

UNIVERSIDADE FEDERAL DOS VALES DO JEQUITINHONHA E MUCURI

Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Tatiana Fernandes Araújo Almeida

**SUBGRUPOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS EM CARCINOMA ESPINOCELULAR
ORAL DIAGNOSTICADO EM PACIENTES JOVENS E IDOSOS:**

um estudo imunoistoquímico comparativo

Diamantina

2016

Tatiana Fernandes Araujo Almeida

**SUBGRUPOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS EM CARCINOMA ESPINOCELULAR
ORAL DIAGNOSTICADO EM PACIENTES JOVENS E IDOSOS:
um estudo imunoistoquímico comparativo**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Terezinha Marques Mesquita

Co-orientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León

Diamantina

2016

Ficha Catalográfica – Serviço de Bibliotecas/UFVJM
Bibliotecário Anderson César de Oliveira Silva, CRB6 – 2618.

A447s	<p>Almeida, Tatiana Fernandes Araújo</p> <p>Subgrupos de células dendríticas em carcinoma espinocelular oraldiagnosticado em pacientes jovens e idosos: um estudo imunoistoquímico comparativo / Tatiana Fernandes Araújo Almeida. – Diamantina, 2016. 104 p. : il.</p> <p>Orientador: Ana Terezinha Marques Mesquita Coorientador: Jorge Esquiche León</p> <p>Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Odontologia) - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p>1. Carcinoma espinocelular. 2. Câncer de boca. 3. Imunossenescência. 4. Células dendríticas. 5. Imuno-histoquímica. I. Título. II. Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri.</p> <p style="text-align: right;">CDD 617.6</p>
-------	---

Elaborado com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Tatiana Fernandes Araújo Almeida

**SUBGRUPOS DE CÉLULAS DENDRÍTICAS EM CARCINOMA ESPINOCELULAR
ORAL DIAGNOSTICADO EM PACIENTES JOVENS E IDOSOS:
um estudo imunoistoquímico comparativo**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Ana Terezinha Marques
Mesquita

Data de aprovação ____ / ____ / ____.

Profa. Dra. Ana Terezinha Marques Mesquita
Faculdade de Odontologia - UFVJM

Prof. Dr. Cássio Roberto Rocha dos Santos
Faculdade de Odontologia - UFVJM

Prof. Dr. Ricardo Alves de Mesquita
Faculdade de Odontologia - UFMG

Diamantina, MG

Dedicado aos meus avós:

Olímpia Drumond Araújo, Oliveiros Duarte Araújo,

Maria Fernandes de Almeida e Antônio José de Almeida.

Para sempre Vovó Zizi, Vovô Zil, Vovó Maria e Vovô Maninho.

A dor da saudade é eterna, mas o amor que transborda em meu coração,
nos mantém sempre juntos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por instigar em mim a vontade de aprender sempre mais, por me conceder a possibilidade de ter ao meu lado pessoas incríveis e por me iluminar na conclusão de mais uma etapa.

Aos meus pais Tânia Maria Drumod Araújo Almeida e Raimundo Fernandes de Almeida, meus maiores mestres. Muito obrigada pela imensurável dedicação, amor e afeto, por aceitarem minhas escolhas e caminharem sempre ao meu lado.

Ao meu marido Nerimar Dawid Lopes de Araújo, meu primeiro e único amor, que transformou os meus planos em nossos planos, quem me faz querer melhorar cada vez mais. Muito obrigada por me fazer sempre feliz com a certeza de que tudo dará certo.

Aos meus irmãos Tássia Fernandes Araújo Almeida e Rainan Fernandes Araújo Almeida, meus grandes parceiros, sem vocês esta caminhada seria imensamente árdua, muito obrigada por todo apoio e conforto.

Aos meus sogros Aparecida Nunes Lopes e Neri José de Araújo e ao meu cunhado Marcus Vinícius Lopes Araújo, pela torcida e confiança.

Agradeço em especial a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Ana Terezinha Marques Mesquita, primeiramente pela confiança ao me receber como orientanda, por todo o incentivo, paciência e pensamento positivo, pelos ensinamentos transmitidos e por contribuir para o meu crescimento pessoal e profissional.

Muito obrigada ao meu co-orientador, Prof. Dr. Jorge Esquiche León, por aceitar participar desta parceria, por toda atenção e por prontamente me receber na Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da USP (FORP/USP).

Ao Prof. Dr. Leandro Silva Marques e à Prof^a. Dr^a. Maria Letícia Ramos Jorge, coordenadores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGOdonto) da UFVJM, obrigada por todo incentivo, palavras de apoio e por confiarem em mim mais do que eu mesma.

Aos professores Cássio Roberto Rocha dos Santos, Ricardo Alves de Mesquita, Flaviana Dornela Verli e João Luiz de Miranda, por terem aceito o convite para participar da banca examinadora desta dissertação.

Aos professores Saulo Gabriel Moreira Falci, Alfredo Ribeiro da Silva e Fernando Chahud pela parceria para o desenvolvimento do artigo.

À professora Etel Rocha Vieira por todo o carinho e incentivo para o início e prosseguimento na carreira acadêmica.

À Gislene Alessandra Santos, secretária do PPGOdonto, por toda calma, sutileza e por estar sempre disponível para elucidar qualquer problema.

Aos colegas de mestrado Débora Souto, Ednele Miranda e Thiago César, muito obrigada pelo companheirismo, pela amizade e por toda ajuda independente do motivo ou momento. Desejo imenso sucesso a todos vocês.

Aos alunos de iniciação científica Lucas, da FORP/USP e Kelly, bolsista deste trabalho pela UFVJM, por compartilharem ideias e conhecimentos.

Ao Prof. Dr. João Luiz de Miranda coordenador do Laboratório de Patologia Oral da UFVJM e aos técnicos Luiz e Léo, muito obrigada.

Aos pacientes, que ao procurar atendimento nas instituições de ensino, consentem com a realização de trabalhos científicos.

A todos os professores do Departamento de Odontologia da UFVJM, que através de pequenos gestos e grandes ensinamentos fazem de mim uma pessoa melhor e mais sábia a cada momento.

À Diamantina, por me acolher durante estes sete anos de amadurecimento e aprendizado.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

O carcinoma espinocelular oral (CECO) é uma neoplasia maligna que acomete principalmente idosos. O desencadeamento da doença é relacionado à exposição aos fatores de risco e ao declínio da função imune associada ao envelhecimento cronológico. Alguns estudos têm demonstrado um aumento na incidência de CECO em adultos jovens, sugerindo envolvimento de outros fatores na etiologia da doença, como uma alteração do sistema imunológico. As células dendríticas (CDs) são células apresentadoras de antígeno profissionais e estimuladoras eficazes para a expansão clonal de linfócitos. Acredita-se que uma alteração da função das CDs em pacientes com câncer contribui para a falha da resposta antitumoral, levando a uma consequente progressão da doença. O objetivo deste estudo foi avaliar, através da imunoistoquímica, se há diferença na quantificação tissular dos subgrupos de CDs, associada à idade, em espécimes de biópsias de CECO. Para isso, foram selecionados casos de CECO de pacientes em três diferentes faixas etárias: G1 (< 40 anos de idade, n = 12), G2 (≥ 40 até < 60 anos de idade, n = 15) e G3 (≥ 60 anos de idade, n = 14). Os marcadores utilizados foram S100, CD1a, CD207 (para CDs imaturas, imCDs), CD83 e CD208 (para CDs maduras, mCDs). As imagens foram capturadas dos campos com maior intensidade de marcação nas lâminas histológicas e a quantificação celular foi realizada com o auxílio do software *Image J*. A frequência e localização das CDs foram avaliadas e analisadas estatisticamente nas regiões intratumoral (intertumoral e ou estromal) e extratumoral. No geral, imCDs foram significativamente mais frequentes que mCDs em todos os grupos. ImCDs e mCDs mostraram preferencialmente localização intratumoral e extratumoral respectivamente. Comparando G1 versus G2 / G3 foi observada um significativo menor número de mCDs em G1. Na comparação de G1 em relação a G2 ou G3 houve um número significativamente menor de ambas, imCDs e mCDs. Nossos resultados mostram que existe uma menor quantidade de imCDs e mCDs em CECO afetando pacientes jovens em comparação com idosos, sugerindo um comprometimento da resposta imune antitumoral em G1e permitindo a progressão do tumor.

Palavras chave: Carcinoma Espinocelular. Câncer de boca. Imunossenescência. Células Dendríticas. Imuno-Histoquímica.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a malignant neoplasm that mainly affects elderly people. The onset of the disease is related with exposure to risk factors and the decline of immune function associated with chronological aging. Previous studies have demonstrated an increased incidence of OSCC in young adults, suggesting involvement of other factors in the etiology of the disease, such as a change in the immune system. Dendritic cells (DCs) are professional antigen presenting cells and effective for stimulating clonal expansion of lymphocytes. It is believed that a change in the function of DC in cancer patients contributes to the failure of the anti-tumor response, leading to a consequent progression of the disease. The aim of this study was to evaluate, by immunohistochemistry, if there were differences in tissue quantification of DCs subsets, associated with age in specimens of OSCC biopsies. For this OSCC cases were selected at three different ages: G1 (< 40 years old, n = 12), G2 (\geq 40 to <60 years old, n = 15) and G3 (\geq 60 years old, n = 14). The markers used were S100, CD1a, CD207 (for immature DCs, imDCs), CD83 and CD208 (for mature DCs, mDCs). Images were captured from fields with higher intensity staining in histological sections and cell quantification was performed with Image J software help. The frequency and localization of immunostained DCs were analyzed in intratumoral (intranestal and/or extranestal) and extratumoral areas and statistically compared. Overall, imDCs than mDCs were significantly more frequent in all groups. ImDCs and mDCs showed preferential intratumoral and extratumoral localization, respectively. Comparing G1 than G2/G3 showed a significant lesser number of mDCs. G1 versus G2 or G3 there is a significantly lower number of both imDCs and mDCs. Our results show a lower number of both imDCs and mDCs in OSCC affecting younger than elderly patients, suggesting impairment of an effective antitumor immune response in G1 and enabling tumor progression, showing a gradual establishment of the antitumor immune response mediated by DCs according to the age, but with defects in quality.

Keywords: Squamous Cell Carcinoma. Mouth Neoplasms. Dendritic Cells.

Immunosenescence. Immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 – Imagem microscópica (a) das ilhas tumorais e células dendríticas (CDs) intertumorais (▶) e estromais (▶) e (b) de CDs extratumorais (▶). Imunoistoquímica, CD1a, 200x.....51
- Figura 2 – Comparação intragrupos de imCDs e mCDs (G1 < 40 anos, n = 12; G2 ≥ 40 a <60 anos, n = 15 e G3 ≥60 anos, n = 14) de acordo com a localização relacionada ao tumor. a, S100; b, CD1a; c, CD207; d, CD83; e, CD208. *p < 0,05. **p < 0,001 Teste U de Mann Whitney. Valores expressos em média..... 52
- Figura 3 – Prancha de imagens histológicas da marcação imunoistoquímica para imCDs (S100, CD1a e CD207) e mCDs (CD83 e CD208), mostrando escassa imunomarcação de mCDs para todos os grupos etários. 200x..... 53

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 – Características dos pacientes com CECO e a associação das características clínico patológicas de acordo com os grupos..... 54
- Tabela 2 – Variáveis com diferença significativa para a comparação entre grupos: G1 (n = 12) versus G2/G3 (n = 29). Os dados estão expressos em média e desvio padrão (D.P.). Teste U de Mann Whitney..... 54
- Tabela 3 – Análise de variância para a quantificação de imCDs (S100+, CD1a+, CD207+) e mCDs (CD83+, CD208+) em CECO nos grupos G1, G2 e G3. Os dados estão expressos em média e desvio padrão (D.P.). Teste ANOVA..... 55
- Tabela 4 – Análise de variância das variáveis com diferença significativa na comparação entre grupos: G1 (n = 12), G2 (n = 15) e G3 (n = 14). Os dados estão expressos em média e desvio padrão (D.P.). Teste ANOVA..... 55

LISTA DE SIGLAS

APC - Célula apresentadora de antígeno

CD - Célula dendrítica

CD1a - Cluster of Differentiation 1 a / Aglomerado de diferenciação 1 a

CD207 - Cluster of Differentiation 207 / Aglomerado de diferenciação 207

CD208 - Cluster of Differentiation 208 / Aglomerado de diferenciação 208

CD83 - Cluster of Differentiation 83 / Aglomerado de diferenciação 83

CEC - Carcinoma espinocelular

CECO - Carcinoma espinocelular oral

CL - Célula de Langerhans

GM-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos

H&E - Hematoxilina e Eosina

HPV - Papiloma vírus humano

IFN - Interferon

IgSF - Superfamília de Imunoglobulinas

IL - Interleucina

LAMP-3 - Proteína de membrana associada ao lisossomo 3

LTH1 - Linfócito T helper 1

LTH2- Linfócito T helper 2

LTregs - Linfócitos T reguladores

MDSCs - Células supressoras derivadas da linhagem mielóide

MHC - Complexo Maior de Histocompatibilidade

NK - Natural Killer

PBS - Solução salina tamponada com fosfato

PCR - Reação em cadeia da Polimerase

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

UFVJM - Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

USP - Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	23
2 REVISÃO DA LITERATURA	25
2.1 Epidemiologia do câncer	25
2.2 Fatores de risco para o CECO	25
2.3 CECO em adultos jovens	26
2.4 Alterações morfológicas do CECO	27
2.5 Características clínicas e histopatológicas do CECO	27
2.6 A imunologia do envelhecimento.	28
2.7 Células Dendríticas.....	29
3 ARTIGO	32
3.1 Conflito de interesse	33
3.1 Resumo	34
3.2 Abstract	35
3.3 Introdução	36
3.4 Metodologia.....	37
3.4.1 Amostra	37
3.4.2 Classificação morfológica	38
3.4.3 Intensidade do infiltrado inflamatório.....	38
3.4.4 Reação de imunoistoquímica	38
3.4.5 Análise das reações de imunoistoquímica	39
3.4.6 Quantificação das células dendríticas	39
3.4.7 Análise estatística	40
3.5 Resultados	40
3.6 Discussão	41
3.6 Agradecimentos	46
3.7 Referências	47
3.8 Figuras	51
3.9 Tabelas.....	54
4 CONCLUSÕES.....	56

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICE A – TABELA 5	64
APÊNDICE B – TABELA 6.....	67
ANEXO A – FICHA DE BIÓPSIA E TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO	70
ANEXO B – FICHA CLÍNICA DO PACIENTE	72
ANEXO C – PARECER FINAL DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	77
ANEXO D – GUIA PARA AUTORES - ORAL ONCOLOGY	82

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Apesar de natural, o envelhecimento suscita diversas alterações anatômicas, funcionais e fisiológicas aos indivíduos. Este é um processo complexo e multifatorial, que também está associado a um envelhecimento do sistema imunológico denominado imunossenescência (FULOP *et al.*, 2016). Este envelhecimento imunológico está associado ao progressivo declínio das funções imunes, sendo muitas vezes difícil determinar se as alterações celulares são intrínsecas, conseqüente de alterações ambientais ou ambos (CARUSO *et al.*, 2009; ADEMOKUN *et al.*, 2010; BUENO *et al.*, 2014; FULOP *et al.*, 2016).

As causas exatas que promovem o envelhecimento são desconhecidas, entretanto, sabe-se que este é o principal fator de risco para o desenvolvimento de doenças, bem como para alterações celulares que levam a um conseqüente aumento da suscetibilidade do indivíduo ao desenvolvimento de infecções, doenças autoimunes e câncer, podendo afetar tanto a imunidade inata (PANDA *et al.*, 2009) quanto a imunidade adaptativa (SU *et al.*, 2013).

A instabilidade genômica, decorrente da imunossenescência, pode levar a alterações que permitem às células a aquisição de fenótipos que aumentam a sua capacidade para proliferar, migrar e colonizar locais ectópicos. Desta forma estas células são capazes de sobreviver em ambientes hostis, evadindo ao ataque do sistema imunológico. Estes fenótipos celulares são, evidentemente, característicos de neoplasias malignas (HANAHAN e WEINBERG, 2011; CAMPISI, 2013) como no carcinoma espinocelular oral (CECO).

O CECO é uma neoplasia maligna que acomete principalmente idosos, sendo mais frequente em pacientes com mais de 45 anos de idade (CHATURVEDI *et al.*, 2008). Alguns estudos têm demonstrado um aumento na incidência de câncer em adultos jovens com idade entre 18 e 45 anos, especialmente em orofaringe e cavidade oral (GOLAS, 2007; CHATURVEDI *et al.*, 2008).

Em contraste com o paciente idoso, os indivíduos jovens com CECO muitas vezes não apresentam os fatores de riscos comuns à doença, como o uso de álcool e tabaco, uma vez que apresentam menos tempo de exposição (STURGIS e CINCIRIPINI, 2007). Estes pacientes também não passaram por alterações em decorrência do envelhecimento e desta forma a imunossenescência não deveria ser um fator de risco. Portanto, o desenvolvimento do CECO em adultos jovens permanece controverso, levando à suspeita do envolvimento de outros fatores para a sua etiologia, incluindo uma alteração do sistema imunológico, fazendo-se necessário o

desenvolvimento de novos estudos para esclarecer os mecanismos que podem desencadear essa doença em jovens.

As células dendríticas (CDs) são células especializadas na captura e apresentação de antígenos. Fazem parte do sistema imune inato mas são responsáveis pela associação com a imunidade adaptativa através da ativação de linfócitos T (PAUL, 2013).

Quando imaturas, as CDs (imCDs) possuem alta capacidade de produção de citocinas e captura de antígenos e quando maduras (mCDs) são muito eficientes na apresentação de antígenos, atuando na manutenção do equilíbrio entre a tolerância e a imunidade protetora (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998; MELLMAN e STEINMAN, 2001).

As CDs são as células apresentadoras de antígenos profissionais e mais potentes, necessárias para iniciar a resposta imune. Depois da captura de antígeno, as CDs migram para os linfonodos regionais através de vasos linfáticos aferentes e vênulas endoteliais, apresentam os antígenos aos linfócitos que por sua vez, regulam as respostas imunes durante as infecções (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998; WASKOW *et al.*, 2008).

As CDs são capazes de ativar linfócitos não apenas para a eliminação de células infectadas com agentes patogênicos, mas também para a eliminação de células tumorais. Por esta razão, existe um grande interesse para a otimização de CDs como em vacinas contra o câncer (PALUCKA e BANCHEREAU, 2012). Acredita-se que uma supressão e alteração da função das CDs em pacientes com câncer contribui para a falha da resposta antitumoral, levando a uma conseqüente progressão da doença (MA *et al.*, 2012).

