Controle e epitelial e estroma para CE de lábio inferior e de língua. Esses grupos foram comparados entre si.

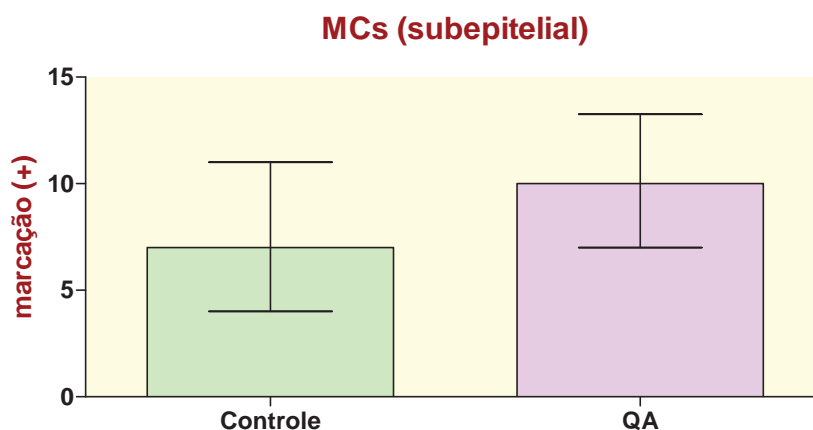


Figura 9 – Distribuição dos valores da marcação de MCs corados nos 2 grupos na faixa subepitelial.

Tabela 12 – Resultados da comparação QA vs. Controle subepitelial

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
QA	30	10,37	4,67	10
C	10	7,8	4,07	7

Teste de Mann Whitney (5%),  $p = 0,1367 > 0,05$ . QA= Queilite actínica; C = Controle. Estatisticamente não significativa.

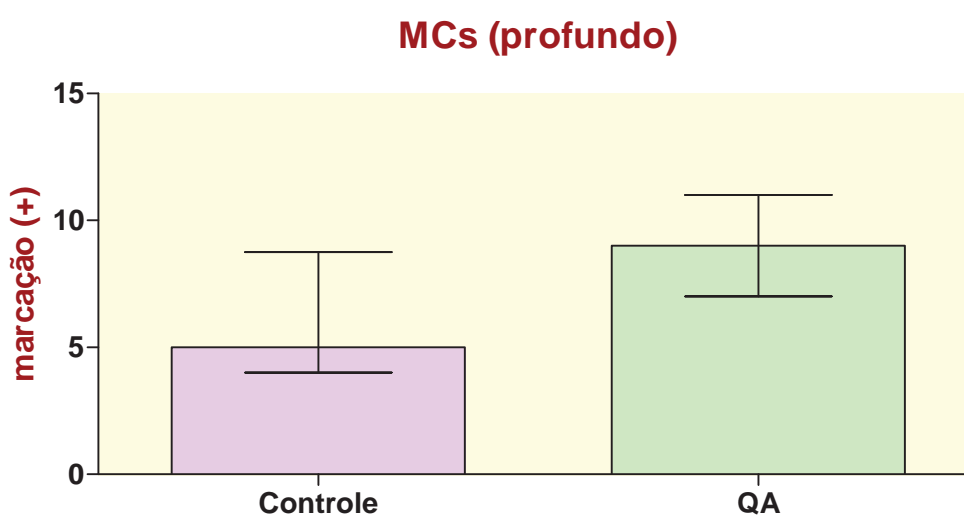


Figura 10 – Distribuição dos valores da marcação de MCs corados nos 2 grupos na faixa profunda

Tabela 13 – Resultados da comparação QA vs. Controle profundo.

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
QA	30	9,9	5,55	9
Controle	10	6,6	4,06	5

Teste de Mann Whitney (5%),  $p = 0,029 < 0,05$ . QA= Queilite actínica; C = Controle. Estatisticamente significante

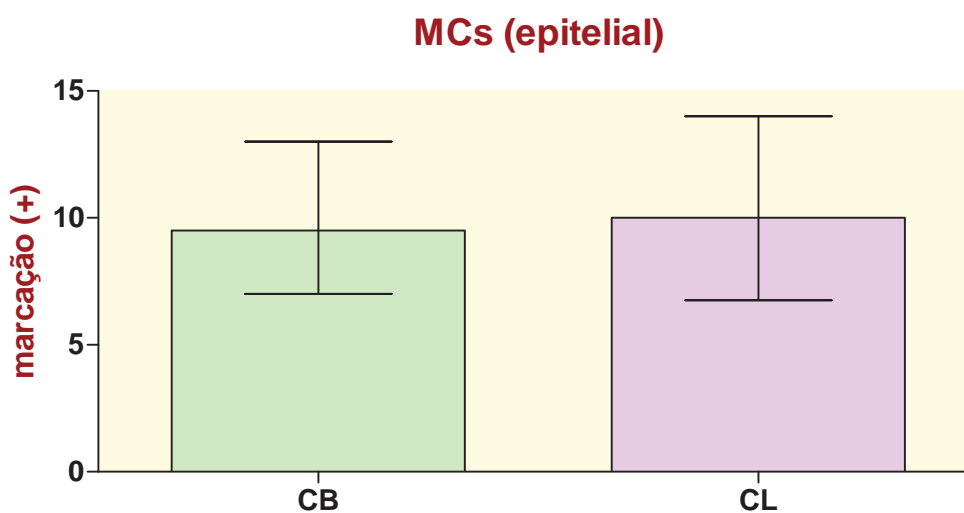


Figura 11 – Distribuição dos valores da marcação de MCs corados nos 2 grupos na faixa epitelial

Tabela 14 – Resultados da comparação de CE de lábio e CD de língua epitelial

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
CE de lábio	30	11,4	7,06	10
CE de língua	30	10,43	5,26	9,5

Teste de Mann Whitney (5%),  $p = 0,8646 > 0,05$ . CE = Carcinoma epidermóide. Estatisticamente não significante.

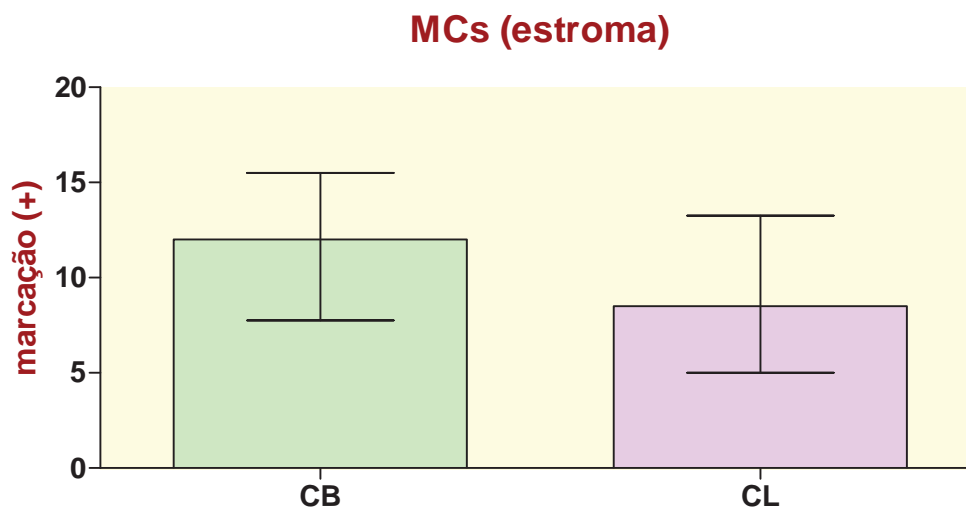


Figura 12 – Distribuição dos valores da marcação de MCs corados nos 2 grupos na faixa estroma.

