

Avaliação Comparativa da Densidade de Células Dendríticas CD1a+ em Pacientes com Carcinoma Espinocelular de Boca

Allisson Filipe Lopes Martins¹, Nádia do Lago Costa², Aline Carvalho Batista³

Faculdade de Odontologia

allissonfilipe@hotmail.com e ali.caba@uol.com.br

PALAVRAS-CHAVE: Células dendríticas, carcinoma espinocelular

Revisado pelo orientador e doutoranda envolvida.

¹Graduando do curso de Odontologia da FO/UFG

²Doutoranda em Ciências da Saúde da FM/UFG

³Prof^a. Dr^a. do Departamento de Estomalogia da FO/UFG

INTRODUÇÃO

O Carcinoma Espinocelular (CEC) de boca é uma neoplasia maligna que se origina no epitélio de revestimento oral e pode acometer tanto a cavidade oral (língua, assoalho da boca, gengiva, mucosa bucal e palato duro) como o vermelhão do lábio (BARNES, 2005; INCA, 2010). O tabagismo e o etilismo compreendem os fatores mais comumente associados ao aumento do risco de CEC de cavidade oral (MASSANO et al., 2006; PINDBORG & WAHI; WAHI, 1968), entretanto, é a radiação solar, associada ou não ao fumo, que exerce função precípua na patogênese do CEC de lábio (INCA, 2010; SOUZA et al., 2011; ALHO et al., 2000).

O CEC de lábio difere do CEC de cavidade oral não apenas pela localização ou agente etiológico associado, mas também pelo comportamento clínico menos agressivo, evolução clínica mais lenta e menor índice de metástases para linfonodos cervicais (BATISTA et al., 2010; LEITE & KOIFMAN S., 1998; MASSANO et al., 2006). Corroborando com isso, recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou que os pacientes com CEC de lábio apresentaram uma maior densidade de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (LTC) quando comparado aos pacientes com CEC de cavidade oral (ZANCOPE et al., 2010; COSTA et al., 2011).

Os LTCs são as principais células do sistema imune específico responsáveis pela destruição das células tumorais (ABBAS & LICHTMAN, 2008; GRAUBERT & LEY, 1996). Todavia, para que respostas imunes específicas sejam desenvolvidas é necessário que antígenos protéicos sejam capturados e apresentados aos linfócitos T *naives* e de memória. Esta função é desempenhada pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) e, dentre elas destacam-se as células dendríticas (CD) (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; ITSUMI & TATSUGAMI, 2010). As CDs imaturas (CD1a⁺) originam-se de precursores na medula óssea e através da corrente sanguínea 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 à medida que essa migração ocorre, amadurecem e passam a expressar elevado nível de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC classe I e II), moléculas de adesão e co-estimuladores, que são fundamentais na ativação de LTCs a partir de células T *naives* e, portanto, no direcionamento de uma resposta imunológica local antitumoral mais efetiva (SAKAKURA. et al., 2005; REICHERT et al., 2001; BANCHEREAU & STEINMAN, 1998).

Com relação ao estudo do CEC de boca, há na literatura alguns trabalhos que investigaram a participação das CDs na imunidade antitumoral. Em um desses estudos,

Kikuchi et al. (2002) demonstraram, através da imunistoquímica com os anticorpos S-100, CD1a e CD83 (CDs maduras), que no CEC de cavidade oral o número de CDs S100⁺ e CD1a⁺ foi significativamente maior nos pacientes que não apresentaram metástase para linfonodos regionais quando comparado aos metastáticos, e que os pacientes metastáticos tiveram um maior número de CDs CD83⁺ (dendríticas maduras) (KIKUCHI et al., 2002). Adicionalmente, Goldman et al. (1998) demonstraram que pacientes como CEC de boca com uma alta quantificação de CDs CD1a⁺, apresentaram um melhor prognóstico, com maior taxa de sobrevida e menor índice de recidiva (GOLDMAN et al., 1998). Em estudo similar, Wei e Tahan (1998) confirmaram que uma maior densidade de células S100⁺ correlaciona-se com menor taxa de metástase em pacientes com CEC de lábio, e, ainda, que as CDs S100⁺ poderiam atuar como importante fator de prognóstico em pacientes com CEC de boca, o que também foi evidenciado por Reichert et al. (2000) (WEI & TAHAN, 1998; REICHERT et al., 2000). Mais recentemente, O'Donnell et al. (2007) evidenciaram uma alta densidade de CDs imaturas e poucas maduras em pacientes com CEC de cavidade oral, demonstrando, que a resposta das CDs ao tumores pode ser prejudicada em várias etapas e que, portanto, respostas imunocitotóxicas seriam comprometidas (O' DONNEL et al., 2007).