Ainda não existem estudos correlacionando as CDs com a imunossenescência em CECO. Sendo então de extrema importância o entendimento da distribuição e quantificação das CDs, maduras e imaturas, no CECO a fim de adicionar conhecimento para elucidar o papel destas células no desenvolvimento do tumor em adultos jovens, bem como na terapia antitumoral.

Mecanismos moleculares da disfunção das CDs na mediação tumoral são parcialmente descritos na literatura, fazendo-se necessário a realização de estudos que possam elucidar as potenciais vias de sinalização e a comparação entre subgrupos de CDs em pacientes com CECO em diferentes faixas etárias. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar comparativamente a presença e localização tissular dos subgrupos de CDs maduras e imaturas em CECO de indivíduos em três diferentes faixas etárias (< 40 anos de idade; \geq 40 anos até < 60 anos de idade e \geq 60 anos de idade).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia do CECO

Aproximadamente 680.000 novos casos de câncer de cabeça e pescoço são diagnosticados anualmente em todo o mundo, sendo o CECO o mais prevalente entre eles (FERLAY *et al.*, 2015). É a sexta malignidade mais frequente (ALAM *et al.*, 2012), e representa aproximadamente 3% de todos os novos casos de câncer diagnosticados (SCULLY e BAGAN, 2009).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam-se, para o Brasil, no ano de 2016, 11.140 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,27 novos casos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres.

O câncer da cavidade oral em homens é o quarto mais frequente na Região Sudeste (14,58/100 mil). Nas Regiões Nordeste (6,86/100 mil) e Centro-Oeste, ocupa a quinta posição (9,15/100 mil), enquanto na Região Sul (15,91/100 mil), ocupa a sexta posição, e na Região Norte (3,46/100 mil) é o sétimo mais frequente. Para as mulheres, é o nono mais frequente na Região Nordeste (4,11/100 mil). Na Região Sudeste (5,29/100 mil), ocupa a décima posição. Nas Regiões Norte (1,76/100 mil) e Centro-Oeste (2,79/100 mil), é o 12º mais frequente, e, na Região Sul (3,32/100 mil), ocupa a 15ª posição (BRASIL, 2016).

O perfil clássico de pacientes com CECO é de homens, entre a sexta e sétima década de vida, fumantes e etilistas por muitos anos (VARGAS-FERREIRA *et al.*, 2012). Entretanto, tem sido observado, um aumento no número de casos de CECO em pacientes jovens, do sexo feminino e com associação limitada aos fatores de risco tradicionais (PATEL *et al.*, 2011; SANTOS-SILVA *et al.*, 2011). A inclusão deste novo perfil de pacientes tem gerado um impacto significativo sobre a epidemiologia do CECO principalmente em relação aos fatores de risco (SANTOS-SILVA *et al.*, 2011).

2.2 Fatores de risco para o CECO

Os fatores etiológicos mais comumente associados ao CECO são o consumo de tabaco e álcool, infecções virais, deficiências nutricionais e herança genética (SCULLY e BAGAN, 2009).

O tabaco e o álcool são considerados os principais fatores de risco para o CECO, agindo, como iniciadores e promotores da carcinogênese. O risco de indivíduos fumantes desenvolverem CECO é proporcional à quantidade e ao tempo de uso do cigarro. Além disso, os efeitos do álcool no organismo resultam da sua propriedade de irritar a mucosa e da sua capacidade de atuar como solvente de carcinógenos, especialmente os existentes no tabaco, por isto são fatores fortemente relacionados à idade do paciente (BLOT *et al.*, 1988; BROWN *et al.*, 2012). Os indivíduos fumantes e etilistas apresentam um risco 20 vezes maior para o desenvolvimento de recidivas ou segundos tumores na cavidade bucal quando comparados aos indivíduos não fumantes e não etilistas, especialmente, quando mantêm o consumo de tabaco e álcool após o diagnóstico do tumor primário (CARVALHO *et al.*, 2004).

Infecções por Papiloma Vírus Humano (HPV) vem sendo identificadas como agente etiológico para CECO principalmente em homens adultos jovens, sem histórico de consumo de álcool e tabaco. Aproximadamente 10% dos pacientes foram positivos para HPV, detectado através da reação em cadeia da polimerase (PCR), em estudo realizado para CECO em língua (DAHLGREN *et al.*, 2004).

Alguns estudos também correlacionaram o CECO com um histórico de dietas pobres em frutas e vegetais. O consumo de vegetais, frutas cítricas e peixes são os principais itens para uma dieta considerada de baixo risco ao desenvolvimento de CECO (FRANCESCHI *et al.*, 1999; STOJCEV *et al.*, 2013) mas os resultados de uma dieta inapropriada também surgem associados ao envelhecimento, não havendo evidências suficientes para ser considerado como um fator de risco para CECO em adultos jovens.

Por outro lado, estudos genéticos para CECO em pacientes idosos apresentam evidências indiretas para a deleção de genes supressores de tumor em certas regiões cromossômicas (FIELD *et al.*, 1995; ROWLEY *et al.*, 1996) e as mesmas anormalidades moleculares e genéticas também foram sugeridas para pacientes adultos jovens portadores de CECO (SCULLY *et al.*, 2000), associando características genéticas e familiares ao desenvolvimento do carcinoma.

2.3 CECO em adultos jovens

O CECO é incomum entre jovens adultos com até 40 anos de idade (MALLET *et al.*, 2009), com prevalência de 1 a 6% acometendo principalmente a língua (LEE *et al.*, 2009; PATEL *et al.*, 2011).

Em adultos jovens (< 40 anos de idade) a influência de fatores carcinogênicos, como álcool e tabaco, é bastante discutida. Alguns autores acreditam que estas substâncias também podem estar relacionadas com a etiologia do CECO em adultos jovens (OLIVER *et al.*, 2000; LLEWELLYN *et al.*, 2001). Mas existem casos em que muitos desses pacientes nunca fizeram uso destas substâncias, sendo que outros autores consideram que o tempo de exposição a esses agentes seria curto para induzir a transformação maligna (SANKARANARAYANAN *et al.*, 1989; BURZYNSKI *et al.*, 1992). Existe relato de associação entre histórico familiar de câncer e o risco de desenvolvimento da doença em adultos jovens, não estando este mesmo fator relacionado com o surgimento da doença em idosos (TOPORCOV *et al.*, 2015).

Alguns autores relataram também, que pacientes adultos jovens, apresentam uma forma mais agressiva da doença, com uma maior incidência de recorrência local ou envolvimento regional dos linfonodos após o tratamento e uma taxa de mortalidade mais elevada em comparação com pacientes idosos (LUND e HOWARD, 1990; SARKARIA e HARARI, 1994).

2.4 Alterações morfológicas do CECO

O CCEO é uma neoplasia maligna que tem origem no epitélio de revestimento da mucosa oral (NEVILLE *et al.*, 2009). Uma série de fases precedem o surgimento do CECO. Histopatologicamente, no epitélio oral normal um processo de hiperplasia celular histopatológica e benigna é iniciado, seguido por uma displasia e sequencialmente pelo carcinoma *in situ*, para finalmente ter início o CECO invasivo (SHAH *et al.*, 2011).

A presença de lesões potencialmente malignas pode preceder o surgimento do carcinoma. Leucoplasias e eritroplasias são as desordens potencialmente malignas mais relacionadas ao CECO, com uma taxa de transformação que varia de 0 a 20% em 1-30 anos, de acordo com o tipo de lesão (MISHRA *et al.*, 2005).

Desta forma é extremamente relevante o diagnóstico precoce do CECO bem como a identificação e tratamento adequado para as desordens potencialmente malignas, aumentando a sobrevida destes pacientes.

2.5 Características clínicas e histopatológicas do CECO

Clinicamente, a lesão mais comumente encontrada é uma lesão nodular constituída por úlcera persistente com endurecimento e infiltração periférica, podendo ou não estar associada à vegetações, manchas avermelhadas ou esbranquiçadas (MAJCHRZAK *et al.*, 2014). A localização predominante é a borda lateral de língua, lábio inferior e o assoalho oral (NEVILLE *et al.*, 2009).

Histopatologicamente é caracterizado pela presença de ilhas e cordões invasivos de células epiteliais com diferentes graus de pleomorfismo celular e nuclear (NEVILLE *et al.*, 2009). O tumor surge a partir de um epitélio de superfície displásico em que a ceratinização de células epiteliais escamosas com a formação variável de pérolas de ceratina associados a um padrão de crescimento invasivo são pré-requisitos para a gradação desses tumores. Os tumores bem diferenciados apresentam grandes ceratinócitos que lembram o epitélio escamoso normal e produzem abundante ceratina, pouca atipia celular e escassa atividade mitótica. Os tumores moderadamente diferenciados geralmente apresentam menos ceratinização e distinto pleomorfismo nuclear com maior atividade mitótica e mitoses aberrantes e, por fim, o CECO pobremente diferenciado apresenta predominantemente células imaturas com numerosas mitoses aberrantes e mínima ceratinização (CARDESA *et al.*, 2005).

2.6 A imunologia do envelhecimento

Os avanços tecnológicos, redução da taxa de mortalidade e fecundidade, dentre outros fatores associados, estão permitindo a crescente da população idosa, com um aumento da expectativa de vida a cada ano.

A expectativa de vida em 1980, no Brasil, era de 62,6 anos, em 2000 era de 70,5 anos e em 2014 de 74,9 anos de idade. Em 2050 esta expectativa é de 81,3 anos de idade, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE)(IBGE, 2010).

O sistema imune dos idosos é geralmente afetado por um declínio da função e eficácia, resultando num aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas e estados patológicos relacionados com a inflamação ou autoimunidade. Esta mudança global na imunidade é denominada imunossenescência. Os fatores individuais que contribuem para este acontecimento são diversos, devido à complexidade multifatorial do sistema imune (CARUSO *et al.*, 2009).

Em indivíduos idosos observa-se que o número de linfócitos TCD4+ e TCD8+, podem estar diminuídos e a capacidade funcional destas células apresentam-se alteradas (TRAILL *et al.*, 1985).

Eventos sequenciais permitem a atuação eficiente dos linfócitos T que se manifesta como ativação, diferenciação, apoptose, anergia e desenvolvimento de funções efetoras ou de memória. Todas essas manifestações são moduladas por subpopulações de células T, receptores co-estimulatórios, equilíbrio entre citocinas ou por células apresentadoras de antígenos (APC) como as CDs. Quando há uma ruptura nessa cascata de sinalização causada por mudanças fisiológicas como o envelhecimento, patológicas como o câncer ou ainda por doenças auto-imunes, existe uma alteração da resposta imune. Os indivíduos idosos estão mais sujeitos a essas alterações patológicas do sistema imune, soma-se a isso alterações inerentes à idade, o que resulta em um comprometimento importante das funções do sistema imunológico (CAMPISI, 2013).

2.7 Células dendríticas (CDs)

As CDs constituem um grupo heterogêneo de células, oriundas de progenitores hematopoiéticos da medula óssea. São APCs com capacidade para interagir com os linfócitos T e B e modular as suas respostas (REIS E SOUSA *et al.*, 1999).

As CDs são importantes na iniciação e regulação das respostas imunes. Estão presentes em quase todos os tecidos periféricos, incluindo pele e mucosa (STEINMAN e BANCHEREAU, 2007; STEINMAN e IDOYAGA, 2010). As CDs não somente ativam LT e LB, mas também células Natural Killers (NK) e produzem interferons (IFNs), estabelecendo uma conexão entre o sistema imune inato e adaptativo. A ativação (ou maturação) de CDs resulta em imunidade, uma vez que, dependendo da natureza do estímulo de ativação, as CDs podem induzir respostas imunes mediadas por LT helper 1 (LTH1) e LT helper 2 (LTH2) (LANZAVECCHIA e SALLUSTO, 2000). Em contraste, CDs inativas ou CDs recebendo estímulos inibitórios, tais como interleucina 10 (IL-10) e/ou corticosteróides, induzem tolerância imunológica via depleção de LT e proliferação de LTregs. Assim, a resposta imunológica é dependente do estado de ativação da CDs, sendo que as mCDs protegem o organismo de neoplasias ou patógenos, enquanto as imCDs induzem tolerância imunológica (ADEMA, 2009).

As CDs dos tecidos não linfáticos podem migrar para os órgãos linfóides pelas vias sanguínea e/ou linfática, sendo assim, capazes de estimular a resposta imune primária e secundária tanto nesses órgãos como nos tecidos periféricos (HART, 1997; REIS E SOUSA *et al.*, 1999).

A heterogeneidade das CDs é consequente dos seus diferentes estágios de maturação e das distintas linhagens celulares (KELLER, 2001). Através da corrente sanguínea as CDs migram para os tecidos periféricos, onde são capazes de fagocitar células e antígenos tumorais. Após esse processo de captura, elas migram para os linfonodos, e a medida que essa migração ocorre, passam por um complexo processo de maturação, o qual é dependente de inúmeras citocinas e moléculas de superfície. Ao atingir o estágio de célula madura, as CDs diminuem drasticamente sua capacidade fagocítica, porém, assumem o importante papel de ativação das células T naives, as quais diferenciam-se em células T efetoras e de memória. As células efetoras migram para o sítio tumoral primário para eliminar os antígenos, e as células de memória irão responder a um encontro subsequente (BANCHEREAU e STEINMAN, 1998; MARTIN-FONTECHA *et al.*, 2003; ABBAS *et al.*, 2010). Marcadores imunoistoquímicos específicos podem ser utilizados para evidenciar a presença de CDs nos tecidos.

Os anticorpos S100, CD1a e CD207 são marcadores para CDs imaturas. A S100 é uma proteína de baixo peso molecular e multifuncional, que possui função reguladora em vários processos celulares. A proteína S100 inibe a diferenciação e o acúmulo de células mielóides (CDs e macrófagos), contribuindo para o crescimento do tumor em respostas patológicas (DONATO *et al.*, 2013). Maior quantidade de CDs S100+ foi associada com uma menor taxa de metástase em CECO em lábio (REICHERT *et al.*, 2001). A CD1a é uma proteína humana codificada pelo gene CD1A que está estruturalmente relacionada com as proteínas do complexo maior de histocompatibilidade (MHC). Alta expressão de CDs CD1a+ foi encontrada em tumores de alto grau de diferenciação, quando comparado a tumores de médio e baixo grau (CHEN *et al.*, 2005). A langerina ou CD207 é um anticorpo monoclonal, sendo um marcador específico das CL (SEGUIER *et al.*, 2003). Estudos mostraram que há um maior número de CDs CD1a+ e CD207+ em CEC quando comparado com a epiderme sadia, sem a presença do carcinoma (CHEN *et al.*, 2005; SHEVCHUK *et al.*, 2014).

A molécula de superfície CD1a constitui o mais importante marcador imunoistoquímico na identificação das CDs no tecido epitelial. A expressão desse antígeno sobre as células precursoras monocíticas é induzida por citocinas, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), a interleucina-1a (IL-1a), a interleucina-6 (IL-6) e o Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Monócitos (GM-CSF) secretadas pelos ceratinócitos. A expressão da molécula CD1a manifesta-se desde a primeira etapa da transição da célula precursora para a Célula de Langerhans (CL) propriamente dita (LOMBARDI *et al.*, 1993).

Os marcadores que melhor identificam as CL são as glicoproteínas de superfície CD1, especialmente a CD1a, que parece ser exclusiva das referidas células e seus precursores,

em contraste com a proteína S-100 que identifica CL e células de origem neural (DIFRANCO *et al.*, 1985).

CDs maduras são caracterizadas por aumento na expressão de CD83 e CD208 (FAHRBACH *et al.*, 2007). CD83 é um membro da Superfamília de Imunoglobulinas (IgSF), consistindo de um único polipeptídeo de 187 aminoácidos cuja deficiência promove a redução na geração de células T CD4+, sugerindo que o CD83 regula a diferenciação de células T no timo (FUJIMOTO *et al.*, 2002). CD208 é uma proteína da membrana associada ao lisossomo-3 (LAMP-3), que pode ser encontrada no interstício de CDs e é secretada após a ativação e maturação destas células (MEYERHOLZ *et al.*, 2006). Um menor número de CDs positivas para CD208 (NI *et al.*, 2014) e CD83 (GONCALVES *et al.*, 2013) infiltradas no estroma tumoral, foi associado à presença de metástases em linfonodos em pacientes portadores de CECO.

3 ARTIGO

Periódico: Oral Oncology ISSN: 1368-8375

**DENDRITIC CELL SUBSETS IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA
AFFECTING YOUNG AND ELDERLY PATIENTS:
a comparative immunohistochemical study**

Tatiana Fernandes Araújo Almeida, Student DDS¹; Alfredo Ribeiro da Silva, PhD²; Fernando Chahud, PhD²; Saulo Gabriel Moreira Falci, PhD¹; Jorge Esquiche León, PhD³; Ana Terezinha Marques Mesquita, PhD¹.

¹ Departamento de Odontologia, Clínica de Estomatologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, Minas Gerais - Brasil.

² Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo - Brazil.

³ Departamento de Estomatologia, Saúde Pública e Odontologia Forense, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo - Brazil.

***Autor correspondente:** Tatiana Fernandes Araújo Almeida, Departamento de Odontologia, Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Rua da Glória 187, CEP: 39100-000, Diamantina - Minas Gerais, Brasil. E-mail: tatiana.fernandes@hotmail.com. Tel: 00-55-38-35326063; Fax: 00-55-38-35321200.

Número de palavras: 3454

CONFLITO DE INTERESSE

Nada a declarar.

RESUMO

Objetivo: Avaliar através da imunohistoquímica, a diferença na quantificação tissular dos subgrupos de CDs, imaturas (imCDs) e maduras (mCDs), associada à idade, em espécimes de biópsias de Carcinoma Espinocelular Oral (CECO).

Materiais e Métodos: Amostras de CECO de 12 pacientes (< 40 anos de idade) (G1), 15 pacientes (≥ 40 até < 60 anos de idade) (G2) e 14 pacientes (≥ 60 anos de idade) (G3) foram avaliadas através de imunomarcadores para imCDs (S100, CD1a e CD207) e mCDs (CD83 e CD208). A frequência e localização das CDs foram avaliadas e comparadas entre os grupos nas regiões intratumoral (intertumoral e estromal) e extratumoral.