Tabela 15 – Resultados da comparação de CE de lábio e CD de língua estroma

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	Mediana
CE de lábio	30	9,7	5,59	8,5
CE de língua	30	12,17	5,937	12

Teste de Mann Whitney (5%),  $p = 0,0715 > 0,05$ . CE = Carcinoma epidermóide. Estatisticamente não significante.

### 5.3 Marcação de T CD4+ T CD8+ e MCs vs. displasia epitelial

Analisamos nas lesões de QA a marcação de T CD4+, T CD8+ e MCs em relação aos níveis de displasia. (Tabela 16, 17 e 18)

Tabela 16 – Marcação de T CD4+ corado pelo anti-CD4, em relação à displasia epitelial nas lesões do grupo QA.

Variável	Displasia QA	N	média	DP	CV(%)
T CD4+	Grave	7	4,4	2,14	48,63
	Moderada	12	7,5	3,35	44,66
	Leve	11	6,9	4,7	68,11

Teste de Kruskal-Wallis (5%). QA=Queilite actínica. DP=desvio padrão.CV=coeficiente de variância.

Tabela 17 – Marcação de T CD8+ corado pelo anti-CD8, em relação à displasia epitelial nas lesões do grupo QA.

Variável	Displasia QA	N	média	DP	CV(%)
T CD8+	Grave	7	8,14	2,79	34,27
	Moderada	12	11	5,85	53,18
	Leve	11	7,36	2,15	29,21

Teste de Kruskal-Wallis (5%). QA=Queilite actínica. DP=desvio padrão.CV=coeficiente de variância.

Tabela 18 – Marcação de MCs, corados pela triptase, em relação à displasia epitelial nas lesões do grupo QA.

Variável	Displasia QA	N	média	DP	CV(%)
MC	Grave	7	11,29	5,187	45,88
	Moderada	12	9,86	5,181	52,53
	Leve	11	9,455	5,35	56,61

Teste de Kruskal-Wallis (5%). QA=Queilite actínica. DP=desvio padrão.CV=coeficiente de variância.

#### 5.4 Marcação de T CD4+, T CD8+ e MCs vs. diferenciação do CE

Analisamos nas lesões de CE de lábio e língua a marcação de T CD4+, T CD8+ e MCs em relação ao nível de diferenciação dessas lesões. (4,5,e 6)

Tabela 19 – Marcação de T CD4+ corado pelo anti-CD4, em relação ao nível de diferenciação nas lesões do grupo CE de lábio e de língua.

Variável	Tipo de CE	Grau de diferenciação	N	Média	DP	CV(%)
T CD4+	Lábio	Bem	13	12,8	7,7	59,87
		Mod	10	11	7,4	66,6
		Pobre	7	8	5,4	67,5
	Língua	Bem	13	23	22,5	97,8
		Mod	10	15,5	7,7	49,6
		Pobre	7	14	11	78,5

Teste de Kruskal-wallis (5%),  $p = 0,05$ . DP = desvio padrão. CV = coeficiente de variação. N = número da amostra.

Tabela 20 – Marcação de T CD8+ corado pelo anti-CD8, em relação ao nível de diferenciação nas lesões do grupo CE de lábio e de língua.

Variável	Tipo de CE	Grau de diferenciação	N	Média	DP	CV(%)
T CD8+	Lábio	Bem	13	24,5	50	204
		Mod	10	19	10,9	57
		Pobre	7	17	21	123
	Língua	Bem	13	16	11	68,7
		Mod	10	24	26,8	111
		Pobre	7	13,5	8,69	64,37

Teste de Kruskal-wallis (5%),  $p = 0,05$ . DP = desvio padrão. CV = coeficiente de variação. N = número da amostra.



Tabela 21 – Marcação de MCs corado pela triptase, em relação ao nível de diferenciação nas lesões do grupo CE de lábio e de língua.

Variável	Tipo de CE	Grau de diferenciação	N	Média	DP	CV(%)
MC	Lábio	Bem	13	12,8	7,7	60
		Mod	10	11	7	63,6
		Pobre	7	8,8	4,9	55,6
	Língua	Bem	13	12	6	50
		Mod	10	11	9	81,8
		Pobre	7	11	6,8	61,8

Teste de Kruskal-wallis (5%),  $p = 0,05$ . DP = desvio padrão. CV = coeficiente de variação. N = número da amostra.

5.3.4 Marcação de T CD4+, T CD8+ e MCs subepitelial da QA quanto aos graus de displasia da mesma vs a marcação de T CD4+, T CD8+ e MCs intraepitelial do CB e CL quanto aos graus de diferenciação celular. (Tabela 7,8,9,10,11 e 12))

Tabela 22 – Comparação das variáveis da marcação T CD4+ subepitelial da QA com displasia leve vs marcação T CD4+, T CD8+ e MCs intraepitelial, do CL e do CB bem diferenciados.

	T CD4+	T CD8+	MCs
QA leve x CL Bem	N	N	N
QA leve x CB Bem	S	N	N
CL bem x CB Bem	N	N	N

Teste de comparação múltipla de Dunn (5%). N = estatisticamente não significante e S = estatisticamente significante.

Tabela 23 – Comparação das variáveis da marcação T CD4+ subepitelial da QA com displasia moderada vs marcação T CD4+, T CD8+ e MCs intraepitelial, do CL e do CB moderadamente diferenciado.

	T CD4+	T CD8+	MCs
QA Mod x CL Mod	N	S	N
QA Mod x CB Mod	S	N	N
CL Mod x CB Mod	N	N	N

Teste de comparação múltipla de Dunn (5%). N = estatisticamente não significante e S = estatisticamente significante

Tabela 24 – Comparação das variáveis da marcação T CD4+ subepitelial da QA com displasia moderada vs. marcação T CD4+, T CD8+ e MCs intraepitelial, do CL e do CB pobremente diferenciado.

	T CD4+	T CD8+	MCs
QA Int x CL P	N	N	N
QA Int x CB P	N	N	N
CL P x CB P	N	N	N

Teste de comparação múltipla de Dunn (5%). N = estatisticamente não significante e S = estatisticamente significante

Tabela 25 – Comparação das variáveis da marcação T CD4+ subepitelial da QA com displasia leve vs marcação T CD4+, T CD8+ e MCs estroma, do CL e do CB bem diferenciados.

	T CD4+	T CD8+	MCs
QA leve x CL Bem	N	N	N
QA leve x CB Bem	N	N	N
CL bem x CB Bem	N	N	N

Teste de comparação múltipla de Dunn (5%). N = estatisticamente não significante e S = estatisticamente significante.

Tabela 26 – Comparação das variáveis da marcação T CD4+ subepitelial da QA com displasia moderada vs marcação T CD4+, T CD8+ e MCs estroma, do CL e do CB moderadamente diferenciado.