Dessa forma, considerando os dados da literatura científica sobre a importância das CDs na imunidade tumoral e tendo em vista os poucos trabalhos científicos que analisaram essas células em pacientes com CEC de boca, no presente estudo, pretende-se avaliar as CDs imaturas no CEC de boca.

OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi identificar e quantificar células dendríticas CD1a⁺, em amostras de CEC de cavidade oral, lábio e mucosa oral clinicamente saudável (controle). A relação da densidade destas células com fatores de prognóstico clínico, tais como tamanho da lesão primária, sobrevida e metástase, e microscópico, como gradação microscópica tumoral segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), invasão local e índice de proliferação celular, foi também investigada.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção da Amostra

Este estudo foi desenvolvido de acordo com as normas do Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (HAJ/ACCG) (protocolo n. 008/2010).

Foram selecionadas as seguintes amostras dos arquivos de blocos e laudos do Serviço de Anatomopatologia e Citopatologia do HAJ/ACCG: 10 amostras de CEC de cavidade oral com metástase (grupo 1); 10 amostras de CEC de cavidade oral sem metástase (grupo 2); 10 amostras de CEC de lábio (grupo 3), selecionou-se ainda do arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFG, 10 amostras de mucosa oral clinicamente e microscopicamente sem alterações (grupo 4) (controle). Adicionalmente, foram incluídas como controle positivo amostras de amígdalas em todas as reações.

Para a seleção dos casos os critérios de inclusão foram: pacientes de ambos os gêneros; acima de 35 anos de idade; submetidos a tratamento cirúrgico de remoção de linfonodo cervical; tamanho do tumor primário T2/T3; gradação tumoral segundo a OMS I/II. Já como critérios de exclusão consideraram-se: pacientes com CEC em outras regiões; pacientes que receberam radioterapia, quimioterapia ou outro tratamento prévio a cirurgia.

Todos os dados clínicos dos pacientes foram obtidos dos prontuários médicos de atendimento e, quando necessário, em consultas aos laudos e lâminas.

Técnicas empregadas

Técnica de rotina (Hematoxilina e Eosina)

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

Técnica Imunoistoquímica

A partir dos casos selecionados, emblocados em parafina, foram obtidos cortes seriados com aproximadamente 3µm de espessura, em micrótomo (Leica), montados em lâminas silanizadas e submetidos à técnica da imunoistoquímica através do método de polímeros Starr Trek Universal HRP Detection System, para identificação dos antígenos CD1a, Ki-67 e ciclina B1. Inicialmente, os cortes sobre as lâminas foram desparafinizados em xilol e hidratados em banhos crescentes de álcool etílico. Em seguida, as lâminas foram incubadas em EDTA (pH=9.0), aquecido à uma temperatura de 95°C, com auxílio de Banho Maria Digital (DeLeo), por 25 minutos, para exposição antigênica. Após lavagem com TBS,

as lâminas foram mergulhadas em peróxido de hidrogênio a 3%, por aproximadamente 45 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com TBS e, em seguida, incubadas com solução para bloqueio das proteínas endógenas (BIOCARE's Background Sniper) por 15 minutos. As lâminas foram então incubadas com os seguintes anticorpos primários: monoclonal de camundongo anti-CD1a humano (MA1- 80170, Thermo Scientific) a uma diluição de 1:50; monoclonal de camundongo anti-Ki-67 humano (MM1, Novocastra) a uma diluição de 1:100; monoclonal de camundongo anti-Ciclina B1 humana (7A9, Novocastra) a uma diluição de 1:40, durante 8 horas à 4⁰C. Passado o tempo, lavagens consecutivas foram realizadas e, posteriormente, as lâminas foram incubadas com o Sistema Trekkie Universal Link por 20 minutos. Novamente as lâminas foram lavadas com TBS e incubadas com o Sistema TrekAvidin-HRP (Label) por 20 minutos. Em seguida, procedeu-se à revelação da reação utilizando o 3.3'-Diaminobenzidina (DAB) em uma solução cromogênica, por 1 minuto à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina, por 30 segundos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água corrente durante 10 minutos, as lâminas foram desidratadas com álcoois, passadas em xilol e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck).