Resultados: No geral, imCDs foram significativamente mais frequentes que mCDs em todos os grupos. ImCDs e mCDs mostraram preferencialmente localização intratumoral e extratumoral respectivamente. Comparando G1 versus G2 / G3 foi observado um significativo menor número de mCDs em G1. Na comparação de G1 em relação a G2 ou G3 houve um número significativamente menor de ambas, imCDs e mCDs.

Conclusão: Nossos resultados mostram que existe uma menor quantidade de imCDs e mCDs em CECO afetando pacientes jovens em comparação com idosos, sugerindo um comprometimento da resposta imune antitumoral em G1e permitindo a progressão do tumor.

Palavras chave: Carcinoma Espinocelular; Câncer de boca; Imunossenescência; Células Dendríticas; Imuno-Histoquímica.

ABSTRACT

Objectives: The aim of the current study was to evaluate the immature (imDC) and mature DCs (mDC) immunoprofile differences in oral squamous cell carcinoma (OSCC) affecting young and elderly patients.

Materials and methods: OSCC samples from 12 patients (aged < 40) (G1); 15 patients (aged ≥ 40 to < 60) (G2) and 14 patients (aged ≥ 60) (G3) were assessed through the imDC (S100, CD1a, CD207) and mDC (CD83 and CD208) immunomarkers. The frequency and localization of immunostained DCs were analyzed in intratumoral (intranestal and/or extranestal) and extratumoral areas and statistically compared.

Results: Overall, imDCs than mDCs were significantly more frequent in all groups. ImDCs and mDCs showed preferential intratumoral and extratumoral localization, respectively. Comparing G1 than G2/G3 showed a significant lesser number of mDCs. G1 versus G2 or G3 there was a significantly lower number of both imDCs and mDCs.

Conclusion: Our results show a lower number of both imDCs and mDCs in OSCC affecting younger than elderly patients, suggesting impairment of an effective antitumor immune response in G1 and enabling tumor progression, showing a gradual establishment of the antitumor immune response mediated by DCs according to the age, but with defects in quality.

Keywords: Squamous Cell Carcinoma; Mouth Neoplasms; Dendritic Cells; Immunosenescence; Immunohistochemistry.

INTRODUÇÃO

As células dendríticas (CD) constituem uma população heterogênea de células, consideradas apresentadoras de antígenos mais potentes e indispensáveis para a resposta imune [1]. Possuem alta capacidade fagocítica quando imaturas (imCDs) e elevada produção de citocinas quando maduras (mCDs), atuando na manutenção do equilíbrio entre a tolerância e a imunidade [2]. Estão presentes nos tecidos em sua forma imatura e após a captura de um antígeno elas passam por um processo de maturação, migram para os linfonodos e apresentam o antígeno a linfócitos específicos [3].

O Carcinoma Espinocelular Oral (CECO) em pacientes adultos jovens (< 40 anos de idade) é raro e de etiologia controversa, uma vez que estes pacientes, muitas vezes, não foram expostos por tempo prolongado, aos principais fatores de risco para o desenvolvimento do tumor, que são o tabagismo e o etilismo [4]. Desta forma as CDs vêm atraindo a atenção científica e clínica devido ao seu papel fundamental na imunidade antitumoral e por possuírem um potencial para serem utilizadas como adjuvantes em vacinas para o tratamento de tumores [5].

Evidências científicas têm sido levantadas sobre a possível participação das CDs na indução de respostas imunes em várias neoplasias [6, 7]. Uma menor presença de CDs tissulares no CECO é considerada uma característica desfavorável à resposta antitumoral [8].

Os anticorpos S100, CD1a e CD207 são marcadores para imCDs. Uma elevada quantidade de CDs S100+, CD1a+ e CD207+, em região extratumoral, foi correlacionada com uma menor taxa de metástase em pacientes com CECO [6-9]. Já os anticorpos CD83 e CD208 são marcadores para mCDs. Estudos observaram que uma pequena quantidade de CDs CD83+ e CD208+ em CECO foi relacionado com a presença de metástase nos linfonodos, levando à hipótese de que a ativação deficiente das CDs associadas a este tumor possa resultar em respostas imunocitotóxicas comprometidas [8, 10, 11].

Há um reconhecimento crescente de que processos inflamatórios podem propiciar o desenvolvimento e progressão tumoral, através de citocinas produzidas por células tumorais e por células da imunidade inata (CDs e macrófagos) [12]. Este processo inflamatório desencadeia uma falha na estimulação da imunidade mediada por CDs e contribui com a progressão tumoral via supressão ativa da imunidade adaptativa (linfócitos) [13]. Devido a isso, pesquisadores têm se preocupado em estudar as células do sistema imune, receptores celulares,

fatores de crescimento e citocinas inflamatórias, na tentativa de elucidar os mecanismos da tolerância imunológica envolvidos na patogênese do CECO [12, 14, 15].

Ainda não existem estudos correlacionando as CDs com a imunossenescência em CECO. Sendo então de extrema importância o entendimento da distribuição e quantificação das imCDs e mCDs nesta doença, a fim de adicionar conhecimento para elucidar o papel destas células no desenvolvimento do tumor em adultos jovens, bem como na terapia antitumoral. Neste contexto, o objetivo deste trabalho é analisar comparativamente a presença e localização tissular dos subgrupos de imCDs e mCDs em CECO de indivíduos em três diferentes faixas etárias.

METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) (Número do parecer: 1.337.799).

Amostra

Este estudo retrospectivo foi realizado utilizando-se espécimes de biópsias de CECO catalogados e armazenados em blocos de parafina. Os dados relacionados aos pacientes e às amostras foram obtidos no Laboratório de Patologia do Departamento de Odontologia da UFVJM e no Departamento de Estomatologia, Saúde Pública e Odontologia Forense, da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FORP/USP), Brasil.

Foram selecionados espécimes de pacientes, com diagnóstico de CECO, em três faixas etárias: Grupo 1 (G1), < 40 anos de idade (n = 12 homens; $36,3 \pm 2,6$); grupo 2 (G2), ≥ 40 até < 60 anos de idade (n = 15 homens; $49,3 \pm 5,4$) e grupo 3 (G3), ≥ 60 anos de idade (n = 14; 12 homens; 2 mulheres; $67,5 \pm 6,4$). O diagnóstico de todos os pacientes foi confirmado através da avaliação dos prontuários clínicos e análise histopatológica de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E) realizado por dois patologistas (JEL e ATMM) de forma independente.

De acordo com a localização anatômica, foi observada a seguinte distribuição: G1, assoalho de boca (3), palato mole (3) e língua (6); G2, assoalho de boca (4), palato duro (1),

palato mole (2), língua (4), rebordo alveolar (1) e mucosa jugal (3); G3, assoalho de boca (1), língua (5), mucosa labial (5) e mucosa jugal (3).

Nenhum paciente foi submetido à terapia imunomodulatória, quimioterapia ou radioterapia previamente à realização da cirurgia.

Realizou-se o cálculo do tamanho amostral para diferença entre duas médias, admitindo-se um nível de confiança de 95% e desvio padrão de 7.1 [16]. Uma diferença de oito pontos ou mais na média de CDs por caso selecionado foi considerada estatisticamente significativa. Para tanto, foram necessários 12 blocos com espécimes de biópsias para cada grupo. Acrescentou-se três blocos ao cálculo para compensar eventuais perdas. Um total de 41 blocos foram obtidos com material suficiente para a realização da análise: G1, pacientes < 40 anos de idade (n = 12); G2, pacientes ≥ 40 até < 60 anos de idade (n = 15) e G3, pacientes ≥ 60 anos de idade (n = 14).

Classificação morfológica

Cortes de 5 µm de espessura foram obtidos a partir dos espécimes, os quais foram desparafinizados e marcados com hematoxilina e eosina (H&E) para exame histopatológico. A análise morfológica foi realizada por um patologista oral (JEL) sem conhecimento prévio das características demográficas e clínicas relativas às amostras. O grau de diferenciação celular do CECO nas amostras [17] foi classificado de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pobremente diferenciado.

Intensidade do infiltrado celular inflamatório

A intensidade do infiltrado celular inflamatório (leve, moderado e intenso), preferencialmente quantificado no estroma dos espécimes de CECO, foi analisada em 10 campos em maior aumento (400x). Inflamação leve foi determinada quando a maioria dos campos (> 7 campos) apresentaram menos de 35% de células inflamatórias; inflamação moderada quando a maioria dos campos (> 7 campos) apresentaram de 35% a 70% de células inflamatórias; e inflamação intensa quando a maioria dos campos (> 7 campos) apresentaram mais de 70% de células inflamatórias [18].

Reação de imunoistoquímica

Cortes na espessura de 3µm foram obtidos de todos os espécimes de biópsia dos casos de CECO e montados em lâminas silanizadas.

Para a reação de imunoistoquímica os cortes foram hidratados e tratados com água oxigenada. Para os anticorpos S100, CD1a, CD83 e CD208, a recuperação antigênica foi realizada por meio de fervura em panela de pressão (Pascal, Dako), com solução de ácido cítrico

10mM/pH 6,0 por três minutos, deixando esfriar até atingir a temperatura ambiente. Para o anticorpo CD207, a recuperação antigênica foi realizada utilizando panela de pressão elétrica, com solução de recuperação código S2367 (Dako, Glostrup, Denmark) pH 9,0 por 15 minutos, deixando esfriar até atingir a temperatura ambiente. Posteriormente os anticorpos primários diluídos, S100 (policlonal, diluição 1:3000; Leica Biosystems, Leica Biosystems Newcastle, Ltd., Newcastle-upon-Tyne, England), CD1a (clone 010, diluição 1:400, Dako Cytomation, Glostrup, Denmark), CD207 (clone 12D6, diluição 1:200; Monosan, Uden, The Netherlands), CD83 (clone 1H4b, diluição 1:100; Leica Biosystems) e CD208 (clone 1010E1.01, diluição 1:500; Dendritics, Lyon, France) foram incorporado aos cortes e as lâminas foram incubadas, em câmara úmida por 18 horas a 4°C.

Em seguida as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário biotilado LINK universal (LSAB + *System-HRP, Mouse/Rabbit*, Dako) por 30 minutos a 37°C, seguido de 3 lavagens em tampão PBS. Após esta etapa, as lâminas foram incubadas com *Streptavidin-HRP* (LSAB) por mais 30 minutos, e reveladas com 20 µL do substrato DAB-*Cromogen* (3,3 diaminobenzidina, solução – DAB, Dako), diluído em 1 mL de substrato buffer (*ImidazoleHCL* buffer, pH 7,5) por 3 a 5 minutos a 37°C, seguida por lavagens em água corrente e destilada. As lâminas foram contra coradas com Hematoxilina de Carazzi lavadas em água corrente e destilada. Os cortes foram desidratados em 3 banhos de álcool absoluto, diafanizados em 3 banhos de xilol e montados com lamínulas e resina sintética (*Entellan*, Merck).

Um controle negativo, do mesmo tecido analisado, foi incluído em cada série de reações imunoistoquímicas, com a omissão do anticorpo primário.

Análise das reações de imunoistoquímica

A imunoexpressão foi avaliada, utilizando-se representação de imagem por meio de um sistema computadorizado, constituído por microscópio de luz (Leica DM500), adaptado a uma câmera de alta resolução (Leica ICC50) e monitor de vídeo colorido. As imagens foram obtidas utilizando-se o programa Leica IM50 *Imagem Managem* e o processamento das mesmas foi realizado através do programa Leica QWin *Image Processing and Analysis System*. Foi considerada marcação positiva aquela que apresentou coloração acastanhada, conferida pelo cromógeno DAB. Após a avaliação das lâminas em aumento de 100x, áreas com maior densidade de imunomarcção foram selecionadas para a quantificação das CDs.

Quantificação das células dendríticas

As CDs foram identificadas com base na membrana celular e / ou coloração citoplasmática e morfologia apropriada. A quantificação das CDs foi realizada, após a captura

de imagens, analisando-se 10 campos em cada lâmina com aumento de 200x. Foram fotografados cinco campos em localização extratumoral e cinco campos intratumorais. Nas imagens intratumorais as CDs positivas nas ilhas tumorais (localização intertumoral) e àquelas no estroma (localização estromal) foram calculadas separadamente. Foram capturadas um total de 2050 imagens correspondentes a 10 imagens para cada um dos cinco marcadores (S100, CD1a, CD207, CD83 e CD208) em todos os 41 casos.

A contagem das CDs foi realizada de forma manual com o auxílio do programa *Image J* (Scion Corporation, E.U.A.). Em seguida, a quantidade de CDs para cada localização (extratumoral, intertumoral e estromal) foi somada, sendo calculada a média de CDs por caso selecionado. A localização intratumoral correspondeu à somatória das CDs intertumerais e estromais, enquanto que a quantidade total de CDs foi dada pela somatória das CDs extratumorais e intratumorais.

Análise Estatística

Os dados foram analisados com o *software* SPSS versão 20.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). A normalidade da amostra foi avaliada através do teste de Shapiro-Wilk. Em amostras com distribuição normal, foram utilizados os testes ANOVA e T de Student. Para as amostras com distribuição não normal foram utilizados os testes Kruskal Wallis e Mann Whitney. Para todos os testes estatísticos foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Este estudo envolveu 41 casos de CECO, divididos em três grupos de acordo com a faixa etária: G1: < 40 anos de idade ($n = 12$; $36,3 \pm 2,6$); G2: ≥ 40 até < 60 anos de idade ($n = 15$; $49,3 \pm 5,4$) e G3: ≥ 60 anos de idade ($n = 14$; $67,5 \pm 6,4$). Dos casos avaliados, 95% foram correspondentes a indivíduos do sexo masculino. A intensidade do infiltrado inflamatório e o grau histológico dos casos estão apresentados na tabela 1.

As CDs foram quantificadas nas localizações extratumoral, intertumoral (CD dentro das ilhas tumorais) e estromal (CDs no estroma, entre as ilhas tumorais) (Figura 1).

Em análise intragrupo, as imCDs foram observadas em maior quantidade em localização intratumoral que extratumoral. Esta diferença foi significativa nos casos de CECO de pacientes idosos (G3). Já com relação às mCDs houve uma inversão, com uma maior média de células extratumorais. Com relação às localizações intertumoral e estromal foi observado diferença estatística entre elas, com maior quantidade estromal, para células CD83+, em G1 e G2 e CD208+ em G3 (Figura 2).

Na análise entre grupos dos casos de CECO agrupados em duas faixas etárias: G1 < 40 anos versus G2/G3 \geq 40 anos de idade, foram observadas menores quantidade de mCDs em G1, sem diferença estatística para imCDs (Tabela 2).

Na análise dos casos de CECO distribuídos em 3 faixas etárias, G1 versus G2 versus G3, foram observadas menores quantidades de ambas, imCDs e mCDs, nos pacientes adultos jovens (Tabela 3).

Com relação às imCDs, na localização intratumoral houve uma menor quantidade de CDs S100+ e CD1a+ em adultos jovens quando comparado aos idosos (G3) ($p = 0,046$ e $p = 0,035$ respectivamente). Para a localização intertumoral houve diferença significativa entre os três grupos com relação às células CD1a+ ($p = 0,003$) e entre G1 e G3 para CD207+ ($p = 0,023$) (Tabela 4).

Na marcação de mCDs, observou-se uma quantidade mais escassa de células nos tecidos quando comparado aos marcadores para imCDs em todos os grupos (Figura 3). As células CD83+ se fizeram mais presentes em G3, com diferença significativa, entre G1 e G3, para todas as localizações (extratumoral, intertumoral, estromal, intratumoral e total) e entre G2 e G3 para a localização intratumoral (Tabela 4). Células CD208+ foram raras de serem encontradas nos tecidos com uma maior média total de 4,3 células em G3 (Figura 3). Uma menor quantidade de CDs CD208+ foram observadas em G1 quando comparado a G3 nas localizações extratumoral, estromal, intratumoral e total, assim como entre G2 e G3 para as localizações extratumoral e total (Tabela 4).

DISCUSSÃO

As CDs desempenham um papel fundamental na imunidade tumoral, principalmente em virtude da sua capacidade de apresentação de antígenos tumorais às células T presentes nos linfonodos, sendo estas indispensáveis para desencadear uma resposta antitumoral efetiva [16].

Embora sabe-se que as CDs são importantes na estimulação e regulação da resposta imune antitumoral, os seus mecanismos de controle ainda não são compreendidos, pois os estudos já realizados investigaram um conjunto restrito de populações de CDs desconsiderando a diferença etária entre os portadores do tumor. Neste contexto, o presente estudo avaliou comparativamente a presença de subgrupos de imCDs e mCDs, em lesões de CECO de

pacientes em três faixas etárias: menores de 40 anos (G1), entre 40 a menores de 60 anos (G2) e maiores ou iguais a 60 anos de idade (G3).

Um grande número de anticorpos é utilizado para a marcação de CDs, incluindo marcadores de proteínas como S100, CD1a, CD207, CD83, CD208, CD80, CD11c, CD34, CD86, HLA-DR [3] entre outros, com diferentes graus de sensibilidade e especificidade. No entanto, estudos em CECO vêm utilizando apenas dois ou três marcadores [8, 19] para a marcação de imCDs ou mCDs. Desta forma, no presente trabalho, optou-se por utilizar os anticorpos S100, CD1a, CD207, CD83 e CD208 para identificar imCDs e mCDs, uma vez que as propriedades biológicas destas proteínas em CDs foram caracterizadas, possibilitando uma investigação mais completa dos imunomarcadores para CDs no CECO.

A primeira etapa da resposta antitumoral através das CDs, está relacionada à captura de antígenos por imCDs [5]. No entanto uma menor quantidade de CDs S100+, CD1a+ e CD207+ em adultos jovens sugere maior incapacidade de infiltração destas células no tumor e uma deficiência na captura de antígenos, corroborando com a possibilidade de uma manifestação mais agressiva do CECO nestes pacientes, como descrito por alguns autores [20, 21].

As imCDs foram capazes de adentrar o tumor, mas foram deficientes para a etapa de maturação em todos os grupos. O pequeno número de células maduras CD83+ e CD208+, comparado à grande quantidade de imCDs S100+, CD1a+ e CD207+ dentro dos tumores indicam que as células imaturas não estão tornando-se maduras *in situ*. Resultados semelhantes já foram relatados para a imunomarcção com CD207 e CD208 em CECO [8].