	T CD4+	T CD8+	MCs
QA Mod x CL Mod	N	N	N
QA Mod x CB Mod	N	N	N
CL Mod x CB Mod	N	N	N

Teste de comparação múltipla de Dunn (5%). N = estatisticamente não significante e S = estatisticamente significante

Tabela 27 – Comparação das variáveis da marcação T CD4+ subepitelial da QA com displasia intensa vs marcação T CD4+, T CD8+ e MCs estroma do CL e do CB pobremente diferenciado.

	T CD4+	T CD8+	MCs
QA Int x CL P	N	N	N
QA Int x CB P	N	N	N
CL P x CB P	N	N	N

Teste de comparação múltipla de Dunn (5%). N = estatisticamente não significante e S = estatisticamente

**5.5 Marcação de T CD4+, T CD8+ e MCs subepitelial da QA de baixo e alto risco (Sistema Binário) vs a marcação de T CD4+, T CD8+ e MCs intraepitelial e estroma do CB e CL quanto aos graus de diferenciação celular.**

Tabela 28 – Comparação das variáveis de acordo com o sistema binário.

	T CD4+	T CD8+	MCs
QA baixo x QA sub	S	S	S
QA alto x QA sub	N	N	N
QA baixo x CL epit	S	S	S
QA baixo x CL estro	S	S	S
QA alto x CL epit	N	N	N
QA alto x CL estro	S	S	S
QA baixo x CB epit	N	S	N
QA baixo x CB estro	S	S	S
QA alto x CB epit	N	N	N
QA alto x CB estro	N	N	N

Teste de Mann Whitney (5%). S=sim estatisticamente significativo, N= não estatisticamente significativo.

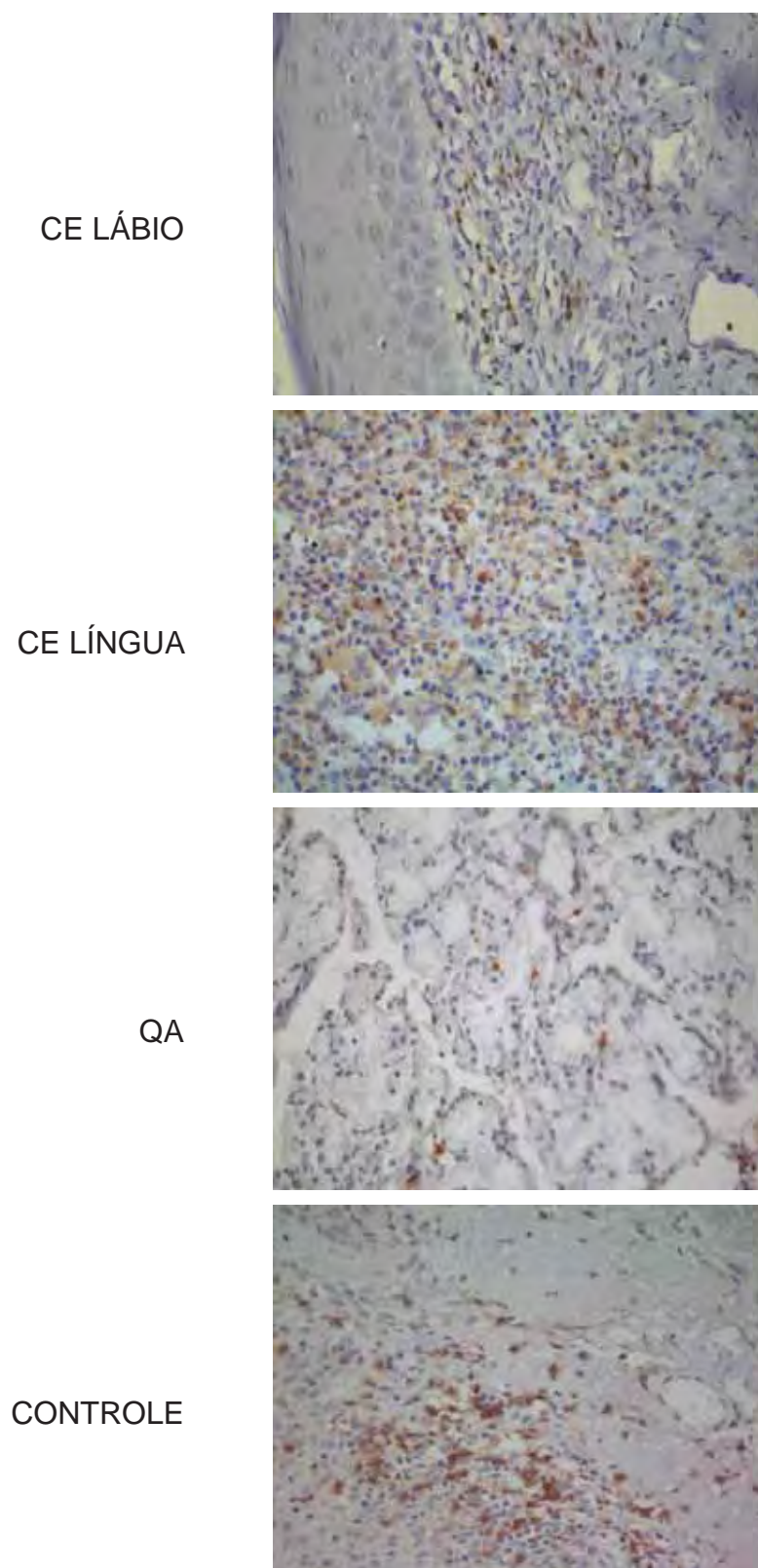


Figura 13 – Marcação dos linfócitos T CD4+ nas lesões acima.