Análise Qualitativa e Quantitativa dos dados

Na avaliação qualitativa investigamos a distribuição e intensidade de imunomarcações das células CD1a⁺, que apresentavam morfologia de células dendríticas, tanto na região intratumoral (em íntima associação com as células neoplásicas) quanto no estroma peritumoral. Após a análise qualitativa, a densidade das células CD1a⁺ foi determinada em ambas as regiões anteriormente citadas. Esta análise foi realizada utilizando um microscópio óptico, contendo um retículo de integração em rede quadrada acoplado (CARL ZEISS, Germany) na objetiva de 40x. A área do retículo no aumento de 40x corresponde a 0,0961mm². Para cada amostra, foram analisados 10 campos microscópicos alternados, perfazendo uma área total de 0,961mm².

Análise Estatística dos Dados

As análises comparativas entre os grupos foram realizadas utilizando o teste estatístico não-paramétrico Mann Whitney. Os resultados foram expressos como média ± DP e o nível de significância estatística foi aceito quando P<0.05. O teste de Kaplan Meier foi

utilizado para a curva de sobrevivência dos pacientes. Os testes estatísticos foram aplicados utilizando-se o programa SPSS 10.0 for Windows.

RESULTADOS

A análise de 30 pacientes com CEC de boca (20 CEC de cavidade oral e 10 CEC de lábio) demonstrou predomínio do gênero masculino em ambos os grupos, sendo a localização mais freqüente a língua para CEC de cavidade oral e lábio inferior para CEC de lábio. As principais características clínicas e microscópicas analisadas estão resumidas abaixo na tabela 1.

Tabela 1: Principais características clínicas (%) e microscópicas (%) dos pacientes com CEC de cavidade oral (n=20) e lábio (n=10).

Características Clínicas		CEC Cavidade (%)	CEC Lábio (%)
Idade	≤57 anos	35	30
	>57 anos	65	70
Grupo Étnico	Leucoderma	45	70
	Feoderma	25	30
	Melanoderma	30	0
Gênero	Masculino	65	70
	Feminino	35	30
Metástase	Sim	50	0
	Não	50	100
Óbito	Sim	35	0
	Não	65	100
Localização	Lábio Inferior	-	90
	Lábio Superior	-	10
	Língua	50	-
	Soalho bucal	15	-
	Outros	35	-

Consumo de Tabaco	Sim	90	50
	Não	10	50
Consumo de Álcool	Sim	70	40
	Não	30	60
Tempo de sobrevida (meses)	≥ 48	35	90
	≤ 48	65	10
Proporção de ciclina B1 (média = 10,25)	$\geq 10,25$	60	40
	$\leq 10,25$	40	60
Proporção de Ki-67 (média = 13,51)	$\geq 13,51$	70	40
	$\leq 13,51$	30	60

As células CD1a⁺ imunomarcadas, apresentaram características morfológicas de células dendríticas, com projeções citoplasmáticas e coloração marrom/acastanhada (Figura 1).

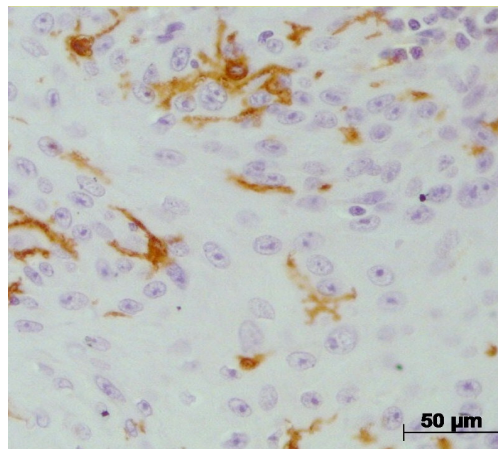


Figura 1: A fotomicroscopia ilustra células dendríticas imaturas CD1a⁺ (coradas em marrom) em CEC de cavidade oral. Imunoistoquímica, aumento original de 400x.

Observou-se ainda durante a análise qualitativa, que as células imunomarcadas concentraram-se predominantemente na região intratumoral, em íntima associação com as células neoplásicas, quando se comparou com a região peritumoral em todos os grupos analisados (Figura 2 A e B).