O desencadeamento da resposta antitumoral depende do reconhecimento de antígenos tumorais capturados pelas CDs e em seguida apresentados às células T para uma resposta tumor específica. Os resultados encontrados no presente estudo, evidenciaram que adultos jovens, menores de 40 anos, apresentam uma menor quantidade de mCDs, CD83+ e CD208+, intra e extratumoral, quando comparado com pacientes idosos. Estes dados indicam que em adultos jovens a maturação das CDs *in situ* é ainda menor quando comparado aos idosos, sugerindo uma pior resposta antitumoral e um possível pior prognóstico [22, 23].

O processo de envelhecimento está associado com múltiplas mudanças no sistema imune dos indivíduos, incluindo uma diminuição do número de CDs de origem plasmocitóide [24] e mielóide no sangue e nos tecidos, uma menor quantidade de imCDs e uma alteração nos níveis de citocinas que afetam a maturação de CDs [25]. Desta forma, tratando-se da mesma enfermidade, ou seja, o CECO, esperava-se encontrar uma maior quantidade de CDs em adultos jovens, uma vez que estes não passaram por um longo processo de envelhecimento. Todavia os

resultados mostraram uma menor presença de mCDs em CECO de adultos jovens, comparado aos idosos, levantando o questionamento de um possível processo de imunossenescência precoce nestes indivíduos, ainda mais grave do que a imunossenescência nos idosos com CECO. Este resultado agrega uma informação relevante no estudo dos fatores de risco para o CECO em adultos jovens, uma vez que este ponto vem sendo amplamente discutido [26]. Além disso, estes achados sugerem que indivíduos adultos jovens em relação a pacientes idosos portadores de CECO, apresentam uma alteração celular, como descrito por Santos-Silva e et al., [27], que demonstraram uma alta instabilidade genômica com maior incidência de anormalidades na ploidia do DNA em CEC de língua.

Na comparação intragrupos foi observada uma maior quantidade de imCDs intratumorais S100+, CD1a+ e CD207+ em comparação com a quantidade extratumoral em idosos, comprovando que estas células conseguem se infiltrar no tumor e possuem acesso às células neoplásicas, da mesma forma que já foi observado em CEC em língua [16, 28]. Este fato incute que a disfunção da resposta imune não está relacionada ao recrutamento das CDs mas sim à incapacidade das células recrutadas de realizar uma resposta imune efetiva.

A avaliação das localizações estromal e intertumoral permite verificar se as CDs estão presentes no interior das ilhas tumorais, com maior proximidade às células pleomórficas. Interessantemente, os resultados demonstraram uma significativa maior quantidade de CDs CD83+ no estroma tumoral do que nas ilhas tumorais em pacientes do grupo menores de 40 anos e do grupo de 40 a menores de 60 anos de idade, resultado este que não se repetiu para o grupo de idosos. Esta situação suscita que as CDs estariam mais infiltradas e próximas às células neoplásicas nos casos de CECO de pacientes maiores de 60 anos de idade. Resultados semelhantes para CDs CD208+ foram descritos por Ni et al. [10], mas não foi realizada distinção de acordo com a idade dos pacientes.

Alguns estudos dos fenótipos de CDs nos cânceres em geral apresentam similaridades com os resultados do presente trabalho, incluindo a presença de células CD1a+, CD207+ em tumores primários em câncer de pele [29], tireoide [30] e intestino [31], assim como a presença de pequenas quantidades de mCDs CD208+ e CD83+ em câncer de pele e cólon [32, 33].

O número de CDs infiltradas nos tumores é considerado de extrema importância para o prognóstico dos pacientes com CECO. Diversos trabalhos associam a presença das CDs com um melhor prognóstico e sobrevida, sendo que uma menor quantidade de CDs foi observada em casos que apresentaram metástase para os linfonodos [8, 16]. Goldman et al. [16]

concluíram que a presença de CDs CD1a+ é mais importante na imunidade antitumoral do que CDs S100+. No presente estudo foi observada uma maior quantidade de CDs CD1a+ e CD207+ nas ilhas tumorais em pacientes idosos em comparação com adultos jovens, bem como uma maior quantidade de CDs S100+ intratumoral, CDs CD83+ e CDs CD208+ totais. Nesta perspectiva é sugerido um pior prognóstico e menor sobrevida aos portadores de CECO adultos jovens em comparação com idosos, já descrito na literatura através da avaliação clínica dos pacientes [34, 35]. Portanto é de extrema importância o diagnóstico precoce das lesões, exigindo um exame clínico minucioso por parte dos cirurgiões dentistas e o acompanhamento das lesões potencialmente malignas, bem como a orientação dos pacientes quanto à presença de hábitos deletérios. Apesar de incomum em adultos jovens, o CECO deve ser sempre considerado no diagnóstico diferencial de ulcerações persistentes, eritroplasias, leucoplasias e eritroleucoplasias, principalmente nos locais de maior incidência, como língua e assoalho de boca.

Assim como as CDs, os miofibroblastos vem sendo relacionados a um pior prognóstico e sobrevida do portador de CEC [36], mas em contrapartida com as CDs, um estudo recente não encontrou alteração na quantificação de miofibroblastos entre adultos jovens e idosos [37].

A investigação da presença de CDs bem como sua atuação na resposta antitumoral em CECO vem sendo amplamente discutida, até mesmo na imunoterapia do câncer [5], mas os trabalhos já realizados, comparam o CEC com a mucosa saudável [10] ou lesões potencialmente malignas [19], sendo que até o presente momento não haviam respostas quanto à comparação de imCDs e mCDs entre adultos jovens e idosos.

Características clínicas, demográficas e patológicas do CECO em adultos jovens vem sendo levantadas em diversos estudos, nos quais são realizadas comparações entre indivíduos menores e maiores de 40 ou 45 anos de idade e não entre adultos jovens e idosos [35, 38, 39]. A análise dos casos do presente estudo em dois grupos, menores e maiores de 40 anos de idade, revelou que a omissão da faixa etária intermediária, de 40 a menores de 60 anos de idade, acarreta em resultados distintos com relação aos subgrupos de CDs, o que suscita uma necessidade de maior cautela por parte dos pesquisadores em relação ao delineamento dos trabalhos e distribuição das faixas etárias.

Nossos resultados mostram que existe uma menor quantidade de imCDs e mCDs em CECO afetando pacientes jovens em comparação com idosos, sugerindo um comprometimento da resposta imune antitumoral em adultos jovens, permitindo a progressão do tumor. Estes resultados sugerem o estabelecimento gradual da resposta imune antitumoral

mediada por CDs de acordo com a idade, mas com defeitos na qualidade. Novos estudos devem ser realizados para a investigação de outras células do sistema imune, tais como, macrófagos, células T reguladoras e células T citotóxicas, a fim de esclarecer o envolvimento de outros mecanismos na etiologia e patogênese da doença.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

REFERÊNCIAS

- [1] Reis e Sousa C, Sher A, Kaye P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. *Current opinion in immunology*. 1999; 11:392-9.
- [2] Lanzavecchia A, Sallusto F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. *Science (New York, NY)*. 2000; 290:92-7.
- [3] Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998; 392:245-52.
- [4] Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer*. 2007; 110:1429-35.
- [5] Palucka K, Banchereau J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. *Nature reviews Cancer*. 2012; 12:265-77.
- [6] Wei N, Tahan SR. S100+ cell response to squamous cell carcinoma of the lip: inverse correlation with metastasis. *Journal of cutaneous pathology*. 1998; 25:463-8.
- [7] Reichert TE, Scheuer C, Day R, Wagner W, Whiteside TL. The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. *Cancer*. 2001; 91:2136-47.
- [8] O'Donnell RK, Mick R, Feldman M, Hino S, Wang Y, Brose MS, et al. Distribution of dendritic cell subtypes in primary oral squamous cell carcinoma is inconsistent with a functional response. *Cancer letters*. 2007; 255:145-52.
- [9] Kikuchi K, Kusama K, Taguchi K, Ishikawa F, Okamoto M, Shimada J, et al. Dendritic cells in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Anticancer research*. 2002; 22:545-57.
- [10] Ni YH, Huang XF, Ding L, Wang ZY, Hu QG, Hou YY. Accumulation of CD208 (+) mature dendritic cells does not correlate with survival time in oral squamous cell carcinoma patients. *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 2014; 72:2178-85.
- [11] Goncalves AS, Costa NL, Arantes DA, de Cassia Goncalves Alencar R, Silva TA, Batista AC. Immune response in cervical lymph nodes from patients with primary oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2013; 42:535-40.
- [12] Rao SK, Pavicevic Z, Du Z, Kim JG, Fan M, Jiao Y, et al. Pro-inflammatory genes as

biomarkers and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma. *The Journal of biological chemistry*. 2010; 285:32512-21.

[13] Muller AJ, Sharma MD, Chandler PR, Duhadaway JB, Everhart ME, Johnson BA, 3rd, et al. Chronic inflammation that facilitates tumor progression creates local immune suppression by inducing indoleamine 2,3 dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008; 105:17073-8.

[14] Lederle W, Depner S, Schnur S, Obermueller E, Catone N, Just A, et al. IL-6 promotes malignant growth of skin SCCs by regulating a network of autocrine and paracrine cytokines. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2011; 128:2803-14.

[15] Chatzistamou I, Rodriguez J, Jouffroy T, Girod A, Point D, Sklavounou A, et al. Prognostic significance of tumor shape and stromal chronic inflammatory infiltration in squamous cell carcinomas of the oral tongue. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2010; 39:667-71.

[16] Goldman SA, Baker E, Weyant RJ, Clarke MR, Myers JN, Lotze MT. Peritumoral CD1a-positive dendritic cells are associated with improved survival in patients with tongue carcinoma.

Archives of otolaryngology--head & neck surgery. 1998; 124:641 -6.

[17] Barnes L, Eveson JW, P. R, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.

[18] Costa NL, Oton-Leite AF, Cheim-Junior AP, Alencar Rde C, Bittar GO, Silva TA, et al. Density and migration of mast cells in lip squamous cell carcinoma and actinic cheilitis. *Histology and histopathology*. 2009; 24:457-65.

[19] Gomes JO, de Vasconcelos Carvalho M, Fonseca FP, Gondak RO, Lopes MA, Vargas PA. CD1a+ and CD83+ Langerhans cells are reduced in lower lip squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2015.

[20] Lund VJ, Howard DJ. Head and neck cancer in the young: a prognostic conundrum? *The Journal of laryngology and otology*. 1990; 104:544-8.

[21] Sankaranarayanan R, Mohideen MN, Nair MK, Padmanabhan TK. Aetiology of oral cancer in patients less than or equal to 30 years of age. *British Journal of Cancer*. 1989; 59:439-40.

[22] Bragelmann J, Dagogo-Jack I, El Dinali M, Stricker T, Brown CD, Zuo Z, et al. Oral cavity tumors in younger patients show a poor prognosis and do not contain viral RNA. *Oral Oncol*. 2013; 49:525-33.

- [23] Hilly O, Shkedy Y, Hod R, Soudry E, Mizrachi A, Hamzany Y, et al. Carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: comparison with patients older than 60 years. *Oral Oncol.* 2013; 49:987-90.
- [24] Teig N, Moses D, Gieseler S, Schauer U. Age-related changes in human blood dendritic cell subpopulations. *Scandinavian journal of immunology.* 2002; 55:453-7.
- [25] Agrawal A, Sridharan A, Prakash S, Agrawal H. Dendritic cells and aging: consequences for autoimmunity. *Expert review of clinical immunology.* 2012; 8:73-80.
- [26] Toporcov TN, Znaor A, Zhang ZF, Yu GP, Winn DM, Wei Q, et al. Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *International journal of epidemiology.* 2015; 44:169-85.
- [27] Santos-Silva AR, Ribeiro AC, Soubhia AM, Miyahara GI, Carlos R, Speight PM, et al. High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study. *Histopathology.* 2011; 58:1127-35.
- [28] Costa NL, Goncalves AS, Martins AF, Arantes DA, Silva TA, Batista AC. Characterization of dendritic cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 2015.
- [29] Shevchuk Z, Filip A, Shevchuk V, Kashuba E. Number of Langerhans cells is decreased in premalignant keratosis and skin cancers. *Experimental oncology.* 2014; 36:34-7.
- [30] Hilly O, Rath-Wolfson L, Koren R, Mizrachi A, Hamzany Y, Bachar G, et al. CD1a-positive dendritic cell density predicts disease-free survival in papillary thyroid carcinoma. *Pathology, research and practice.* 2015; 211:652-6.
- [31] Amoueian S, Attaranzadeh A, Montazer M. Intratumoral CD68-, CD117-, CD56-, and CD1a-positive immune cells and the survival of Iranian patients with non-metastatic intestinal-type gastric carcinoma. *Pathology, research and practice.* 2015; 211:326-31.
- [32] Radej S, Rolinski J, Rawicz-Pruszyński K, Bury P, Borowski G, Furmaga J, et al. Immunomodelling Characteristics of Mature Dendritic Cells Stimulated by Colon Cancer Cells Lysates. *Polski przegląd chirurgiczny.* 2015; 87:71 -82.
- [33] Schwingshackl P, Obermoser G, Nguyen VA, Fritsch P, Sepp N, Romani N. Distribution and maturation of skin dendritic cell subsets in two forms of cutaneous T-cell lymphoma: mycosis fungoides and Sezary syndrome. *Acta dermato-venereologica.* 2012; 92:269-75.
- [34] Amsterdam JT, Strawitz JG. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in young adults. *Journal of surgical oncology.* 1982; 19:65-8.

- [35] Sarkaria JN, Harari PM. Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: rationale for aggressive therapy. *Head & neck*. 1994; 16:107-11.
- [36] Sobral LM, Bufalino A, Lopes MA, Graner E, Salo T, Coletta RD. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. *Oral Oncol*. 2011; 47:840-6.
- [37] Fonseca FP, Coletta RD, Azevedo MB, Prado Ribeiro AC, Pires Soubhia AM, Miyahara GI, et al. Stromal myofibroblasts in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients a multicenter collaborative study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology*. 2014; 118:483-9.
- [38] Pitman KT, Johnson JT, Wagner RL, Myers EN. Cancer of the tongue in patients less than forty. *Head & neck*. 2000; 22:297-302.
- [39] Siegelmann-Danieli N, Hanlon A, Ridge JA, Padmore R, Fein DA, Langer CJ. Oral tongue cancer in patients less than 45 years old: institutional experience and comparison with older patients. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1998; 16:745-53.

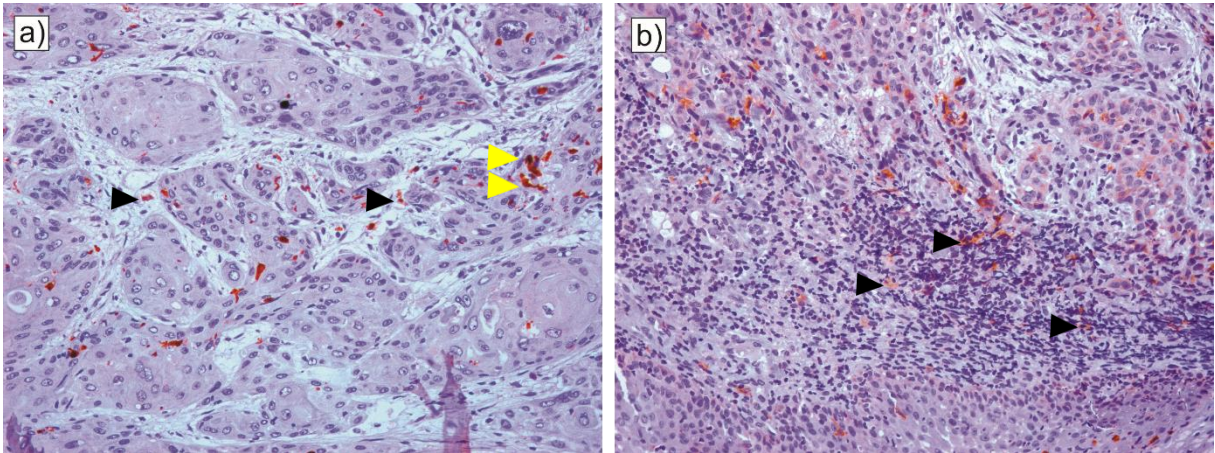
FIGURAS

Figura 1 - Imagem microscópica (a) das ilhas tumorais e células dendríticas (CDs) intertumerais (▶) e estromais (▶) e (b) de CDs extratumerais (▶). Imunoistoquímica, CD1a. Streptavidina, 200x.

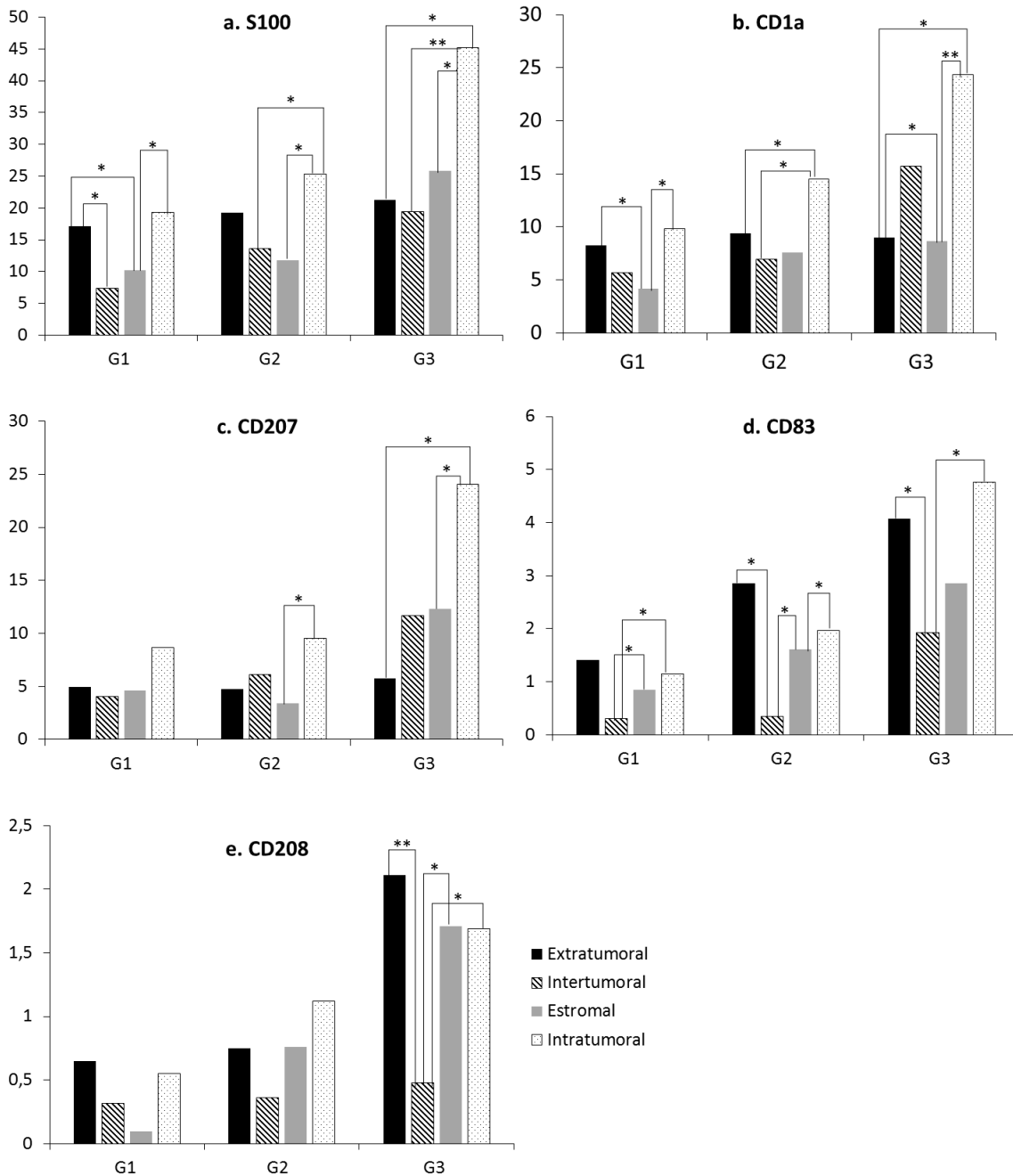


Figura 2 - Comparação intragrupos de imCDs e mCDs (G1 < 40 anos, n = 12; G2 ≥ 40 a < 60 anos, n = 15 e G3 ≥ 60 anos, n = 14) de acordo com a localização relacionada ao tumor. a, S100; b, CD1a; c, CD207; d, CD83; e, CD208. *p < 0,05. **p < 0,001 Teste U de Mann Whitney. Valores expressos em média.