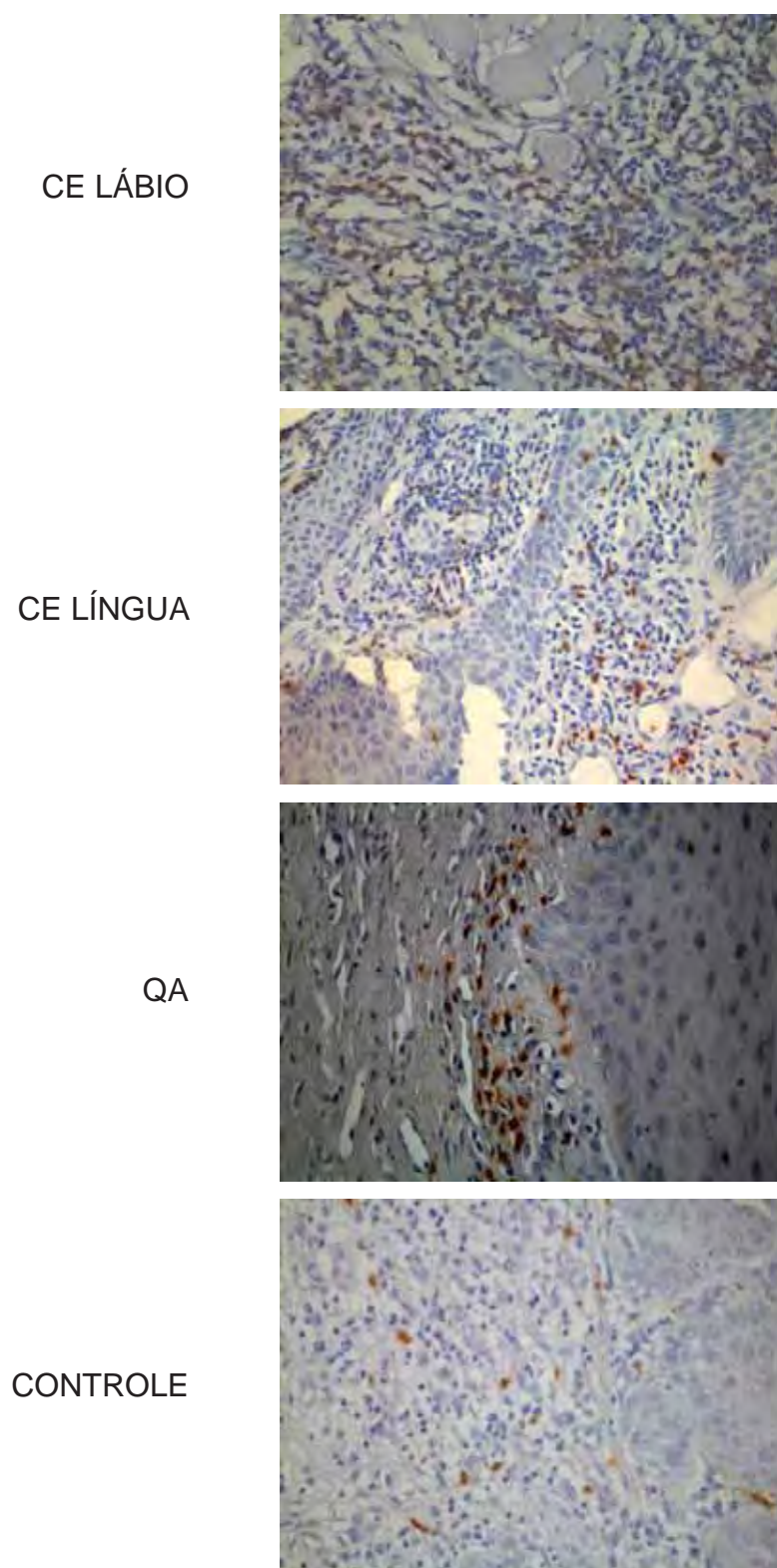


Figura 14 – Marcação dos linfócitos T CD8+ nas lesões de CE de lábio inferior, CE de língua, QA e grupo Controle.



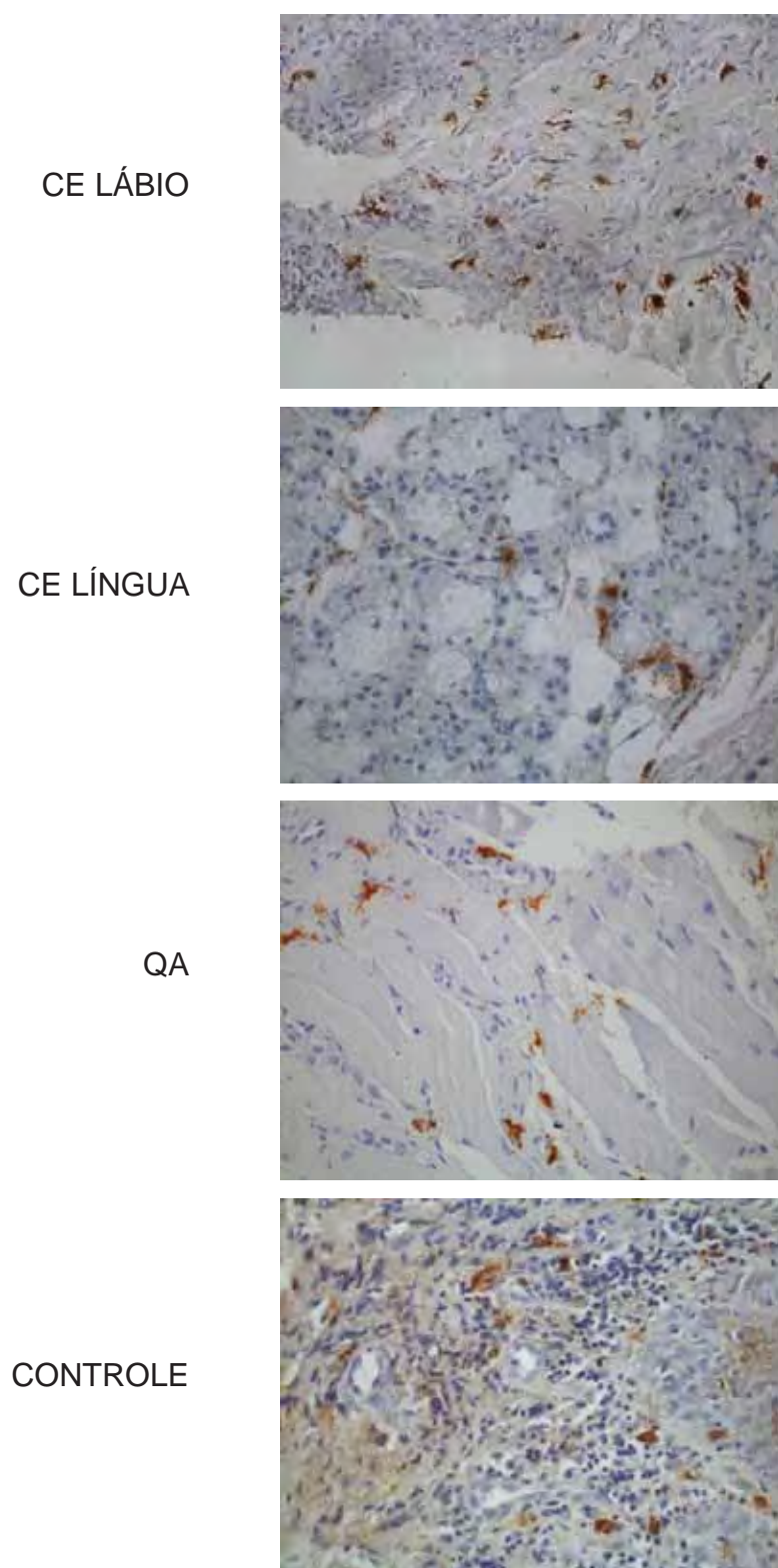


Figura 15 – Marcação dos MCs nas lesões de CE de lábio inferior, CE de língua, QA e grupo Controle.

## 6 DISCUSSÃO

A pele e os lábios, sob exposição cumulativa à radiação solar UVB podem sofrer alterações, em especial nas pessoas de pele clara que não fazem uso de proteção (Domaneschi, 2003). Apesar da penetração da radiação UVB na pele ser pequena, sua alta energia é responsável por causar danos solares tardios ou imediatos. Além disso, essa radiação leva a lesões de células epiteliais e produção de prostaglandinas e pode causar espessamento da epiderme, eritemas, pigmentação tardia e carcinogênese (Purim, 2010; Kurebayashi, 2002).

Na literatura alguns autores relatam que a destruição da camada de ozônio tem contribuído para o aumento de lesões no lábio e na pele. (Thornhill, 1993). A radiação UVB lesa as células epiteliais, produz substâncias que promovem dilatação dos vasos e inflamação e altera o DNA (Okuno, 2005). Esse dano ao DNA pode induzir pela radiação UV, imunossupressão molecular, alterando respostas do sistema imunológico. (Lima et al, 2006). Segundo Duthie et al. (1998), as respostas das células T CD4+ e T CD8+ foram inibidas por células de Langerhans tratadas com UVB.