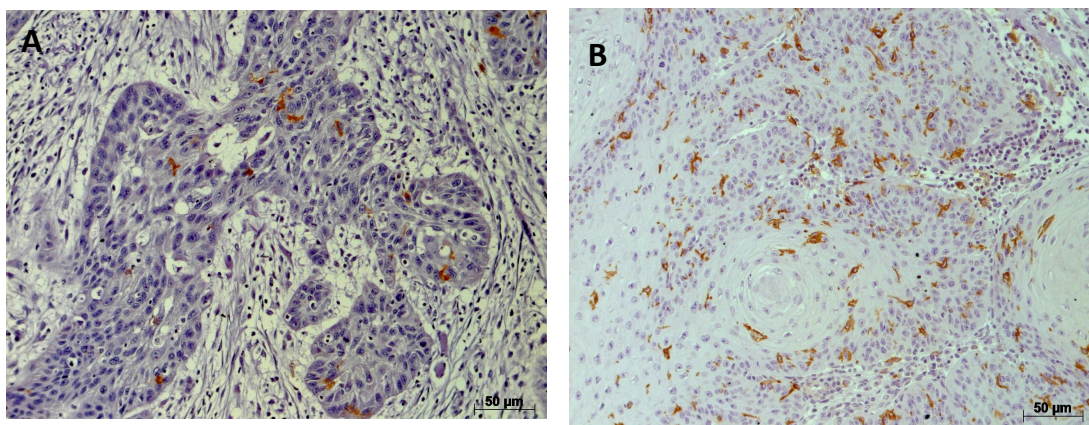


Figura 2: As fotomicroscopias ilustram células CD1a⁺ (coradas em marrom) presentes no parênquima e estroma tumoral do CEC de cavidade oral (A) e lábio (B). Imunoistoquímica, aumento original de 200x (A e B).

A análise quantitativa revelou que a densidade das CDs nas regiões peri- e intratumoral foi maior no CEC de lábio quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$ para a região peritumoral). Adicionalmente, a densidade de CDs na região intratumoral foi significativamente menor no CEC de cavidade oral sem metástase quando comparado ao CEC de lábio e controle ($p < 0,05$).

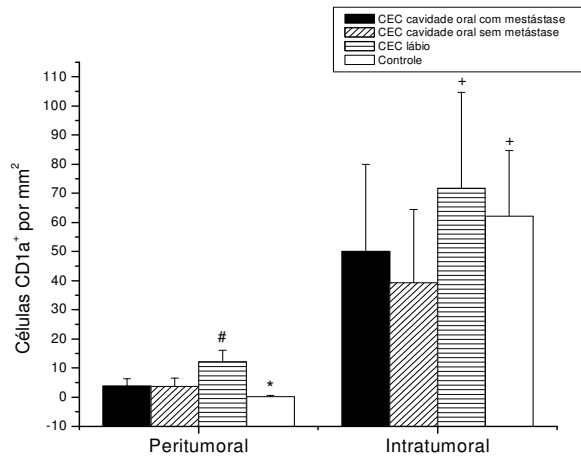


Figura 3: Densidade de células dendríticas CD1a⁺ por mm², na região peritumoral e intratumoral, de CEC de lábio, CEC de cavidade oral com e sem metástase e mucosa oral saudável (controle). Os resultados estão expressos como a média das densidades/mm² ± DP. *P<0.05 quando comparado ao demais grupos; #P<0.05 quando comparado ao CEC de cavidade oral com e sem metástase e +P<0.05 quando comparado ao CEC de cavidade oral sem metástase (teste de Mann-Whitney).

A análise da sobrevida demonstrou que os pacientes com CEC de cavidade oral que apresentaram alta densidade de CDs demonstraram uma tendência para maior tempo de sobrevida quando comparado aos pacientes com baixa densidade dessas células.

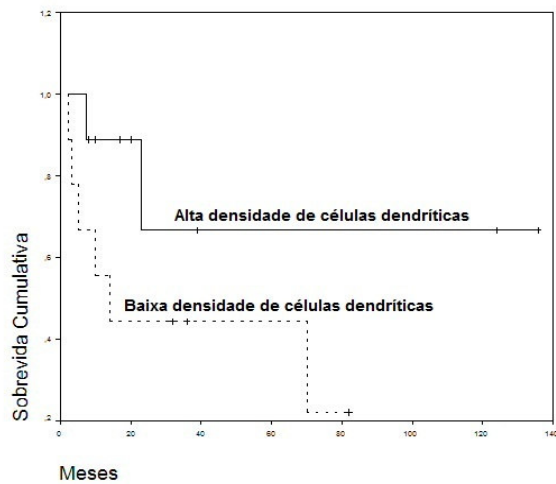


Figura 4. Representação gráfica da curva de sobrevida dos pacientes de acordo com as densidade de células CD1a⁺ em amostras de CEC de cavidade oral (Kaplan-Meier, Log Rank, P > 0,05).