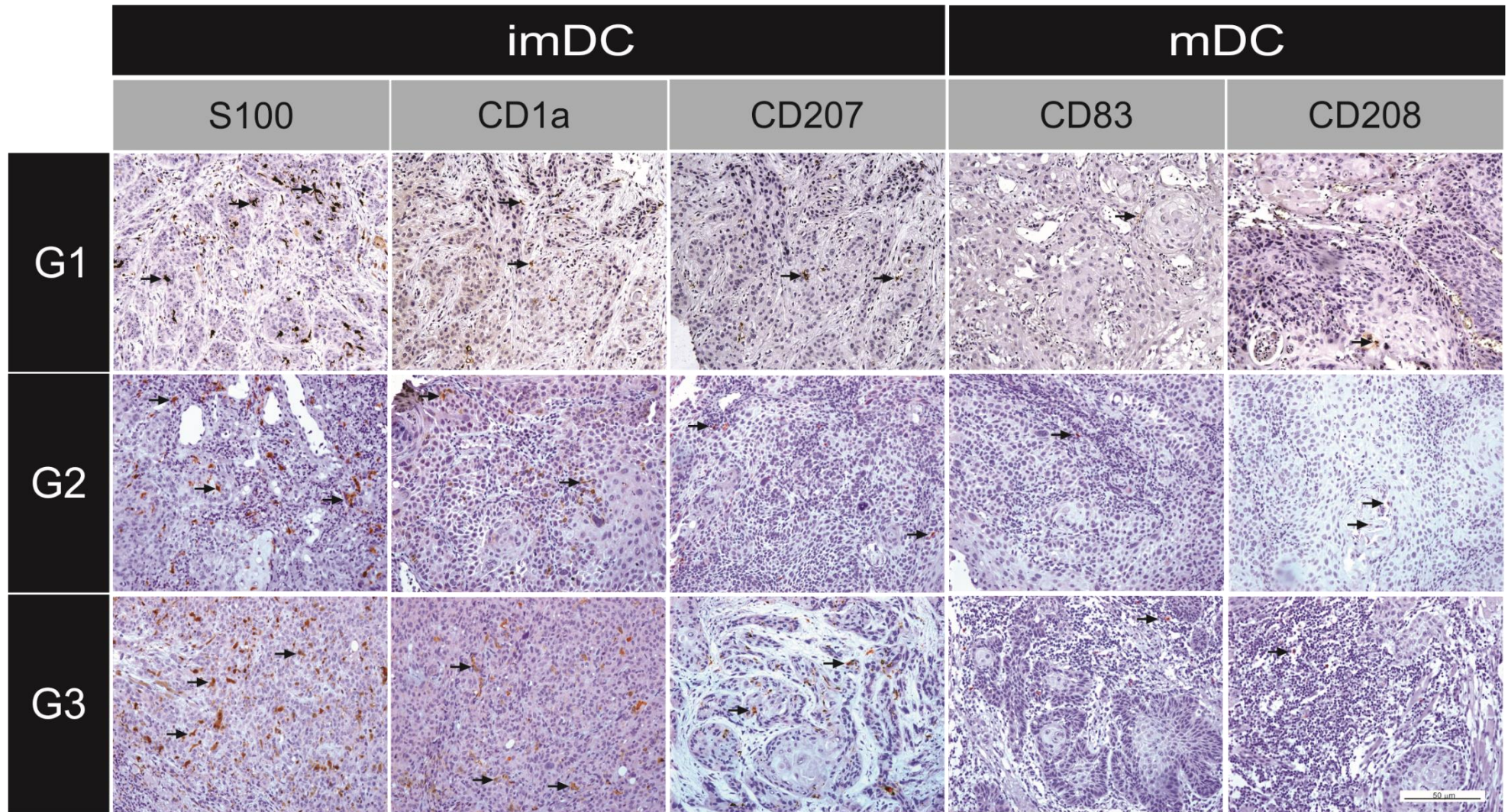


Figura 3 - Imagens da marcação imunistoquímica para imCDs (S100, CD1a e CD207) e mCDs (CD83 e CD208), mostrando escassa imunomarcação de mCDs para todos os grupos etários. Streptavidina, 200x.

TABELAS**Tabela 1** - Características dos pacientes com CECO e a associação das características clínico patológicas de acordo com os grupos.

Características	G1	G2	G3	P
Casos	12	15	14	
Sexo				
Masculino	12	15	14	0,193
Feminino	0	0	2	
Intensidade do infiltrado inflamatório				
Intenso	0	0	0	0,163
Moderado	0	1	3	
Leve	12	14	11	
Grau histológico				
Bem diferenciado	4	4	7	0,264
Moderadamente diferenciado	8	11	5	
Pobremente diferenciado	0	0	2	

Tabela 2 - Variáveis com diferença significativa para a comparação entre grupos: G1 (n = 12) versus G2/G3 (n = 29). Os dados estão expressos em média e desvio padrão (D.P.). Teste U de Mann Whitney.

Variável	Grupos - média (D.P.)		P (ANOVA)
	< 40 anos	> 40 anos	
CD83 extratumoral	1,41 (1,91)	3,40 (2,68)	0,025
CD83 estromal	0,85 (0,49)	2,16 (2,08)	0,038
CD83 intratumoral	1,15 (0,48)	3,22 (3,07)	0,027
CD83 Total	2,56 (2,19)	6,62 (4,64)	0,006
CD208 estromal	0,10 (0,16)	1,18 (1,53)	0,020
CD208 intratumoral	0,55 (0,79)	1,37 (1,28)	0,046
CD208 Total	1,20 (1,52)	2,96 (2,32)	0,020

Tabela 3 - Análise de variância para a quantificação de imCDs (S100+, CD1a+, CD207+) e mCDs (CD83+, CD208+) em CECO nos grupos G1, G2 e G3. Os dados estão expressos em média e desvio padrão (D.P.). Teste ANOVA.

Variável	Grupos - média (D.P.)			P (ANOVA)
	G1 < 40 anos	G2 40 a < 60 anos	G3 ≥ 60 anos	
imCDs	27,47 (18,14) ^a	42,12 (38,71) ^a	39,03 (22,61) ^b	0,013*
mCDs	1,88 (1,97) ^a	3,74 (3,83) ^a	6,08 (4,07) ^b	0,001*

Médias com letras diferentes apresentam diferença estatística de acordo com o teste de Tuckey ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Análise de variância das variáveis com diferença significativa na comparação entre grupos: G1 (n = 12), G2 (n = 15) e G3 (n = 14). Os dados estão expressos em média e desvio padrão (D.P.). Teste ANOVA.

Variável	Grupos - média (D.P.)			P (ANOVA)
	G1 < 40 anos	G2 40 a < 60 anos	G3 ≥ 60 anos	
S100 intratumoral	19,25(10,73) ^a	25,38 (27,81)	45,19 (34,08) ^b	0,046
CD1a intertumoral	5,68 (5,73) ^a	6,97 (5,95) ^b	15,68 (10,53) ^c	0,003
CD1a intratumoral	9,85 (9,10) ^a	14,54 (9,37)	24,33 (20,30) ^b	0,035
CD207 intertumoral	4,07 (3,77) ^a	6,12 (5,61)	11,68 (9,88) ^b	0,023
CD83 extratumoral	1,41 (1,91) ^a	2,86 (2,54)	4,07 (2,82) ^b	0,037
CD83 intertumoral	0,30 (0,41) ^a	0,35 (0,54)	1,92 (3,15) ^b	0,043
CD83 estromal	0,85 (0,49) ^a	1,61 (1,33)	2,85 (2,66) ^b	0,021
CD83 intratumoral	1,15 (0,48) ^a	1,96 (1,60) ^b	4,77 (3,76) ^c	0,001
CD83 Total	2,56 (2,19) ^a	4,82 (3,79) ^b	8,83 (4,77) ^c	0,001
CD208 extratumoral	0,65 (1,07) ^a	0,75 (1,27) ^b	2,11 (1,82) ^c	0,019
CD208 estromal	0,10 (0,16) ^a	0,76 (1,13)	1,71 (1,83) ^b	0,010
CD208 intratumoral	0,55 (0,79) ^a	1,12 (1,28)	1,69 (1,28) ^b	0,048
CD208 Total	1,20 (1,52) ^a	1,87 (2,04) ^b	4,30 (1,96) ^c	0,000

Médias com letras diferentes apresentam diferença estatística de acordo com o teste de Tuckey ($p < 0,05$).

4 CONCLUSÕES

Com base nos achados desse estudo, pode-se concluir que:

- No geral, imCDs foram significativamente mais frequentes que mCDs em todos os grupos;

- ImCDs e mCDs mostraram preferencialmente localização intratumoral e extratumoral respectivamente;

- Comparando G1 versus G2/G3, foi observado um significativo menor número de mCDs em G1;

- Na comparação de G1 versus G2 versus G3 houve um número significativamente menor de ambas, imCDs e mCDs.

Os resultados desse estudo mostraram menor quantidade de ambas imCDs e mCDs em CECO que afetam pacientes jovens (G1) em comparação com idosos, sugerindo comprometimento de uma resposta imune antitumoral nestes pacientes e permitindo a progressão do tumor.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A alteração na quantidade e possível função das CDs em adultos jovens, com uma menor presença de células tanto imaturas quanto maduras, traz à tona o questionamento do possível envolvimento de uma alteração imunológica na etiologia do CECO nestes indivíduos. Estaria esta alteração imune associada a uma herança genética ou a um processo precoce de imunossenescência?

A imunossenescência é marcada pelo declínio progressivo da função de várias células e tecidos em decorrência do processo de envelhecimento natural e associada com influências do ambiente, mas não é possível determinar quando este processo se inicia (BUENO *et al.*, 2014). Portanto, faz-se necessário estudos mais detalhados e melhor controlados com pacientes idosos para determinar as reais consequências do envelhecimento sobre o sistema imune, quais são os marcos dessas possíveis alterações e quem são os pacientes em risco de desenvolvê-las mais rapidamente e de maneira mais proeminente.

Muito se discute em relação à utilização das CDs para a imunoterapia do câncer, que tem como objetivo induzir uma resposta tumor específica efetiva das células T com consequente redução da massa tumoral bem como com a criação de memória imunológica para evitar a recorrência do carcinoma, sendo necessário inserir CDs que estejam aptas a tornarem-se maduras para uma resposta eficiente (PALUCKA e BANCHEREAU, 2012). O melhor entendimento da biologia das CDs na regulação da imunidade tumoral em pacientes adultos jovens pode aprimorar os estudos a fim de proporcionar melhores resultados desta terapêutica para este grupo.

Infelizmente várias questões permanecem sem resposta nesta temática, sendo necessárias maiores investigações para aquisição de conhecimentos em relação ao sistema imunológico, bem como, as implicações clínicas do CECO em adultos jovens, proporcionando prerrogativas para o desenvolvimento de imunoterapias antitumorais específicas e modalidades de tratamento mais efetivas com redução dos efeitos colaterais.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia, PA: Saunders, 2010. ISBN 9781416031239.

ADEMA, G. J. Dendritic cells from bench to bedside and back. **Immunol Lett**, v. 122, n. 2, p. 128-30, Feb 21 2009. ISSN 0165-2478.

ADEMOKUN, A.; WU, Y. C.; DUNN-WALTERS, D. The ageing B cell population: composition and function. **Biogerontology**, v. 11, n. 2, p. 125-37, Apr 2010. ISSN 1389-5729.

ALAM, H. et al. Fascin overexpression promotes neoplastic progression in oral squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 12, p. 32, 2012. ISSN 1471-2407.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, n. 6673, p. 245-52, Mar 19 1998. ISSN 0028-0836.

BLOT, W. J. et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res**, v. 48, n. 11, p. 3282-7, Jun 1 1988. ISSN 0008-5472.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da, Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. **INCA**, 2016.

BROWN, L. M.; CHECK, D. P.; DEVESA, S. S. Oral cavity and pharynx cancer incidence trends by subsite in the United States: changing gender patterns. **J Oncol**, v. 2012, p. 649498, 2012. ISSN 1687-8450.

BUENO, V.; SANT'ANNA, O. A.; LORD, J. M. Ageing and myeloid-derived suppressor cells: possible involvement in immunosenescence and age-related disease. **Age (Dordr)**, v. 36, n. 6, p. 9729, Dec 2014.

BURZYNSKI, N. J. et al. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract in patients 40 years of age and younger. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 74, n. 3, p. 404-8, Sep 1992.

CAMPISI, J. Aging, Cellular Senescence, and Cancer. **Annual review of physiology**, v. 75, p. 685-705, 11/08 2013. ISSN 0066-4278/1545-1585.

CARDESA, A. et al. **Squamous cell carcinoma**. In: Barnes L., Eveson J. W., Reichart P., Sidransky D., editors. **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. Lyon: IACR: 2005. 118-121.

CARUSO, C. et al. Mechanisms of immunosenescence. **Immun Ageing**, v. 6, p. 10, 2009. ISSN 1742-4933.

CARVALHO, A. L. et al. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. **Head Neck**, v. 26, n. 1, p. 31-8, Jan 2004. ISSN 1043-3074.

CHATURVEDI, A. K. et al. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 4, p. 612-9, Feb 1 2008. ISSN 0732-183x.

CHEN, W. K. et al. [Expression and clinical significance of CD1a+ dendritic cells in glottic squamous cell carcinoma]. **Ai Zheng**, v. 24, n. 9, p. 1124-6, Sep 2005.

DAHLGREN, L. et al. Human papillomavirus is more common in base of tongue than in mobile tongue cancer and is a favorable prognostic factor in base of tongue cancer patients. **Int J Cancer**, v. 112, n. 6, p. 1015-9, Dec 20 2004. ISSN 0020-7136.

DIFRANCO, C. F. et al. Identification of Langerhans cells in human gingival epithelium. **J Periodontol**, v. 56, n. 1, p. 48-54, Jan 1985. ISSN 0022-3492.

DONATO, R. et al. Functions of S100 proteins. **Curr Mol Med**, v. 13, n. 1, p. 24-57, Jan 2013. ISSN 1566-5240.

FAHRBACH, K. M. et al. Activated CD34-derived Langerhans cells mediate transfection with human immunodeficiency virus. **J Virol**, v. 81, n. 13, p. 6858-68, Jul 2007. ISSN 0022-538X.

FERLAY, J. et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359-86, Mar 1 2015. ISSN 0020-7136.

FIELD, J. K. et al. Allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck: fractional allele loss correlates with survival. **British Journal of Cancer**, v. 72, n. 5, p. 1180-1188, 1995. ISSN 0007-0920/1532-1827.

FRANCESCHI, S. et al. Food groups, oils and butter, and cancer of the oral cavity and pharynx. **British Journal of Cancer**, v. 80, n. 3-4, p. 614-620.

FUJIMOTO, Y. et al. CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus. **Cell**, v. 108, n. 6, p. 755-67, Mar 22 2002. ISSN 0092-8674.

FULOP, T. et al. The Role of Immunosenescence in the Development of Age-Related Diseases. **Rev Invest Clin**, v. 68, n. 2, p. 84-91, Mar-Apr 2016. ISSN 0034-8376.

GOLAS, S. M. Trends in palatine tonsillar cancer incidence and mortality rates in the United States. **Community Dent Oral Epidemiol**, v. 35, n. 2, p. 98-108, Apr 2007. ISSN 0301-5661.

GONCALVES, A. S. et al. Immune response in cervical lymph nodes from patients with primary oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 42, n. 7, p. 535-40, Aug 2013. ISSN 0904-2512.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, Mar 4 2011. ISSN 0092-8674.

HART, D. N. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. **Blood**, v. 90, n. 9, p. 3245-87, Nov 1 1997. ISSN 0006-4971.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Observações sobre a evolução da mortalidade no Brasil: o passado, o presente e perspectivas 2010.

KELLER, R. Dendritic cells: their significance in health and disease. **Immunol Lett**, v. 78, n. 3, p. 113-22, Oct 1 2001. ISSN 0165-2478.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Dynamics of T lymphocyte responses: intermediates, effectors, and memory cells. **Science**, v. 290, n. 5489, p. 92-7, Oct 6 2000. ISSN 0036-8075.

LEE, Y. C. et al. Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case-control study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n. 12, p. 3353-61, Dec 2009. ISSN 1055-9965.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA, K. A. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. **Oral Oncol**, v. 37, n. 5, p. 401-18, Jul 2001. ISSN 1368-8375.

LOMBARDI, T.; HAUSER, C.; BUDTZ-JORGENSEN, E. Langerhans cells: structure, function and role in oral pathological conditions. **J Oral Pathol Med**, v. 22, n. 5, p. 193-202, May 1993. ISSN 0904-2512.