Kligman (1969) e Martins (2007) observaram em lesões de QA alguns efeitos da radiação UVB como dano às fibras elásticas, aumento da substância amorfa fundamental, elastose e diminuição do colágeno. Essa elastose, também conhecida como degeneração basofílica é caracterizada pela degradação e posterior substituição de componentes da matriz extra-celular por um material elastótico com alteração. (Lundeen et al., 1985; Kligman, 1991; Kaugars et al. , 1999).

A atipia epitelial é um achado em lesões de QA. (Fisher; Markopoulos, 2004). Em nosso estudo as características histológicas

frequentemente encontradas nos casos de QA foram atipia epitelial, hiperqueratinização, acantose e atrofia. Foram observadas ainda, hiperchromatismo nuclear, variação de tamanho e número celular e de nucléolos e algumas figuras mitóticas atípicas. Subjacente ao epitélio, o tecido conjuntivo apresentou infiltrado inflamatório variável. A atipia leve esteve presente em 11 casos; a moderada em 12 casos e a intensa em 7 casos, dessa forma 100% da amostra apresentou atipia, concordando com os trabalhos de Kaugars et al. (1999), Cavalcante et al. (2008) e Markopoulos et al. (2004).

Devido a essas alterações, uma eventual transformação da QA em CE de lábio pode ocorrer num período de vários anos. Uma placa branca com aspecto heterogêneo, úlceras com bordas mal delimitadas que não cicatrizam, aumento no grau de atipia podendo indicar displasia epitelial ou CE. (Domaneschi, 2003; Martins, 2007). Todos os casos de CE de lábio, segundo Main e Pavone (1994), desenvolveram-se a partir de QA pré-existente, não havendo aspecto clínico claro que permita a distinção de um CE na fase inicial de QA.

Na classificação de CE consideramos os parâmetros/características da OMS como bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados (Barnes et al., 2005). Nosso estudo obteve 14 casos de bem diferenciados, 9 moderadamente diferenciados e 7 casos pouco diferenciado e para o CE de lábio e 15, 8 e 7, bem, moderada e pobremente diferenciados respectivamente para o CE de língua.

Como o sistema imunológico também sofre alterações em suas funções devido à exposição à radiação UVB podem ser induzidas mudanças em nível molecular e a sinalização intra e extra-celular pode ser modificada, favorecendo o desenvolvimento de respostas imunes mediadas pelas células T (Duthie, 1998). Essas células parecem estar relacionadas com a efetiva imunidade anti-tumoral e o significado clínico-patológico de linfócitos infiltrando tumores (TILs), em diversos carcinomas



humanos, tem sido uma questão de grande interesse (Katon, 2007). Inclusive, Watanabe et al. (2010) demonstrou que os TILs são fatores prognósticos importantes no carcinoma bucal.

No nosso estudo, os resultados da expressão de T CD4+ na QA demonstraram que a marcação de linfócitos T CD4+ estava significativamente mais alta em relação ao grupo controle, concordando com (Gannot et al., 2002) que encontraram em seus estudos um aumento da densidade de células T CD4+ conforme a lesão se torna maligna. Embora esses autores tenham pesquisado a progressão da hiperqueratose para a displasia e carcinoma. Nas lesões de CE a expressão de T CD4+ foi maior no CE de língua quando comparado ao de lábio. Provavelmente, devido a maior agressividade dessa lesão requerendo, portanto, maior aporte de resposta imune. No nosso estudo também encontramos diferença significativa entre a maior expressão de T CD4+ em CE de língua quando comparado do de lábio.

Diversas pesquisas demonstraram que uma maior marcação das células T CD4+ e T CD8+ parece melhorar o prognóstico dos pacientes, sendo que as células T CD4+ orquestram um exército efetor imunológico múltiplo e ambas são necessárias para que ocorra rejeição tumoral sistêmica efetiva (Hung et al., 1998; Chikamatsu et al., 2008). As células T CD4+ auxiliam a resposta das células T CD8+ e também são necessárias para a indução de células T CD8+ antígeno específicas, além de secretarem citocinas e IL-2, necessários para crescimento e proliferação das células T CD8+ ( Cho et al., 2003).

A expressão das células T CD8+ no nosso estudo foi significativamente maior em QA quando comparada com grupo controle. Além disso, sua expressão também foi mais significativa em CE de língua e CE lábio quando comparado com QA. Gannot et al. 2002, observou que nas lesões que evoluem de hiperqueratose para displasia e carcinoma há alterações de moderadas a severas ou casos de CE, são

acompanhados de maior número de linfócitos e macrófagos comparado a lesões com alterações patológicas leves (Gannot et al., 2002).

A marcação dos MCs em lesões de QA foi maior em relação ao grupo controle achados idênticos aos de Rojas et al. (2004) e Gomes et al. (2008). A marcação aumentada de MCs no CE de lábio e no CE de língua, em relação a mucosa normal, sugere que os MCs estão direta ou indiretamente envolvidos com a imunidade tumoral. Porque os MCS contribuem para um melhor prognóstico dos pacientes de CE de lábio quando comparados com CE de língua (Costa, 2009). Entretanto, Oliveira-Neto et al. (2007) consideram que a expressão aumentada de MCs na mucosa normal em relação à lesões com potencial de transformação maligna e CE bucal pode ser atribuída à falha na migração de MCs, que modifica o microambiente tumoral durante iniciação e progressão do tumor.

Cho et al. (2003) considera que a presença das células T CD4+ e T CD8+ parece melhorar o prognóstico de pacientes com CE de esôfago. Porque foi encontrado um melhor prognóstico nos casos de marcação de T CD4+ e T CD8+ no estroma e nos ninhos intraepiteliais do CE de esôfago. Em nosso estudo encontramos diferença estatisticamente significativa para as marcações T CD4+ de QA leve versus CE de língua bem diferenciado. Significância que se repetiu nas marcações T CD4+ de QA moderada versus CE de língua moderadamente diferenciado. O fato de apresentarmos melhor defesa imunológica nos casos de lesão leve ou moderada pode explicar a agressividade de alguns carcinomas que provavelmente induzam a queda no número do T CD8+, facilitando disseminação do tumor e desenvolvimento de metástases (Al-Shibli et al., 2008).

Quando analisamos a marcação de T CD4+, T CD8+ e MC subepiteliais obtivemos expressão significativa apenas nos dois primeiros marcadores. Nos casos em que a marcação dos MCs triptase+ não foi significativa pode ser explicado pelo fato das células T CD4+ e T

CD8+ se relacionarem com um melhor prognóstico. Talvez porque os MCs tenha uma de suas principais participações seja na angiogênese que parece favorecer infiltração do tumor e aparecimento de metástases. (Costa et al., 2009; Gomes et al., 2008)

O aumento da marcação de T CD8+ em carcinoma de pulmão e de células gigantes, no trabalho de Al-Shibli et al. (2008), se relacionou com maior sobrevida dos pacientes, sugerindo que a presença dessas células no estroma ou intraepitelial reduz a progressão da doença e o potencial de metástases e, nos tumores com invasão vascular, o número de células T CD8+ foi maior em relação aos tumores sem invasão. Encontraram também um aumento das células T CD4+ no estroma, relacionadas com um melhor prognóstico e apontando a importância do componente estromal na modulação das células tumorais e sugerem que essas células são necessárias para iniciar e manter a resposta imune, além de que, na ausência das células T CD4+, as células T CD8+ ficam letárgicas, pois as células T CD4+ são essenciais para transformação das células T CD8+ em células efetoras de longa duração.