DISCUSSÃO

No microambiente tumoral estão presentes células e mediadores químicos que podem contribuir tanto para progressão do câncer quanto para sua inibição e controle (BALKWILL & COUSSENS, 2004; OLIVEIRA-NETO et al., 2007; VAN KEMPEN et al., 2003; VISSER & COUSSENS, 2005). Dentre as células que atuam no combate tumoral destacam-se as CDs, células especializadas na captura, processamento e apresentação de antígenos e células tumorais aos linfócitos T *naïves*, os quais são fundamentais no desenvolvimento de uma resposta imune citotóxica efetiva (BANCHEREAU, 1998). Nesse contexto, o presente trabalho avaliou a densidade de células dendríticas imaturas CD1a⁺ no CEC de lábio e de cavidade oral na região peri- e intra-tumoral.

Pode-se verificar um maior número de CD no ambiente intratumoral do que no ambiente peritumoral, o que foi observado em outros estudos com diversos tipos de carcinoma, como o renal (MIDDEL et al., 2010) e o de mama (BELL et al., 1999), e em estudo com linfoma de células B (CHANG et al., 2007). Acredita-se que a presença dessas células dentro do tumor não seja somente devido à origem epitelial, mas implica em constante recrutamento dessa linhagem celular para gerar resposta antitumoral (CHANG et al., 2007; MIDDEL et al., 2010; BELL et al., 1999) ou devido a um impedimento, induzido pelo tumor, da maturação dessas células (BELL et al., 1999).

Adicionalmente, nossos resultados evidenciaram uma maior densidade de CDs CD1a⁺ no CEC de lábio quando comparado ao CEC de cavidade oral. Recentemente demonstramos que o CEC de lábio apresenta um melhor prognóstico clínico quando comparado com CEC de cavidade oral, com menor índice de metástase e maior tempo de sobrevida (BATISTA et al., 2009). Adicionalmente, nosso grupo de pesquisa também investigou comparativamente células CD8⁺, bem como das enzimas citotóxico produzido por essas células em CEC de lábio e de cavidade oral com e sem metástase e demonstrou que a densidade dessas células e grânulos era significativamente maior no CEC de lábio quando comparado ao de cavidade oral sem e com metástase (ZANCOPÉ et al., 2010; COSTA et al., 2011). Nesse mesmo estudo, os autores demonstram uma relação positiva entre a densidade de células CD8⁺ e a sobrevida dos pacientes com CEC de cavidade oral (ZANCOPÉ et al., 2010). Assim, considerando os achados do presente estudo e demais estudos citados, sugerimos que esteja ocorrendo uma melhor apresentação de células e antígenos tumorais, com conseqüente resposta imunológica antitumoral mais efetiva no microambiente tumoral do CEC de lábio.

Verificou-se, ainda, uma alta densidade de células dendríticas CD1a⁺ nas amostras de mucosa oral clinicamente saudável quando comparado ao CEC de cavidade oral, em contra-partida evidenciou-se uma menor densidade dessas células nas amostras controles se comparado ao CEC de lábio. Esses últimos resultados são condizentes aos relatados por Hillenbrand et al. (1999), os quais tendo como foco de estudo o câncer de mama evidenciaram que há uma maior densidade de células CD1a⁺ em tecidos tumorais quando comparados aos tecidos normais. Acredita-se que diante de alterações morfológicas e funcionais apresentadas pelas células neoplásicas, as CDs seriam atraídas para o ambiente tumoral e contribuiriam para uma resposta imune mais efetiva contra o tumor (HILLENBRAND et al., 1999).

Sabe-se que o fumo e o álcool são os principais fatores etiológicos responsáveis pela patogênese do CEC de cavidade oral (MASSANO et al., 2006; PINDBORG & WAHI P. N., 1968). Recentemente Souto *et al.* evidenciaram maior número de CDs em epitélio oral de pacientes não fumantes do que em pacientes fumantes (SOUTO et al., 2011), sugerindo, assim, a existência do efeito nocivo do tabaco nas CD. Além disso, estudos com pacientes portadores de doença obstrutiva pulmonar crônica, mostraram que a possível interação entre o tabaco e CDs contribui para a não resolução da doença quando o hábito de fumar persiste (VAN POTTELBERGE et al., 2010; VASSALLO et al., 2010; SU & XU, 2010). Adicionalmente, o álcool é capaz de promover alterações na migração das CDs e atrasos na ativação da resposta imune adaptativa por estimulação deficiente de LT *naive*, em estudo realizado em camundongos (NESS et al., 2008).