LUND, V. J.; HOWARD, D. J. Head and neck cancer in the young: a prognostic conundrum? **J Laryngol Otol**, v. 104, n. 7, p. 544-8, Jul 1990. ISSN 0022-2151.

MA, Y. et al. Tumor Associated Regulatory Dendritic Cells. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, n. 4, p. 298-306, 03/06 2012. ISSN 1044-579X.

MAJCHRZAK, E. et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the literature. **Radiol Oncol**, v. 48, n. 1, p. 1-10, Mar 2014. ISSN 1318-2099.

MALLET, Y. et al. Head and neck cancer in young people: a series of 52 SCCs of the oral tongue in patients aged 35 years or less. **Acta Otolaryngol**, v. 129, n. 12, p. 1503-8, Dec 2009. ISSN 0001-6489.

MARTIN-FONTECHA, A. et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. **J Exp Med**, v. 198, n. 4, p. 615-21, Aug 18 2003. ISSN 0022-1007.

MELLMAN, I.; STEINMAN, R. M. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 255-8, Aug 10 2001. ISSN 0092-8674.

MEYERHOLZ, D. K. et al. Depletion of alveolar glycogen corresponds with immunohistochemical development of CD208 antigen expression in perinatal lamb lung. **J Histochem Cytochem**, v. 54, n. 11, p. 1247-53, Nov 2006. ISSN 0022-1554.

MISHRA, M. et al. Epidemiological and clinicopathological study of oral leukoplakia. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 71, n. 3, p. 161-5, May-Jun 2005. ISSN 0378-6323.

NEVILLE, B. W. et al. **Oral and Maxillofacial Pathology**. Third. Saunders, St. Louis: Elsevier Health Sciences, 2009. 972 ISBN 9781437721973.

NI, Y. H. et al. Accumulation of CD208(+) mature dendritic cells does not correlate with survival time in oral squamous cell carcinoma patients. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 72, n. 11, p. 2178-85, Nov 2014. ISSN 0278-2391.

OLIVER, R. J.; DEARING, J.; HINDLE, I. Oral cancer in young adults: report of three cases and review of the literature. **Br Dent J**, v. 188, n. 7, p. 362-5, Apr 8 2000. ISSN 0007-0610.

PALUCKA, K.; BANCHEREAU, J. Cancer immunotherapy via dendritic cells. **Nat Rev Cancer**, v. 12, n. 4, p. 265-77, Apr 2012. ISSN 1474-175x.

PANDA, A. et al. Human innate immunosenescence: causes and consequences for immunity in old age. **Trends Immunol**, v. 30, n. 7, p. 325-33, Jul 2009. ISSN 1471-4906.

PATEL, S. C. et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 11, p. 1488-94, Apr 10 2011. ISSN 0732-183x.

PAUL, W. E. **Fundamental immunology**. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013. ISBN 9781451117837 1451117833.

REICHERT, T. E. et al. The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma. **Cancer**, v. 91, n. 11, p. 2136-47, Jun 1 2001. ISSN 0008-543X.

REIS E SOUSA, C.; SHER, A.; KAYE, P. The role of dendritic cells in the induction and regulation of immunity to microbial infection. **Curr Opin Immunol**, v. 11, n. 4, p. 392-9, Aug 1999. ISSN 0952-7915.

ROWLEY, H. et al. Definition of a tumor suppressor gene locus on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma of the head and neck by means of microsatellite markers. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 122, n. 5, p. 497-501, May 1996. ISSN 0886-4470.

SANKARANARAYANAN, R. et al. Aetiology of oral cancer in patients less than or equal to 30 years of age. **British Journal of Cancer**, v. 59, n. 3, p. 439-440, 1989. ISSN 0007-0920.

SANTOS-SILVA, A. R. et al. High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study. **Histopathology**, v. 58, n. 7, p. 1127-35, Jun 2011. ISSN 0309-0167.

SARKARIA, J. N.; HARARI, P. M. Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: rationale for aggressive therapy. **Head Neck**, v. 16, n. 2, p. 107-11, Mar-Apr 1994. ISSN 1043-3074.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. **Oral Dis**, v. 15, n. 6, p. 388-99, Sep 2009. ISSN 1354-523x.

SCULLY, C.; FIELD, J. K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncol**, v. 36, n. 3, p. 256-63, May 2000. ISSN 1368-8375,

SEGUIER, S. et al. Langerin+ versus CD1a+ Langerhans cells in human gingival tissue: a comparative and quantitative immunohistochemical study. **Arch Oral Biol**, v. 48, n. 4, p. 255-62, Apr 2003. ISSN 0003-9969.

SHAH, F. D. et al. A Review on Salivary Genomics and Proteomics Biomarkers in Oral Cancer. **Indian Journal of Clinical Biochemistry**, India, v. 26, n. 4, p. 326-334, 08/09.

SHEVCHUK, Z. et al. Number of Langerhans cells is decreased in premalignant keratosis and skin cancers. **Exp Oncol**, v. 36, n. 1, p. 34-7, Mar 2014. ISSN 1812-9269.

STEINMAN, R. M.; BANCHEREAU, J. Taking dendritic cells into medicine. **Nature**, v. 449, n. 7161, p. 419-26, Sep 27 2007. ISSN 0028-0836.

STEINMAN, R. M.; IDOYAGA, J. Features of the dendritic cell lineage. **Immunol Rev**, v. 234, n. 1, p. 5-17, Mar 2010. ISSN 0105-2896.

STOJCEV, Z. et al. The role of dietary nutrition in stomach cancer. **Contemporary Oncology**, v. 17, n. 4, p. 343-345.

STURGIS, E. M.; CINCIRIPINI, P. M. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? **Cancer**, v. 110, n. 7, p. 1429-35, Oct 1 2007. ISSN 0008-543X .

SU, D. M.; AW, D.; PALMER, D. B. Immunosenescence: a product of the environment? **Curr Opin Immunol**, v. 25, n. 4, p. 498-503, Aug 2013. ISSN 0952-7915.

TOPORCOV, T. N. et al. Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium. **Int J Epidemiol**, v. 44, n. 1, p. 169-85, Feb 2015. ISSN 0300-5771.

TRAILL, K. N. et al. Age-related changes in lymphocyte subset proportions, surface differentiation antigen density and plasma membrane fluidity: application of the eurage senieur protocol admission criteria. **Mech Ageing Dev**, v. 33, n. 1, p. 39-66, Dec 1985. ISSN 0047-6374.

VARGAS-FERREIRA, F. et al. Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. **Braz Dent J**, v. 23, n. 5, p. 586-90, 2012. ISSN 0103-6440.

WASKOW, C. et al. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. **Nat Immunol**, v. 9, n. 6, p. 676-83, Jun 2008. ISSN 1529-2908.

APÊNDICE A - TABELA 5

Tabela 5 - Quantificação de células S100+; CD1a+; CD207+; CD83+ e CD208+ em CECO distribuídas quanto à localização em relação ao tumor e sua distribuição de acordo com a faixa etária (n=41). Teste ANOVA.

Variável		N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	P
Quantidade de células S100+ extratumoral	G1 < 40 anos	12	17,12	7,97	2,30	8,60	35,60	0,730
	G2 40 a < 60	15	19,28	15,44	3,86	3,80	60,00	
	G3 ≥ 60 anos	14	21,29	13,62	3,77	8,40	63,00	
Quantidade de células S100+ intertumoral	G1 < 40 anos	12	7,41	6,04	1,74	1,60	21,40	0,164
	G2 40 a < 60	15	13,61	14,24	3,56	1,20	61,40	
	G3 ≥ 60 anos	14	19,40	21,50	5,96	3,50	86,80	
Quantidade de células S100+ estromal	G1 < 40 anos	12	10,26	5,43	1,56	1,20	18,60	0,094
	G2 40 a < 60	15	11,77	14,41	3,60	0,40	63,20	
	G3 ≥ 60 anos	14	25,78	30,37	8,42	5,60	119,80	
Quantidade de células S100+ intratumoral	G1 < 40 anos	12	19,25	10,73	3,09	5,00	39,60	0,046*
	G2 40 a < 60	15	25,38	27,81	6,95	3,60	124,60	
	G3 ≥ 60 anos	14	45,19	34,08	9,45	21,20	127,60	
Quantidade de células S100+ Total	G1 < 40 anos	12	36,37	17,68	5,10	16,00	75,20	0,099
	G2 40 a < 60	15	44,67	40,40	10,10	9,60	184,60	
	G3 ≥ 60 anos	14	64,61	33,65	9,33	38,60	126,60	
Quantidade de células CD1a+ extratumoral	G1 < 40 anos	12	8,26	6,37	1,77	1,40	20,80	0,767 ^K
	G2 40 a < 60	15	9,42	7,94	2,20	0,00	24,20	
	G3 ≥ 60 anos	14	8,93	4,00	1,03	1,80	17,00	
Quantidade de células CD1a+ intertumoral	G1 < 40 anos	12	5,68	5,73	1,65	0,00	19,00	0,003*
	G2 40 a < 60	15	6,97	5,95	1,49	0,00	18,80	
	G3 ≥ 60 anos	14	15,68	10,53	2,92	1,50	35,00	
Quantidade de células CD1a+ estromal	G1 < 40 anos	12	4,16	3,90	1,12	0,20	13,20	0,425
	G2 40 a < 60	15	7,56	6,33	1,58	0,00	22,00	
	G3 ≥ 60 anos	14	8,64	13,49	3,74	1,00	51,60	
Quantidade de células CD1a+ intratumoral	G1 < 40 anos	12	9,85	9,10	2,62	1,60	32,20	0,035*
	G2 40 a < 60	15	14,54	9,37	2,34	4,80	39,20	
	G3 ≥ 60 anos	14	24,33	20,30	5,62	2,50	81,00	
	< 40 anos	12	18,58	14,25	4,11	3,60	53,00	0,073

Quantidade	40 a < 60	15	23,15	14,15	3,53	6,60	63,40	
células CD1a+	≥ 60 anos	14	33,65	20,52	5,69	5,16	83,60	
Total								
Quantidade de	< 40 anos	12	4,98	4,30	1,24	1,00	15,20	0,775
células CD207+	40 a < 60	15	4,75	3,53	0,88	0,60	12,50	
extratumoral	≥ 60 anos	14	5,75	3,76	1,04	0,00	11,20	
Quantidade de	< 40 anos	12	4,07	3,77	1,08	0,00	11,20	0,023*
células CD207+	40 a < 60	15	6,12	5,61	1,40	0,00	17,20	
intertumoral	≥ 60 anos	14	11,68	9,88	2,74	0,20	32,80	
Quantidade de	< 40 anos	12	4,60	5,21	1,50	0,40	16,40	0,321
células CD207+	40 a < 60	15	3,41	4,31	1,07	0,00	17,40	
estromal	≥ 60 anos	14	12,35	28,63	7,94	0,00	107,20	
Quantidade de	< 40 anos	12	8,66	7,54	2,17	0,40	27,60	0,105
células CD207+	40 a < 60	15	9,53	8,96	2,24	0,40	32,40	
intratumoral	≥ 60 anos	14	24,04	33,97	9,42	1,00	132,60	
Quantidade	< 40 anos	12	14,95	10,81	3,12	2,20	42,80	0,101
células CD207+	40 a < 60	15	14,29	11,37	2,84	2,40	44,00	
Total	≥ 60 anos	14	29,79	32,72	9,07	2,00	132,60	
Quantidade de	< 40 anos	12	1,41	1,91	0,55	0,00	6,00	0,037*
células CD83+	40 a < 60	15	2,86	2,54	0,63	0,00	7,60	
extratumoral	≥ 60 anos	14	4,07	2,82	0,78	0,00	9,40	
Quantidade de	< 40 anos	12	0,30	0,41	0,11	0,00	1,20	0,043*
células CD83+	40 a < 60	15	0,35	0,54	0,13	0,00	1,60	
intertumoral	≥ 60 anos	14	1,92	3,15	0,87	0,00	11,40	
Quantidade de	< 40 anos	12	0,85	0,49	0,14	0,00	1,80	0,021*
células CD83+	40 a < 60	15	1,61	1,33	0,33	0,00	4,80	
estromal	≥ 60 anos	14	2,85	2,66	0,73	0,00	9,40	
Quantidade de	< 40 anos	12	1,15	0,48	0,13	0,00	1,80	0,001*
células CD83+	40 a < 60	15	1,96	1,60	0,40	0,00	5,00	
intratumoral	≥ 60 anos	14	4,77	3,76	1,04	0,00	12,80	
Quantidade	< 40 anos	12	2,56	2,19	0,63	0,60	7,60	0,001*
células CD83+	40 a < 60	15	4,82	3,79	0,94	0,00	11,80	
Total	≥ 60 anos	14	8,83	4,77	1,32	2,60	17,60	

Quantidade de células CD208+ extratumoral	< 40 anos	12	0,65	1,07	0,30	0,00	3,60	0,019*
	40 a < 60	15	0,75	1,27	0,31	0,00	4,00	
	≥ 60 anos	14	2,11	1,82	0,50	0,00	6,40	
Quantidade de células CD208+ intertumoral	< 40 anos	12	0,32	0,71	0,20	0,00	2,40	0,868
	40 a < 60	15	0,36	0,54	0,13	0,00	1,60	
	≥ 60 anos	14	0,48	1,05	0,29	0,00	3,20	
Quantidade de células CD208+ estromal	< 40 anos	12	0,10	0,16	0,04	0,00	0,40	0,010*
	40 a < 60	15	0,76	1,13	0,28	0,00	3,80	
	≥ 60 anos	14	1,71	1,83	0,50	0,00	6,50	
Quantidade de células CD208+ intratumoral	< 40 anos	12	0,55	0,79	0,22	0,00	2,40	0,048*
	40 a < 60	15	1,12	1,28	0,31	0,00	3,80	
	≥ 60 anos	14	1,69	1,28	0,35	0,00	3,80	
Quantidade células CD208+ Total	< 40 anos	12	1,20	1,52	0,44	0,00	5,00	0,000*
	40 a < 60	15	1,87	2,04	0,50	0,00	6,80	
	≥ 60 anos	14	4,30	1,96	0,54	2,00	9,20	

APÊNDICE B - TABELA 6

Tabela 6 - Quantificação de células S100+; CD1a+; CD207+; CD83+ e CD208+ em CECO distribuídas quanto à localização em relação ao tumor e sua distribuição de acordo com a idade: < 40 anos (n=12) ou ≥ 40 anos (n=29). Teste U de Mann Whitney.

Variável		N	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Mínimo	Máximo	P
Quantidade de células S100+ extratumoral	G1 < 40 anos	12	17,12	7,97	2,30	8,60	35,60	0,495
	G2 ≥ 40 anos	29	20,18	14,43	2,68	3,80	63,00	
Quantidade de células S100+ intertumoral	G1 < 40 anos	12	7,41	6,04	1,74	1,60	21,40	0,104
	G2 ≥ 40 anos	29	16,21	17,76	3,29	1,20	86,80	
Quantidade de células S100+ estromal	G1 < 40 anos	12	10,26	5,43	1,56	1,20	18,60	0,268
	G2 ≥ 40 anos	29	18,05	23,60	4,38	0,40	119,80	
Quantidade de células S100+ intratumoral	G1 < 40 anos	12	19,25	10,73	3,09	5,00	39,60	0,121
	G2 ≥ 40 anos	29	34,26	31,82	5,90	3,60	127,60	
Quantidade de células S100+ Total	G1 < 40 anos	12	36,37	17,68	5,10	16,00	75,20	0,145
	G2 ≥ 40 anos	29	53,61	38,23	7,09	9,60	184,60	
Quantidade de células CD1a+ extratumoral	G1 < 40 anos	12	8,26	6,37	1,77	1,40	20,80	0,767
	G2 ≥ 40 anos	29	8,93	6,04	1,12	0,00	24,20	
Quantidade de células CD1a+ intertumoral	G1 < 40 anos	12	5,68	5,73	1,65	0,00	19,00	0,080
	G2 ≥ 40 anos	29	10,87	9,27	1,72	0,00	35,00	
Quantidade de células CD1a+ estromal	G1 < 40 anos	12	4,16	3,90	1,12	0,20	13,20	0,202
	G2 ≥ 40 anos	29	8,04	9,99	1,85	0,00	51,60	
Quantidade de células CD1a+ intratumoral	G1 < 40 anos	12	9,85	9,10	2,62	1,60	32,20	0,070
	G2 ≥ 40 anos	29	18,92	15,75	2,92	2,50	81,00	

Quantidade de células CD1a+ Total	G1 < 40 anos	12	18,58	14,25	4,11	3,60	53,00	0,117
	G2 ≥ 40 anos	29	27,85	17,77	3,30	5,16	83,60	
Quantidade de células CD207+ extratumoral	G1 < 40 anos	12	4,98	4,30	1,24	1,00	15,20	0,869
	G2 ≥ 40 anos	29	5,20	3,61	0,67	0,00	12,50	
Quantidade de células CD207+ intertumoral	G1 < 40 anos	12	4,07	3,77	1,08	0,00	11,20	0,073
	G2 ≥ 40 anos	29	8,61	8,16	1,51	0,00	32,80	
Quantidade de células CD207+ estromal	G1 < 40 anos	12	4,60	5,21	1,50	0,40	16,40	0,627
	G2 ≥ 40 anos	29	7,42	19,54	3,62	0,00	107,20	
Quantidade de células CD207+ intratumoral	G1 < 40 anos	12	8,66	7,54	2,17	0,40	27,60	0,313
	G2 ≥ 40 anos	29	16,04	24,32	4,51	0,40	132,60	
Quantidade de células CD207+ Total	G1 < 40 anos	12	14,95	10,81	3,12	2,20	42,80	0,396
	G2 ≥ 40 anos	29	21,24	24,28	4,50	2,00	132,60	
Quantidade de células CD83+ extratumoral	G1 < 40 anos	12	1,41	1,91	0,55	0,00	6,00	0,025*
	G2 ≥ 40 anos	29	3,40	2,68	0,49	0,00	9,40	
Quantidade de células CD83+ intertumoral	< 40 anos	12	0,30	0,41	0,11	0,00	1,20	0,257
	G2 ≥ 40 anos	29	1,05	2,24	0,41	0,00	11,40	
Quantidade de células CD83+ estromal	G1 < 40 anos	12	0,85	0,49	0,14	0,00	1,80	0,038*
	G2 ≥ 40 anos	29	2,16	2,08	0,38	0,00	9,40	
Quantidade de células CD83+ intratumoral	G1 < 40 anos	12	1,15	0,48	0,13	0,00	1,80	0,027*
	G2 ≥ 40 anos	29	3,22	3,07	0,57	0,00	12,80	
	G1 < 40 anos	12	2,56	2,19	0,63	0,60	7,60	0,006*