O aumento da marcação de T CD8+ em carcinoma de pulmão e de células gigantes, no trabalho de Al-Shibli et al. (2008), se relacionou com maior sobrevida dos pacientes, sugerindo que a presença dessas células no estroma ou intraepitelial reduz a progressão da doença e o potencial de metástases e, nos tumores com invasão vascular, o número de células T CD8+ foi maior em relação aos tumores sem invasão. Encontraram também um aumento das células T CD4+ no estroma, relacionadas com um melhor prognóstico e apontando a importância do componente estromal na modulação das células tumorais e sugerem que essas células são necessárias para iniciar e manter a resposta imune, além de que, na ausência das células T CD4+, as células T CD8+ ficam lentárgicas, pois as células T CD4+ são essenciais para transformação das células T CD8+ em células efetoras de longa duração.

A QA de baixo potencial de malignidade classificada pelo sistema binário (Kujan et al., 2006) apresentou resultado estatisticamente significativo em relação à marcação das células T CD4+, T CD8+ e MCs subepiteliais. Pensando no significado dessa marcação nos CE de lábio e língua podemos deduzir que o resultado estatisticamente significativo seja o que esperávamos, já as células T CD4+ e T CD8+ estão relacionadas com um bom prognóstico (Cho et al., 2003). Quanto à triptase apresentar um resultado estatisticamente significativo na QA de baixo potencial de malignidade nos leva a entender a diversidade de opiniões a sobre o papel dos MCs em tumores, o que não surpreende levando em consideração a versatilidade e superabundância de mediadores que os MCS secretam tendo efeitos amplo e às vezes oposto (Ch'ng et al., 2006), sendo que a maioria dos estudos suportam esse papel acessório dos MCs no desenvolvimento e progressão tumoral.

Em QA de baixo grau de malignidade quando comparamos ao CL intraepitelial encontramos significância estatística o que corrobora com a mesma linha de raciocínio do parágrafo anterior.

Podemos considerar que um CE de lábio bem diferenciado com marcação estatisticamente significativa intraepitelial e no estroma, tenha tão bom prognóstico quanto uma lesão de QA de baixo potencial de malignidade.

Por se tratarem de lesão de bom prognóstico neste momento (Cho et al., 2003), talvez por isso os resultados não tenha sido estatisticamente significantes quando comparamos a marcação de uma lesão como QA, que compromete o vermelhão do lábio, com a lesão de CE de língua (CB) na marcação das células T CD4+, T CD8 + e MCs.

## 7 CONCLUSÃO

Baseado nos resultados obtidos pela análise da marcação de T CD4+, T CD8+ e MCs em lesões de QA, CE de lábio e CE de língua e grupo controle podemos concluir:

- a) A resposta imune tem participação efetiva nas lesões estudadas, visto que a marcação das células T CD4+ e T CD8+ apresentou sinergismo. Dado que contribui para o melhor prognóstico dos pacientes portadores de QA, CB e CL;
- b) Mesmo sabendo que os MCs também fazem parte do sistema imunológico, a marcação dos mesmos ficou a desejar quando comparados com a marcação dos linfócitos T. Provavelmente isso se deva a sua participação ambígua no prognóstico e evolução desses.

## 8 REFERÊNCIAS\*

Abreu MA, Silva OM, Neto DRN, Hirata CH, Weckx LL, Alchorne MM, et al. Actinic cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006;72:767–71.

Ayres S. Chronic actinic cheilitis. *J Am Med Assoc.* 1923;81(14):483-6.

Badoual C, Hans S, Rodriguez: Prognostic value of tumor-infiltrating CD4<sub>+</sub> T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin Cancer Res.* 2006;12:465-72.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sindrinsky D. World Health Organization classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.

Batista AC, Costa NL, Oton-Leite AF, Mendonça EF, Alencar Rde C, 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.

Behrens G, Li M, Smith CM, Belz GT, Mintern J, Carbone FR, et al. Helper T cells, dendritic cells and CTL Immunity. *Immunol Cell Biol.* 2004 Feb;82(1):84-90. Review.

Bentley JM, Barankin B, Lauzon GJ. Paying more than lip service to lip lesions. *Can Fam Physician.* 2003;49:1111-6.

---

\* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Boncinelli U, Fornieri C, Muscatello U. Relationship between leukocytes and tumor cells in pre-cancerous and cancerous lesions of the lip: a possible expression of immune reaction. *J Invest Dermatol.* 1978;71(6):407-11.

Bork K, Hoide N, Korting GW, Burgdorf WHC, Young SK. Diseases of the bucal mucosa and the lips. In: Bork K, Hoide N, Korting GW, Burgdorf WHC, Young SK. *Malignant Tumors.* Germany: WB Saunders; 1993. p. 326-8.

Bose A, Chakraborty T, Chakraborty K, Pal S, Baral R. Dysregulation in immune functions is reflected in tumor cell cytotoxicity by peripheral blood mononuclear cells from head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Immun.* 2008;8:10-8.

Cavalcante AS, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic cheilitis: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008;66:498-503.

Chiba T, Ohtani H, Mizoi T. Intraepithelial CD8+ T-cell-count becomes a prognostic factor after a longer follow-up period in human colorectal carcinoma: possible association with suppression of micrometastasis. *Br J Cancer.* 2004;91:1711-7.

Ch'ng S, Wallis AR, Yuan L, Davis FP, Tan TS. Mast cell and cutaneous malignancies. *Mod Pathol.* 2006;19:149-59.

Chikamatsu K, Sakakuraac K, Yamamotob T, Furuyaa N, Whitesidec TL, Masuyamab K. CD4+ T helper responses in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral oncol.* 2008;44:870-7.

Cohen M, Rogers G. The significance of mast cells in basal cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol* 1995;33:514–7.

Costa NL, Oton-Leite AF, Cheim-Júnior AP, Alencar Rde C, Bittar GO, Silva TA, et al., Batista AC. Density and migration of mast cells in lip squamous cell carcinoma and actinic cheilitis. *Histol Histopathol.* 2009 Apr;24(4):457-65.

Duthie MS, Kimber I, Norval M. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. *Br J Dermatol*. 1999;140:995-1009.

Girard KR, Hoffman BL, Viejo M. Actinic cheilitis: report of a case. *Bucal Surg Bucal Med Bucal Radiol Endod*. 1980;50(1):21-4.

Gomes APN, Johjann JE, Lovato GG, Ferreira AM. Comparative Analysis of the Mast Cell Density in Normal Oral Mucosa, Actinic Cheilitis and Lip Squamous Cell Carcinoma. *Braz Dent J*. 2008;19(3):186-9 .

Grimbaldeston MA, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Mast cells in photodamaged skin: what is their role in skin cancer? *Photochem Photobiol Sci*. 2006 Feb;5(2):177-83. Review.

Grimbaldeston MA, Nakae S, Kalesnikoff J, Tsai M, Galli SJ. Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. *Nat Immunol*. 2007 Oct;8(10):1095-104.

Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4+ T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med*. 1998;188:2357-68.

Ibsen OAC, Phelan JA. *Oral Pathology for the dental higienist*. Philadelphia: W B Saundes; 1996.