Quantidade células CD83+ Total	G2 ≥ 40 anos	29	6,62	4,64	0,86	0,00	17,60	
Quantidade de células CD208+ extratumoral	G1 < 40 anos	12	0,65	1,07	0,30	0,00	3,60	0,180
	G2 ≥ 40 anos	29	1,36	1,65	0,30	0,00	6,40	
Quantidade de células CD208+ intertumoral	G1 < 40 anos	12	0,32	0,71	0,20	0,00	2,40	0,716
	G2 ≥ 40 anos	29	0,41	0,79	0,14	0,00	3,20	
Quantidade de células CD208+ estromal	G1 < 40 anos	12	0,10	0,16	0,04	0,00	0,40	0,020*
	G2 ≥ 40 anos	29	1,18	1,53	0,28	0,00	6,50	
Quantidade de células CD208+ intratumoral	G1 < 40 anos	12	0,55	0,79	0,22	0,00	2,40	0,046*
	G2 ≥ 40 anos	29	1,37	1,28	0,23	0,00	3,80	
Quantidade células CD208+ Total	G1 < 40 anos	12	1,20	1,52	0,44	0,00	5,00	0,020*
	G2 ≥ 40 anos	29	2,96	2,32	0,43	0,00	9,20	

ANEXO A – FICHA DE BIÓPSIA E TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO



Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
FCBS / Curso de Odontologia

Solicitação de Anatomopatologia e/ou Citologia – Laboratório de Patologia
Rua da Glória, 187 – Centro – Diamantina/MG
(38) 3532-6088

EXAME Nº: _____ **Data de registro do material:** ____/____/____

Nome: _____ **Prontuário:** ____/____

Endereço: _____ **Nº** _____ **Cidade:** _____ **Telefone** _____

Idade ____ anos **Sexo:** M () F () **Cor:** B () N () O () **Est. Civil:** C () S () V () O () **Inst.:** 0 () 1 () 2 () 3 ()

Material enviado por: Dr. (a) _____ **Fone ()** | _____

Endereço do Solicitante: _____ **Nº** _____ **Cidade:** _____ **CEP.:** _____

Assinatura do (a) Solicitante _____ **Data da biópsia/cirurgia:** ____/____/____

É urgente? Não () Sim () **Deseja o resultado por:** Corréio () Fax () email () Vai retirar pessoalmente ()

TIPO DE MATERIAL

A) Biópsia () Curetagem () Peça cirúrgica () Citologia () Aspiração () PAAF () Outros _____

B) Mucosa () Gengiva () Semimucosa () Dente/ Periápice () Osso () Pele () Outros _____

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

LOCALIZAÇÃO:

Duração: de ____ dia(s) () Semana(s) () Mês(es) () Anos(s) () Congênita () Desconhecida ()

Tamanho: Largura/ Diâmetro ____ x ____ cm **Altura** ____ cm **Variável () Extensa ()**

Cor: Rósea/Normal () Esbranquiçada () Avermelhada () Acastanhada () Arroxeadada () Enegrecida () Parda ()

Amarelada () Azulada () Escura () Outra ()

Lesão: Nódulo () Pápula () Placa () Bolha () Vesícula/Pústula () Mancha () Úlcera () Erosão ()

Fenda/Fissura () Perfuração () Vegetação ()

Superfície: Lobulada () Granulosa () Papilosa () Crostosa () Fissurada () Verrucosa () Lisa () Nodular () Papular ()

Moriforme () Queratótica () Escamosa () Irregular ()

Consistência: Normal () Fibroelástica () Óssea/Pétreia () Flutuante () Cística () Mole ()

Sensibilidade: Normal () Discretamente dolorida () Dolorida ()

Formato: Irregular () Esférica () Circular () Lentilha () Cilíndrica () Ovíde () Alvo () Outro ()

Contorno: Regular () Irregular () Circinado () **Limites:** Nítido () Difuso ()

Infiltração: Infiltrada () Não infiltrada () **Fixação:** Fixa () Semifixa () Móvel ()

Borda: Elevada () Plana () **Inserção:** Sésil () Pediculada ()

Lateralidade: Direita () Esquerda () Bilateral () Mediano ()

Número: Única () Dupla () Múltipla () Generalizada ()

CARACTERÍSTICAS RADIOGRÁFICAS: (Solicita-se envio da radiografia ou imagem digital)

Lesão: Radiopaca () Radiolúcida () Mista ()

Número: Única () Múltipla () Bilateral () Poliostótica ()

Bordas: Nítidas () Difusas () Aspecto cístico () Roído por traça () Raios de sol

Centro: Radiopaca () Radiolúcida () Bolhas de sabão () Unilocular () Favo de mel () Flocos de algodão ()

Raquete de tênis () Vidro despoído () Outros _____

Relação com dentes: Reabsorção () Deslocamento () Periapical () Pericoronário ()

DIAGNÓSTICO CLÍNICO:

1- _____

2- _____

3- _____

DESCRIÇÃO MACROSCÓPICA (Uso exclusivo da patologia):

Fixador: Formol () Álcool () Outros () **Tempo de fixação:** ____ dias

Tecido: Duro () Mole () **Presença de dentes:** Sim () Não () Qual (is)? _____

Número de fragmentos: 1 () 2 () 3 () Múltiplos ()

Tamanho: ____ x ____ milímetros. **O maior () Em agregado ()**

Formato: Irregular () Fusiforme () Arredondado () Retangular () Outros _____

Cor: Esbranquiçado () Acastanhada () Enegrecida () Avermelhada () Outras: _____

Colorações solicitadas: HE () PAS () GROCOTT () ZIEHL/NIELSEN () Outras: _____

Material seccionado: Sim () Não () **Incluir:** No corte () De lado () Agar () Sem especificação ()

Descalcificação: Descalcificador _____ **Início** ____/____/____ **H. Final:** ____/____/____; ____ H

Obs.: _____

TERMO DE CONSENTIMENTO

Eu

_____, com RG nº _____, autorizo que o material removido seja enviado para o Laboratório de Patologia da UFVJM para análise e realização de técnicas de coloração necessárias para melhor esclarecimento do diagnóstico histopatológico (descrição das alterações celulares e teciduais presentes no fragmento com utilização do microscópio de luz). Além disso, dou permissão da utilização deste material e das imagens microscópicas para uso didático, em sala de aula e site da disciplina, e /ou para uso científico em Congressos e Periódicos de acordo com os princípios éticos e a normatização da Sociedade Brasileira de Patologia.

OBS. Caso o paciente seja menor de idade, o responsável pelo mesmo deve assinar. Se o paciente for analfabeto, a assinatura deve ser substituída pelo registro da impressão do dedo polegar direito.

Assinatura do Paciente

Polegar Direito

Exame Macroscópico:

Data ____/____/____ Responsável: _____

Exame Microscópico:

Diagnóstico Final: _____

Observações:

Patologista: _____

ANEXO B – FICHA CLÍNICA DO PACIENTE
CLÍNICA DE ESTOMATOLOGIA

IDENTIFICAÇÃO:

NOME: _____ ESTADO CIVIL: _____

DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____ IDADE: ____anos NATURALIDADE: _____

NACIONALIDADE: _____ SEXO: _____ COR: _____ GRAU DE ESCOLARIDADE 0() 1() 2() 3()

PROCEDÊNCIA: Zona urbana () Zona rural () OCUPAÇÃO: _____

FILIAÇÃO: Mãe _____ PAI: _____

ENDEREÇO: _____ Nº: _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ UF: _____ CEP: _____

TELEFONE: Res. () _____ Trab. () _____

NOME P/ CONTATO: _____ GRAU/RELACIONAMENTO: _____

ENDEREÇO: _____ Nº: _____ TELEFONE: () _____

BAIRRO: _____ CIDADE: _____ UF: _____ CEP: _____

Declaro que as informações deste prontuário por mim prestadas são verdadeiras.
ASSUMO INTEIRA RESPONSABILIDADE PELAS INFORMAÇÕES AQUI PRESTADAS.

Declaro que tenho plena consciência que estou recebendo atendimento em uma clínica-escola da UFVJM e desta forma dou pleno consentimento aos professores e alunos a fazer diagnóstico, planejamento e tratamento em minha pessoa, de acordo com os conhecimentos da Odontologia. Estou consciente que tenho o direito de receber todas as informações sobre o tratamento.

Concordo em pagar os custos inerentes aos procedimentos propostos para o meu tratamento não cobertos pela Instituição.

Concordo, também, que todas as radiografias, modelos, históricos de antecedentes familiares, fotografias, resultados de exames clínicos e de laboratórios e quaisquer informações concernentes ao planejamento de diagnóstico e/ou tratamento, ficam sob guarda exclusiva desta Instituição, a qual dou pleno direito de retenção, uso para quaisquer fins de ensino e de divulgação em jornais e/ou revistas científicas de país e do estrangeiro, como também, a doação dos meus órgãos dentários extraídos e lesões, respeitando o sigilo e privacidade através da não-divulgação de dados que possam me identificar. Estou consciente de que posso retirar este meu consentimento a qualquer momento.

Diamantina, ____/____/____

Assinatura do paciente ou responsável

Documento de identidade: _____ Expedido por: _____

Queixa principal

História da doença atual

Hábitos

Fuma: Sim () ; Não () ; Ex-fumante () ; Quanto: ___ maços/dia; Durante: ___ anos; Parou há ___ anos.

Bebe: Sim () ; Não () ; Ex etilista () ; Quanto: ___ copos/dia – Ocasional () , Cerveja () , vinho () , pinga () , outros destilados () . Durante ___ anos. Parou há ___ anos.

Outros Hábitos _____.

Antecedentes Familiares

Avós: _____

Pais: _____

Irmãos: _____

Filhos: _____

Tios: _____

Outros: _____

Antecedentes Pessoais Médicos e Odontológicos

Boa saúde: Sim () Não () _____

Visitas freqüentes ao médico: Sim () Não () _____

Medicação de Rotina: Sim () Não () _____

Alergias: Sim () Não () _____

Doenças prévias: Sim () Não () _____

Cirurgias prévias: Sim () Não () _____

Acidentes e fraturas: Sim () Não () _____

Internações prévias: Sim () Não () _____

Outros problemas de saúde: Sim () Não () _____

Visitas regulares ao dentista: Sim () Não () _____

Doenças bucais Sim () Não () _____

Cirurgias Buciais: Sim () Não () _____

Hemorragias prévias: Sim () não () _____

Último tratamento odontológico: ___ meses _____

Exame Físico Geral

Peso: ____, ____, Kg – Altura: ____ cm – PA: ____ Btm/mim. Anda com dificuldade: Sim () Não ();
 Assimetria: Sim () Não () . Lesão de pele Não (), se Sim ,descreva:____

Exame Físico Regional

Assimetria – Deformidade : Sim () Não () . Desvio dos olhos: Sim () Não () . Lesão de Pele:
 Sim () Não (), se Sim, descreva _____

Descrição clínica de gânglios

Cadeia: não palpável () Submandibular () Cervical () Submentoniano () Outros () (especifique)
Consistência: Normal () Fibroelástico () Ósseo-pétreo () Mole () Flutuante () Cístico ()
Sensibilidade: Normal () Dolorido () Discretamente dolorido ()
Tamanho: Largura/Diâmetro/ Altura x x cm
Lateralidade: Direito () Esquerdo () Bilateral () Mediano ()
Número: Único () Múltiplo () Generalizado ()
Aderência: Móvel () Semifixo () Fixo ()
Superfície: Liso () Irregular ()

Exame Físico intrabucal

Perdas dentais: Sim () Não () . É desdentado total: Sim () Não () - Maxila () Mandíbula () .
 Prótese total: Sim () Não () . Superior () Inferior () .
 Parcial: Sim () Não () Superior () Inferior () .

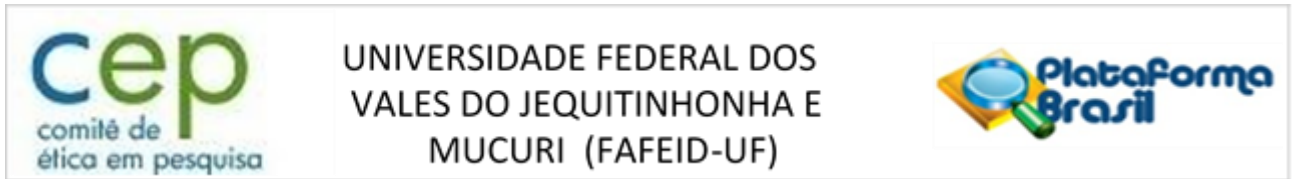
VARIAÇÕES DA NORMALIDADE	LOCALIZAÇÃO
Amígdala lingual hipertrófica ()	
Anquiloglossia ()	
Gengivite ()	
Grânulos de Fordyce ()	
Leucodema ()	
Língua crenada ()	
Língua fissurada ()	
Língua geográfica ()	
Língua pilosa ()	
Língua saburrosa ()	
Linha Alba ()	
Macroglossia ()	
Mucosite por prótese no palato ()	
Periodontite ()	
Pigmentação exógena ()	
Pigmentação melânica racial ()	
Queratose de rebordo	
Rebordo flácido ()	
Toro mandibular ()	
Toro palatino ()	
Varizes linguais ()	
Outras () Citar	
Outras () Citar	

Lesão (ões) Principal (is) (descreva se houver alguma)

Duração de ___ dias(s) () semana(s) () meses () anos (). Congênita () Desconhecida ()
Tamanho: sem lesão visível () .Largura/ Diâmetro ___x___ cm . Altura ___cm. Variável ()
Lesão: Nódulo () Pápula () Placa () Vesícula () Bolha () Pústula () Mancha () úlcera () Erosão () Fenda/ Fissura () Perfuração () Vegetação ()
Sensibilidade: Normal () Discretamente dolorida () Dolorida () Anestésico ()
Consistência: Normal () Fibroelástica () Óssea- Pétreia () Flutuante () Cística () Mole ()
Cor: rósea/Normal () Esbranquiçada () Avermelhada () acastanhado () Arroxeadada () Enegrecida () Parda () Amarelada () Azulada ()
Superfície: Lisa () Nodular () Papular () moriforme () Queratótica () Escamosa () Irregular () Lobulada () Granulosa () Papilosa () Crostosa () Fissurada () Verrucosa ()
Formato: Irregular () Esférica () Circular () Lentilha () Cilíndrica () Ovóide () Alvo () Outros ()
Borda: Elevada () Plana (). Inserção: Sésil () Pediculada ()
Infiltração: Infiltrada () Não infiltrada (). Fixação: Fixa () Semifixa () Móvel ()
Contorno: Regular () Irregular () Circinado (). Limites: Nítidos () Difusos ()
Lateralidade: Direita () Esquerda () Mediana () Bilateral () Simétrica ()
Número: Única () Dupla () Múltipla () Generalizada ()

Localização:

ANEXO C - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo comparativo de subgrupos de células dendríticas em carcinoma espinocelular oral afetando pacientes jovens e idosos.

Pesquisador: Ana Terezinha Marques Mesquita

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 50293115.5.0000.5108

Instituição Proponente: Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.337.799

Apresentação do Projeto:

A imunossenescência refere-se à alteração das células do sistema imunológico decorrente do envelhecimento cronológico. Pode tornar o indivíduo mais susceptível a infecções, doenças autoimunes e câncer, afetando tanto a imunidade inata quanto a imunidade adaptativa. O carcinoma espinocelular oral (CECO) é uma neoplasia maligna que acomete principalmente idosos. Alguns estudos têm demonstrado um aumento na incidência de CECO em adultos jovens com idade entre 18 e 45 anos, sugerindo envolvimento de fatores genéticos e ambientais (virais) na etiologia da doença, bem como alteração do sistema imunológico. As células dendríticas (CDs) são células apresentadoras de antígeno profissionais e estimuladoras eficazes para a expansão clonal. Exercem um importante papel na indução de ambas as imunidades, inata e adaptativa. Acredita-se que uma supressão da função das CDs em pacientes com câncer contribui para a falha da resposta antitumoral, levando a uma consequente progressão da doença. O objetivo deste estudo é avaliar subgrupos de CDs maduras e imaturas em CECO de pacientes em duas diferentes faixas etárias. Para isso, serão utilizados neste estudo espécimes de biópsias já realizadas na Clínica de Estomatologia da UFMG para o diagnóstico de CECO,

que estão catalogadas e armazenadas em blocos de parafina, no Laboratório de Patologia Oral desta instituição. Para isso, serão selecionados 45 casos de CECO dos arquivos de um Serviço de Histopatologia, sendo divididos em três (03) grupos de 15 casos cada, de acordo com a faixa etária em: grupo 1 (< 40 anos de idade), grupo 2 (\geq 40 até <60 anos de idade) e grupo 3 (\geq 60 anos de idade). Dados demográficos (idade e gênero), hábitos sociais (consumo de tabaco e álcool) e estágio da doença de acordo com os critérios da União Internacional de Controle do Câncer (UICC) e classificação TNM de tumores malignos, serão coletados dos prontuários já preenchidos e arquivados na Clínica de Estomatologia da UFVJM. As lâminas coradas em H&E serão revisadas por dois patologistas orais e os tumores serão classificados em bem diferenciados, moderadamente ou pobremente diferenciados. Os resultados serão comparados entre os 3 grupos de pacientes das diferentes faixas etárias supracitadas, sendo considerados local do tumor, grau histopatológico e estágio clínico da doença no momento do diagnóstico. Em seguida, todos os casos serão submetidos à análise imunoistoquímica utilizando os anticorpos para CDs maduras (CD83 e CD208) e imaturas (S100, CD1a, CD207). As imagens das lâminas serão capturadas com câmera de vídeo acoplada ao microscópio de luz (Leica, Alemanha) com um aumento de x400. Um total de dez campos serão fotografados para cada anticorpo em todos os casos de CECO selecionados. Avaliação quantitativa do número de CDs será realizada pela análise de dez campos em maior aumento. O número de CDs positivas será expresso como média \pm desvio padrão por campo em maior aumento. As CDs serão identificadas com base na membrana celular e/ou coloração citoplasmática e morfologia apropriada. Nos grupos de jovens e idosos, as CDs positivas extratumorais e intratumorais (intertumoral e estromal) serão calculadas separadamente. A contagem das CDs será realizada com o auxílio do programa Image J (Scion Corporation, E.U.A.). Em seguida, a quantidade de CDs dos dez campos será somada, sendo calculada a média de CDs por caso selecionado. Para análise estatística será utilizado o software SPSS versão 15.0 para aplicação dos testes paramétricos ANOVA ou não paramétricos de MannWhitney, sendo considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Analisar comparativamente a presença e localização das CDs maduras e imaturas em CECO de pacientes em três diferentes faixas etárias.

Objetivo Secundário:

- Avaliar as CDs maduras e imaturas em CECO de pacientes < 40 anos de idade, 40 até < 60 anos de idade e 60 anos de idade;
- Quantificar as CDs maduras e imaturas no CECO em três diferentes faixas etárias.
- Verificar se em pacientes 60 anos de idade com CECO as CDs maduras e imaturas estão alteradas quantitativamente, quando comparadas com pacientes < 40 anos de idade e 40 até < 60 anos de idade.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos físicos aos indivíduos uma vez que o procedimento cirúrgico e o diagnóstico já foram realizados. Há o risco no manuseio de dados confidenciais dos prontuários odontológicos dos pacientes, mas os dados serão mantidos em sigilo e a identidade do paciente não será revelada. Somente os pesquisadores envolvidos no projeto terão acesso aos dados, que serão utilizados apenas para fins de pesquisa.

Benefícios:

Os benefícios deste estudo estão relacionados à contribuição para o entendimento da relação entre imunossenescência e a presença e/ou localização de subgrupos de CDs e seus estados de ativação no CECO em diferentes faixas etárias, permitindo uma melhor compreensão da etiopatogênese desta doença.

Os riscos e benefícios estão adequados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão utilizados neste estudo espécimes de biópsias já realizadas na Clínica de Estomatologia da UFVJM para o diagnóstico de CECO, que estão catalogadas e armazenadas em blocos de parafina, no Laboratório de Patologia Oral desta instituição. Os pacientes foram informados, previamente à realização da biópsia, dos riscos para a realização do procedimento cirúrgico, tais como: hemorragia, edema e dor. Assinaram também um termo de consentimento que é anexado à ficha de biópsia (Anexo A) autorizando a utilização da peça biopsiada e dos dados dos prontuários para trabalhos de pesquisa na instituição. Dados demográficos (idade e gênero), hábitos sociais (consumo de tabaco e álcool) e estágio da doença de acordo com os critérios da União Internacional de Controle do Câncer (UICC) e classificação TNM de tumores malignos, serão coletados dos prontuários já preenchidos e arquivados na Clínica de Estomatologia da UFVJM (ANEXO B). As lâminas coradas em H&E serão revisadas por dois patologistas orais e os tumores serão classificados em bem diferenciados, moderadamente ou pobremente diferenciados. Os resultados serão comparados entre os grupos de pacientes selecionados dos arquivos do Laboratório de Patologia Oral da UFVJM, sendo

considerados local do tumor, grau histopatológico e estágio clínico da doença no momento do diagnóstico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: Projeto de Pesquisa, Folha de Rosto, Cronograma. O TCLE não foi apresentado, pois pela característica do projeto (coleta de dados em banco de biópsias) é necessária a dispensa do TCLE.

A carta de anuência do local aonde será realizada a coleta de dados foi assinada pela chefia imediata.

Recomendações:

- Segundo a Carta Circular nº. 003/2011/CONEP/CNS, de 21/03/11, há obrigatoriedade de rubrica em todas as páginas do TCLE pelo sujeito de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador, que deverá também apor sua assinatura na última página do referido termo.

- Relatório final deve ser apresentado ao CEP ao término do estudo em 20/01/2017. Considera-se como antiética a pesquisa descontinuada sem justificativa aceita pelo CEP que a aprovou.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto atende aos preceitos éticos para pesquisas envolvendo seres humanos preconizados na Resolução 466/12 CNS.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_610743.pdf	23/11/2015 18:01:41		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AutorizacaoClinica.pdf	23/11/2015 17:57:35	Ana Terezinha Marques Mesquita	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa.pdf	18/10/2015 16:24:58	Ana Terezinha Marques Mesquita	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projetocompleto.pdf	18/10/2015 16:24:11	Ana Terezinha Marques Mesquita	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_laboratorio.pdf	18/10/2015 16:22:20	Ana Terezinha Marques Mesquita	Aceito
Folha de Rosto	FolhadeRosto.pdf	16/10/2015 21:46:04	Ana Terezinha	Aceito

			Marques Mesquita	
--	--	--	---------------------	--

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

DIAMANTINA, 25 de novembro de 2015

Assinado por:
Disney Oliver Sivieri Junior
(Coordenador)

ANEXO D - GUIA PARA AUTORES - ORAL ONCOLOGY

**ORAL ONCOLOGY**

A Journal Related to Head & Neck Oncology

**AUTHOR
INFORMATION PACK****TABLE OF CONTENTS**

- **Description p.1**
- **Impact Factor p.2**
- **Guide for Authors p.2**

ISSN: 1368-8375

**DESCRIPTION**

Oral Oncology is an international interdisciplinary journal which publishes high quality original research, clinical trials and review articles, editorials, and commentaries relating to the etiopathogenesis, epidemiology, prevention, clinical features, diagnosis, treatment and management of patients with **neoplasms** in the **head** and **neck**.

Oral Oncology is of interest to head and neck surgeons, radiation and medical oncologists, maxillofacial surgeons, oto-rhino-laryngologists, plastic surgeons, pathologists, scientists, oral medical specialists, special care dentists, dental care professionals, general dental practitioners, public health physicians, palliative care physicians, nurses, radiologists, radiographers, dieticians, occupational therapists, speech and language therapists, nutritionists, clinical and health psychologists and counselors, professionals in end of life care, as well as others interested in these fields.

Basic, translational, or clinical Research or Review papers of high quality and that make a contribution to new knowledge are invited on the following aspects of neoplasms arising in the head and neck (including lip, tongue, oral cavity, oropharynx, salivary glands, sinuses, nose, nasopharynx, larynx, skull base, thyroid, and craniofacial region, and the related hard and soft tissues and lymph nodes):

- Etiopathogenesis**: natural history of cancer and pre-cancer; basic pathology, metastatic mechanisms; genetic changes; cellular and molecular changes; microorganisms; growth factors, adhesion and other molecules
- Epidemiology**; risk factors; biomarkers; protective factors; geographic factors; prevention; screening and intervention
- Clinical features; **orofacial** effects of neoplasms at both local and distant sites; tumor staging and grading
- Diagnosis; **detection** of **cancer** and pre-cancer; cellular and molecular markers for diagnosis; advances in **imaging** and other functional diagnostic modalities for cancer and pre-cancer
- Management** and **Prognosis**; clinical, cellular and molecular markers for prognosis; **treatment** options including surgical, lasers, photodynamic therapy, cryosurgery, microvascular and other forms of surgery, medical, radiotherapy, chemotherapy, immunotherapy, biological and gene therapy advances; molecular targets and new therapeutics (new cytotoxics and molecular-targeted therapies); multimodality treatment; advances in reconstruction and rehabilitation, including flaps and grafts, alloplasty, bone and connective tissue biology; multidisciplinary teamwork in cancer care and **oral health care**.
- Quality of life issues; issues of consent; psychosocial aspects; patient and health professional information; patient involvement; psychological interventions, improving outcomes; the prevention, diagnosis and management of complications, including, pain, hemorrhage, dysfunction, deformity, osteoradionecrosis, xerostomia, and others; rehabilitation; palliative and end of life care; and support teamwork.

IMPACT FACTOR

2015: 4.286 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Types of paper

Oral Oncology accepts the following article types for publication:

Editorial:

Authors who are considering submitting an editorial should contact the Editor-in-Chief with a brief outline of the proposed contribution before submission. Editorials are welcome on any topic; however, they may also be related to work previously published in Oral Oncology. **Editorials have no abstract and no keywords, and are usually restricted to 1500 words, up to 10 references and up to 2 tables or figures if not agreed otherwise with the Editor-in-Chief.** The Editor-in-Chief can be contacted at ooncology@elsevier.com.

Original Research Articles:

Original research articles present results of original epidemiology and public health, basic, clinical and/or translational (basic research with clinical applications) research. This article focuses on new data collected by the author(s) during the course of a epidemiology and public health research; basic investigation; clinical trial; or translational research, although other studies may be cited for support. Original research articles, which have not been published previously, except in a preliminary form, may be submitted as original full-length research papers. The article should contain the following sections: Title Page, Abstract, Conflict of Interest Statement, Introduction, Patients (or Materials) and Methods, Results, Discussion, and Conclusion. Mechanics: **Research articles should contain an abstract, a list of up to 10 keywords and have a limit of 3,500 words, 7 figures and/ or tables, and 60 references.**

Review Articles:

Review articles that are topical and a critical assessment of any aspect of head and neck are welcome. Review articles collate, describe, and evaluate prior publications of important head and neck subjects, accompanied by critical analysis leading to rational conclusions. These Reviews should contain very little, if any, original data from an author's own study; however, such data can be used to support the overall thesis of the article. We also accept targeted mini-reviews that cover specific topics or therapies as well as meta-analyses. Mechanics: **Review articles should contain a short abstract stating the goal of the review, an introduction, discussion, and conclusion. Review articles can contain up to 5,000 words, 7 figures and/or tables, and 120 references.**

Perspectives:

Perspectives are more focused than reviews and seek to review a topic from a particular view or opinion. Perspectives should review a particular field to identify outstanding issues and/or challenges and propose new hypotheses or directions. A Perspective may highlight emerging science, controversial opinions, or issues within the field and seek to address these controversies. They may be accepted from a single individual or a team. Mechanics: **Perspectives should contain a short abstract stating the goal of the review, an**

introduction, discussion, and conclusion. Perspective articles are limited to 2000 words, 3 figures and/or tables, and 45 references.

Letters to the Editor:

Letters to the Editor relating to published work in Oral Oncology or other topics of interest including unpublished original research are welcome. If accepted Letters are published online only. Mechanics: **Letters should not exceed 1,000 words in length and can contain up to 2 figures and/or tables.**

After reading the Guide for Authors, please visit our online submission system to submit your manuscript: <http://ees.elsevier.com/oo>.

Page charges

This journal has no page charges.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Conflict of interest

By means of a "Conflict of interest statement", all authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organisations that could inappropriately influence

(bias) their work. If there are no conflicts of interest, please state "None declared". This document should be found as a separate page within the manuscript and placed directly below the title page.

Role of the Funding Source

All sources of funding should be declared as an acknowledgment at the end of the text.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see 'Multiple, redundant or concurrent publication' section of our ethics policy for more information), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck.

Authorship and acknowledgments

All authors must meet the ICMJE authorship criteria (http://www.icmje.org/ethical_1author.html). The corresponding author must submit a completed Author Form with their submission. The form must be signed by the corresponding author on behalf of all authors and can be scanned and uploaded to EES. If you are unable to upload your Author Form to EES, please contact the Editorial Office (ooncology@elsevier.com) for further information. No subsequent change in authorship will be possible.

Reporting clinical trials

Randomized controlled trials should be presented according to the CONSORT guidelines. At manuscript submission, authors must provide the CONSORT checklist accompanied by a flow diagram that illustrates the progress of patients through the trial, including recruitment, enrollment, randomization, withdrawal and completion, and a detailed description of the randomization procedure. The CONSORT checklist and template flow diagram are available online.

Registration of clinical trials

Registration in a public trials registry is a condition for publication of clinical trials in this journal in accordance with International Committee of Medical Journal Editors recommendations. Trials must register at or before the onset of patient enrolment. The clinical trial registration number should be included at the end of the abstract of the article. A clinical trial is defined as any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects of health outcomes. Health-related interventions include any intervention used to modify a biomedical or health-related outcome (for example drugs, surgical procedures, devices, behavioural treatments, dietary interventions, and process-of-care changes). Health outcomes include any biomedical or health-related measures obtained in patients or participants, including pharmacokinetic measures and adverse events. Purely observational studies (those in which the assignment of the medical intervention is not at the discretion of the investigator) will not require registration.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal. More information.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

After acceptance, open access papers will be published under a noncommercial license. For authors requiring a commercial CC BY license, you can apply after your manuscript is accepted for publication.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through universal access programs.

- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is **USD 2500**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Publishing Campus

The Elsevier Publishing Campus (www.publishingcampus.com) is an online platform offering free lectures, interactive training and professional advice to support you in publishing your research. The College of Skills training offers modules on how to prepare, write and structure your article and explains how editors will look at your paper when it is submitted for

publication. Use these resources, and more, to ensure that your submission will be the best that you can make it.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Informed consent and patient details

Studies on patients or volunteers require ethics committee approval and informed consent, which should be documented in the paper. Appropriate consents, permissions and releases must be obtained where an author wishes to include case details or other personal information or images of patients and any other individuals in an Elsevier publication. Written consents must be retained by the author and copies of the consents or evidence that such consents have been obtained must be provided to Elsevier on request. For more information, please review the Elsevier Policy on the Use of Images or Personal Information of Patients or other Individuals. Unless you have written permission from the patient (or, where applicable, the next of kin), the personal details of any patient included in any part of the article and in any supplementary materials (including all illustrations and videos) must be removed before submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Submit your article

Please submit your article via <http://ees.elsevier.com/oo>.

Referees

Please submit the names and institutional e-mail addresses of several potential referees. For more details, visit our Support site. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

Online-only publication

Oral Oncology offers authors the opportunity to select online-only publication as their preferred option for publishing original research papers in the journal, rather than print publication. Errata and corrigenda will be published online-only and will not appear in print.

Any material which is published online-only will be published online on ScienceDirect as paginated and fully citable electronic article. It will be listed in the contents page of a printed issue and the full citation and abstract will be published in print. The citation and abstract of the paper will also still appear in the usual abstracting and indexing databases, including PubMed/Medline, Current Contents/ Clinical Medicine and the Science Citation Index.

Authors will be asked to select which publication option they would prefer when submitting their paper to the Editorial Office.

Prior to Submission

Oral Oncology will consider manuscripts prepared according to the guidelines adopted by the International Committee of Medical Journal Editors ("Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals", available as a PDF from <http://www.icmje.org>). Authors are advised to read these guidelines.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

LaTeX

You are recommended to use the Elsevier article class `elsarticle.cls` to prepare your manuscript and BibTeX to generate your bibliography.

Our LaTeX site has detailed submission instructions, templates and other information.

Article structure

Subdivision - unnumbered sections

Divide your article into clearly defined sections. Each subsection is given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line. Subsections should be used as much as possible when crossreferencing text: refer to the subsection by heading as opposed to simply 'the text'.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate

address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- ***Corresponding author.*** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**

- ***Present/permanent address.*** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

- ***Word Count.*** Please include a word count on your Title Page. Your word count should exclude the abstract, keywords, references, tables and figures.

Abstract

A concise and factual abstract of no more than 250 words is required. The abstract must be **structured for original research articles and articles reporting the results of clinical trials.** The abstract should be divided by subheadings as follows: Objectives, Materials and Methods, Results and Conclusion.

The abstract **should not be structured for review articles.** The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separate from the article, so it must be able to stand alone.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h \times w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for Original Research Articles, Review Articles, and Perspectives. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

See: <http://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract provide a maximum of ten keywords, to be chosen from the Medical Subject Headings from Index Medicus. These keywords will be used for indexing purposes. It is usually necessary to include keywords such as Oral Cancer, or Head and Neck cancer.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. *Formats*

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi. TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Illustration services

Elsevier's WebShop offers Illustration Services to authors preparing to submit a manuscript but concerned about the quality of the images accompanying their article. Elsevier's expert illustrators can produce scientific, technical and medical-style images, as well as a full range of

charts, tables and graphs. Image 'polishing' is also available, where our illustrators take your image(s) and improve them to a professional standard. Please visit the website to find out more.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text. Place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article.

Table footnotes

Indicate each footnote in a table with a superscript lowercase letter.

Figure Captions, Tables, Figures and Schemes

Present these, in this order, at the end of the article. They are described in more detail below. Highresolution graphics files must always be provided separate from the main text file.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication and a copy of the title page of the relevant article must be submitted.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/oral-oncology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference Style

Note: For the purposes of using software to format references, please use the AMA reference style.

Text: Indicate references by number(s) in square brackets in line with the text. The actual authors can be referred to, but the reference number(s) must always be given.

List: Number the references (numbers in square brackets) in the list in the order in which they appear in the text.

Examples:

Reference to a journal publication:

[1] Van der Geer J, Hanraads JAJ, Lupton RA. The art of writing a scientific article. *J Sci Commun* 2010;163:51–9.

Reference to a book:

[2] Strunk Jr W, White EB. *The elements of style*. 4th ed. New York: Longman; 2000.

Reference to a chapter in an edited book:

[3] Mettam GR, Adams LB. How to prepare an electronic version of your article. In: Jones BS, Smith RZ, editors. *Introduction to the electronic age*, New York: E-Publishing Inc; 2009, p. 281–304.

Note shortened form for last page number. e.g., 51–9, and that for more than 6 authors the first 6 should be listed followed by 'et al.' For further details you are referred to 'Uniform Requirements for Manuscripts submitted to Biomedical Journals' (*J Am Med Assoc* 1997;277:927–34) (see also http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html).

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article

are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including theInternet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required. For any further information please visit our Support Center.

Word limits

Editorials submitted to the journal must be 1,500 words in length or less. Original research articles submitted to the journal must be 3,500 words in length or less. Review articles submitted to the journal must be 5,000 words in length or less. Perspectives submitted to the journal must be 2,000 words in length or less. Letters to the Editor must be 1,000 words in length or less. All word counts are excluding the abstract, keywords, references, tables and figures.

Presentation of Manuscript

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Italics are not to be used for expressions of Latin origin, for example, *in vivo*, *et al.*, *per se*. Use decimal points (not commas); use a space for thousands (10 000 and above).

Language Polishing

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and postsubmission please visit <http://www.elsevier.com/wps/find/authorshome.authors/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms and Conditions: http://www.elsevier.com/wps/find/termsconditions.cws_home/termsconditions

Provide the following data on the title page:

Title: Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.

Author names and affiliations: Where the family name may be ambiguous (e.g., a double name), please indicate this clearly. Present the Authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the Author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and, if available, the e-mail address of each Author.

Corresponding Author: Clearly indicate who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the e-mail address and the complete postal address.**

Present/permanent address: If an Author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a "Present address" (or "Permanent address") may be indicated as a footnote to that Author's name. The address at which the Author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from

the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive 25 free paper offprints, or alternatively a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Track your submitted article

Track your accepted article

You are also welcome to contact the Elsevier Support Center.