Iamaroon A, Pongsiriwet S, Jittidecharaks S, Pattanaporn K, Prapayasatok S. Increase of mast cells and tumor angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2003 Apr; 32(4):195-9

Imayama S, Nakamura K, Takeuchi M, Yoshiaki H, Takema Y, Sakaino Y, et al. Ultraviolet-B irradiation deforms the configuration of elastic fibers during the induction of actinic elastosis in rats. *J Dermatol Sci*. 1994;7:32-38.

Instituto Nacional de Câncer (INCA). *Estimativa 2010: incidência de cancer no Brasil*. Instituto do câncer. Rio de Janeiro: INCA; 2009.



Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, Von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4 (+) T cells are required for secondary expansion and memory in CD8 (+) T lymphocytes. *Nature* 2003;421:852–6.

Kärjä J, Syrjänen K, Nuutinen J. Immunocompetent cell reaction in prognostic evaluation of squamous cell carcinoma of the lip. *Acta Otolaryngol.* 1987;103(5-6):640-3.

Kaugars G, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Burns JC, Abbey LM . Actinic cheilitis: a review of 152 cases. *Bucal Surg Bucal Med Bucal Pathol Bucal Radiol and Endod.* 1999;88(2):181-6.

Kligman LH, Murphy GF. Ultraviolet B radiation increases hairless mouse mast cells in a dose-dependent manner and alters distribution of UV-induced mast cell growth factor. *Photochem Photobiol.* 1996;63:123–7.

Kondratiev S, Sabo E, Yakirevich E, Lavie O, Resnick MB. Intratumoral CD8+ T lymphocytes as a prognostic factor of survival in endometrial carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:4450-6.

Krunic ML, Garrod DR, Madani S, Buchanan MD, Clark RE. Immunohistochemical staining for desmogleins and 2 in keratinocytic neoplasms with squamous phenotype: actinic keratosis, keratoacanthoma and squamous cell carcinoma of the skin. *Br J Cancer.* 1998;77:1275.

Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncology.* 2006;42:987-93.

Laskaris G. Atlas colorido de doenças da boca. In: Laskaris G. Neoplasias malignas. São Paulo: Artes Médicas; 2004. p. 328.

Lima HC. Role of regulatory T cells in the development of skin diseases. *An Bras Dermatol.* 2006;81(3):269-81

Lundeen RC, Langlais RP, Terezhalmay GT. Sunscreen protection for lip mucosa: a review and update. *J Am Dent Assoc.* 1985;111(4):617-2.

MacFarlane GE, Terezhalmay GT. Actinic cheilitis diagnosis, prevention and treatment. *U S Navy Med.* 1982;73(6):22-4..

Main JHP, Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. *J Can Dent Assoc.* 1994;60(2):113-6.

Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis.* 2004;10:212-6.

Martins MD, Marques LO, Martins MAT, Bussadori SK, Fernandes KPS. Queilite Actínica: relato de caso clínico. *Conscientiae Saúde.* 2007;6:105-10.

Mattes J, Hulett M, Xie W, Hogan S, Rothenberg ME, Foster P, et al. Immunotherapy of cytotoxic T cell-resistant tumors by T helper 2 cells: an eotaxin and STAT6-dependent process. *J Exp Med.* 2003 Feb 3;197(3):387-93.

Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and etiology. *Bucal Dis.* 1999;5(3):185-95.

Naito Y, Saito K, Shiiba K. CD8+ T cells infiltrated within cancer cell nests as a prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998;58:3491-4.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Epitelial.* In: \_\_\_\_\_. *Patologia bucal e maxilofacial.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. p.286-96.

Nicolau SG, Balus L. Chronic actinic cheilitis and cancer of the lower lip. *Br J Dermatol.* 1964;76:278-89.

Oliveira-Neto HH, Leite AF, Costa NL, Alencar RC, Lara VS, Silva TA, et al. *Oral Oncol.* 2007 May;43(5):484-90. Epub 2006 Sep 18.

Pereira ALA, Veras SSL, Silveira EJD, Seabra FRG, Pinto LP, Souza LB, et al. O papel das proteínas da matriz extracelular e das metaloproteinases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. 2005;71(1):81-6.

Regezi J, Sciubba JJ. Condições Ulcerativas. In:\_\_\_\_ \_\_\_\_\_. Patologia bucal: correlações clinicopatológicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.62-72.

Robinson JK. Actinic cheilitis: a prospective study comparing four treatment methods. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1989;115(7):848-52.

Rojas IG, Martínez A, Brethauer U, Grez P, Yefi R, Luza S, et al. Actinic cheilitis: epithelial expression of COX-2 and its association with mast cell tryptase and PAR-2. Oral Oncol. 2009 Mar;45(3):284-90

Rojas IG, Martinez A, Pineda A, Spencer ML, Jiménez M, Rudolph MI. Increased mast cell density and protease content in actinic cheilitis. J Oral Pathol Med. 2004;33:567-73.

Rojas IG, Spencer MI, Martínez A, Maurelia MA, Rudolph MI. Characterization of mast cell subpopulations in lip cancer. J Oral Pathol Med 2005;34:268-273.

Santos JN, de Souza SO, Nunes FD, Sotto MN, de Araújo VC. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. J Cutan Pathol. 2003;30(4):237-42.

Sharma P, Shen Y, Wen S. CD8 tumor-infiltrating lymphocytes are predictive of survival in muscle invasive urothelial carcinoma. Proc Natl Acad Sci. USA. 2007;104:3967-72.

Scheinberg RS. Carbon dioxide laser treatment of actinic cheilitis. West J Med. 1992;156(2):192-3.

Sato E, Olson SH, Ahn . Intraepithelial CD8\_ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8\_/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. Proc Natl Acad Sci. USA. 2005; 102:18538-43.

Silveira EJD, Miguel MCC, Lima KC, Freitas RA, Morais MLSA, Queiroz LG. Analysis of local immunity in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. Exp and Mol Pathol. 2009;88:171-5.

Syrjänen K, Nuutinen J, Kärjä J. Tumor differentiation and tumor-host interactions as prognostic determinants in squamous cell carcinoma of the lip. Acta Otolaryngol. 1986 Jan-Feb;101(1-2):152-60.

Stanley RJ, Roenigk RK. Actinic cheilitis: treatment with the carbon dioxide laser. Mayo Clin Proc. 1988;63(3):230-5.

Terezhalmay G, Naylor GD. Actinic cheilitis. J Ind Dent Assoc. 1993;72(4):12-5.

Thornhil MH. The sun, the ozone layer and the skin: the role of ultraviolet light in lip and skin cancer. Dental update. 1993;20(6):236-40.

Young AR. Acute effects of UVR on human eyes and skin. Progress in Biophysics and Molecular Biology. 2006;92:80-5.

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 Feb;39(2):162-7.

Zhang B, Bowerman NA, Salama JK, et al. Induced sensitization of tumor stroma leads to eradication of established cancer by T cells. J Exp Med 2007;204:49-55.

**APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JULIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS**  
**DISCIPLINA DE PROPEDEÚTICA ESTOMATOLÓGICA**

Caro(a) Senhor(a)

Eu, ANA SUELI RODRIGUES CAVALCANTE, Professora Adjunta da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP, portadora do CIC 049.040.362-04, estabelecido à Rua Ceramista Roberto Weiss, 682 – Jardim das Colinas, na cidade de São José dos Campos, telefone para contacto nº 012-3942-2570, vou coordenar uma pesquisa cujo título é **“ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO DA QUEILITE ACTÍNICA, CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÁBIO INFERIOR E CARCINOMA EPIDERMÓIDE INTRABUCAL”**

Este trabalho tem por finalidade estudar o lábio inferior de pessoas portadoras de queilite actínica (que é uma desordem com potencial de malignidade), de carcinoma epidermóide de lábio inferior e carcinoma epidermoide intrabucal, através de exame microscópico, sendo necessária a realização de biópsia incisional (remoção de um pequeno fragmento do lábio sob anestesia local). Após o diagnóstico o senhor (a) poderá doar este material biológico para esta pesquisa.

Se tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética (CEP) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos-UNESP, situada na Av. Engº Francisco José Longo, 777 – CEP 12245000, em São José dos Campos-SP, fone 012-3947-9076, e-mail janete@fosjc.unesp.br e comunique-se com a Coordenadora Profa. Adj. Janete Dias Almeida. Informo que foi garantida a liberdade da retirada do consentimento a qualquer momento e assim deixar de participar do estudo. Também não haverá custo nem pagamento pela Colaboração.

## **ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Acredito ter sido esclarecido(a) a respeito das informações que leram para mim, descrevendo o estudo a ser realizado e concordo em participar, sabendo quais os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que minha participação não implicará em nenhuma despesa. Concordo em participar voluntariamente deste estudo sabendo que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade, prejuízo ou perda de qualquer benefício que possa ter adquirido.

NOME/RESPONSÁVEL\_\_\_\_\_

ENDEREÇO\_\_\_\_\_

RG\_\_\_\_\_CPF\_\_\_\_\_

ASSINAT. RESPONSÁVEL \_\_\_\_\_

ASSINAT. PESQUISADOR\_\_\_\_\_

**ANEXO B - Estudo Clínico-Histológico da Queilite Actínica, Carcinoma Epidermoide de Lábio Inferior e Carcinoma Epidermoide Intrabucal**

**IDENTIFICAÇÃO**

1-Nome: \_\_\_\_\_

2-End.: \_\_\_\_\_

3-Cidade: \_\_\_\_\_

4-UF: \_\_\_\_\_

5-País: \_\_\_\_\_

6-Nasc: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

7-Sexo: \_\_\_\_\_

8-Idade: \_\_\_\_\_

9-Escolaridade: \_\_\_\_\_

**ANAMNESE**

10 – Diabético                      sim( ) não( ) \_ Controlado    sim( ) não( )

11 – Hipertenso                    sim( ) não( ) \_ Controlado    sim( ) não( )

12 - Colesterol alto                sim( ) não( ) \_ Controlado    sim( ) não( )

13 – Cardiopatia                    sim( ) não( ) \_ Controlado    sim( ) não( )

14 - Outras doenças

Quais \_\_\_\_\_

15 - Tabagista crônico            sim( )    não( )

16 - Higiene bucal                boa( )    regular( )    ruim( )

17 - Etílico crônico                sim( )    não( )

18 - Estado nutricional            bom( )    regular( )    ruim( )

19 - DST/ AIDS                    sim( )    não( )

20 - Estado clínico geral           bom( )    regular( )    ruim( )

## QUEILITE ACTÍNICA (QA)

### 21 - Caracterização Clínica

<input type="checkbox"/> Edema	<input type="checkbox"/> Atrofia
<input type="checkbox"/> Escamação	<input type="checkbox"/> Leucoplasia
<input type="checkbox"/> Fissuração	<input type="checkbox"/> Sintomatologia
<input type="checkbox"/> Exulseração	<input type="checkbox"/> Alteração entre linha/transição do vermelhão e a pele
<input type="checkbox"/> Infiltração	<input type="checkbox"/> Aspecto empalidecido e eritematoso
<input type="checkbox"/> Crostas	<input type="checkbox"/> Aspecto moteado vermelho e branco do lábio
Proservação:	
Proservação:*	
Proservação:	

### 22 - Aspectos histológicos da QA – Segundo o Sistema Binário Kujan et al. 2006)

<b>Descrição citológica</b>	<b>Descrição arquitetura</b>
<input type="checkbox"/> Estratificação Epitelial irregular	<input type="checkbox"/> Variação anormal de tamanho do núcleo
<input type="checkbox"/> Perda de polaridade das células basais	<input type="checkbox"/> Variação anormal da forma nuclear
<input type="checkbox"/> Projeções epiteliais em forma de gota	<input type="checkbox"/> Variação anormal do tamanho celular
<input type="checkbox"/> Número aumentado de figuras mitóticas	<input type="checkbox"/> Variação anormal da forma celular
<input type="checkbox"/> Mitoses superficiais em localização anormal	<input type="checkbox"/> Aumento na proporção núcleo / citoplasma
<input type="checkbox"/> Queratinização prematura em células isoladas	<input type="checkbox"/> Aumento do tamanho nuclear
<input type="checkbox"/> Pérolas córneas dentro das projeções epiteliais	<input type="checkbox"/> Figuras mitóticas atípicas
	<input type="checkbox"/> Aumento do número e tamanho dos nucléolos
	<input type="checkbox"/> Hiperchromatismo



## CARCINOMA EPIDERMOIDE DE LÁBIO INFERIOR (CEL)

### 23 – Caracterização Clínica

<input type="checkbox"/> Úlcera
<input type="checkbox"/> Extensão
<input type="checkbox"/> Localização
<input type="checkbox"/> QA adjacente
<input type="checkbox"/> Diagnóstico anterior de QA / Há quanto tempo:
<input type="checkbox"/> Sintomatologia
Proservação:
Proservação:
Proservação:

### 24 - Aspectos Histopatológicos

CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CE (Neville et al., 2004)		
Grau	Diferenciação	Características
<input type="checkbox"/> Grau I	grau baixo ou bem diferenciado	Neoplasia madura que se assemelha ao tecido de origem com crescimento lento e metastatizará mais tardiamente
<input type="checkbox"/> Grau II	grau moderado	Neoplasia intermediária entre o grau I e III
<input type="checkbox"/> Grau III	grau baixo ou pobremente diferenciado	Neoplasia imatura com muito pleomorfismo celular e nuclear, pouca ou nenhuma produção de queratina

## CARCINOMA EPIDERMÓIDE INTRABUCAL (CEB)

### 25 – Caracterização Clínica

( ) Úlcera
( ) Extensão
( ) Localização
( ) Lesão primária
( ) Diagnóstico anterior de CE nesta localização / Há quanto tempo:
( ) Sintomatologia
Proservação:
Proservação:
Proservação:

### 26 - Classificação Histopatológica do CEB (Neville et al., 2004)

<b>Grau</b>	<b>Diferenciação</b>	<b>Características</b>
( ) Grau I	grau baixo ou bem diferenciado	Neoplasia madura que se assemelha ao tecido de origem com crescimento lento e metastizará mais tardiamente
( ) Grau II	grau moderado	Neoplasia intermediária entre o grau I e III
( ) Grau III	grau baixo ou pobremente diferenciado	Neoplasia imatura com muito pleomorfismo celular e nuclear, pouca ou nenhuma produção de queratina

Cidade e data \_\_\_\_\_

Assinatura do paciente \_\_\_\_\_

Assinatura do profissional \_\_\_\_\_