Ao contrário do CEC de cavidade oral a radiação solar é o principal agente responsável pela patogênese do CEC de lábio (INCA, 2010; SOUZA et al., 2011; ALHO et al., 2000). As CDs são facilmente afetadas por radiação UV, pois essa é capaz de promover danos na capacidade migratória dessas células (NAKAGAWA et al., 1999), apresentação de antígenos (MORISON et al., 1984 apud TIMARES, L. et al., 2008), e podem até mesmo induzir a tolerância (NAKAGAWA et al., 1999) e danos no DNA (KÖLGEN W. et al., 2002 apud TIMARES, L. et al., 2008). Sugere-se que a exposição solar afeta a resposta imune das CDs favorecendo aparecimento do CEC de lábio. No entanto, mais estudos são necessários para analisar a relação desses agentes patológicos ao CEC de boca.

Identificou-se, ainda, que os pacientes com CEC de cavidade oral que continham um maior número de CDs no microambiente tumoral apresentaram uma tendência a maior tempo de sobrevivência. Nossos achados corroboram com os de Goldman et al. (1998), Reichert et al. (2000), Wei and Tahan (1998) e Kikuchi et al. (2002), os quais também relacionaram

positivamente a quantidade de células dendríticas CD1a⁺ com um melhor prognóstico e maior tempo de sobrevivência dos pacientes acometidos com esta patologia (REICHERT et al., 2000; WEI & TAHAN, 1998; KIKUCHI et al., 2002).

CONCLUSÃO

Os achados sugerem que o número aumentado de CDs imaturas CD1a⁺ no microambiente do CEC de boca possa contribuir para uma melhor ativação da resposta imune antitumoral e, também, melhor prognóstico. Além disso, o número aumentado dessas células na região intratumoral, sugere a necessidade de contato com células tumorais para ativação da resposta imune. Propõe-se estudo sobre o estado de ativação dessas células no tumor primário e linfonodos regionais, para melhor elucidar o papel das CDs no combate tumoral e efeitos deletérios que o tumor possa causar nessas células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN A. H.; PILLAI S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ALHO O. P. et al. Lip cancer in Northern Finland: changing incidence and clinical characteristics. **J Oral Pathol Med**, v. 29, p. 299-302, 2000.

BALKWILL F.; COUSSENS L. M. Cancer: An inflammatory link. **Nature**, v. 431, p. 461-6, 2004.

BANCHEREAU J.; STEINMAN R. M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature**, v. 392, p. 245-52, 1998.

BARNES L.; EVESON J.W.; REICHERT P.; SINDRANSKY D. **Pathology & genetics head and neck tumours. World health organization classification of tumours**. In: Slootweg PJ, Eveson JW. Tumours of the oral cavity and oropharynx: Introduction. In: Johnson N et al. Squamous cell carcinoma Lyon: IARC Press, 2005. p.166-75.

BATISTA A. C. et al. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod**, v. 109, p. 74-9, 2010.

BELL D. et al. In breast carcinoma tissue, immature dendritic cells reside within the tumor, whereas mature dendritic cells are located in peritumoral areas. **J Exp Med**, v.10, p. 1417-25, 1999.

CHANG K.C. et al. Distribution patterns of dendritic cells and T cells in diffuse large B-cell Lymphomas correlate with prognoses. **Clin Cancer Res**, v.13, p. 6666-72, 2007.

COSTA N. L. et al. Distinct expression of perforin and granzyme B in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.40, p.380-4, 2011.

GOLDMAN S. A.; BAKER E.; WEYANT R. J.; CLARKE M. R. et al. Peritumoral CD1a-positive dendritic cells are associated with improved survival in patients with tongue carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v.124, p. 641-1998.

GRAUBERT T. A.; LEY T. J. How do lymphocytes kill tumor? **Clin Cancer Res**, v.2, p. 785-9, 1996.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: Incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2010. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/estimativa/2011>> Acesso em: 21 jan. 2011.

ITSUMI M.; TATSUGAMI K. Immunotherapy for renal cell carcinoma. **Clin Dev Immunol**, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022170/?tool=pubmed>>. Acesso em: 31 de maio de 2011.

KIKUCHI K.; KUSAMA K.; TAGUCHI K. et al. Dendritic cells in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Anticancer Res**, v. 22, p. 545-58, 2002.

LEITE I. C. H.; KOIFMAN S. Survival analysis in a sample of oral cancer patients at a reference hospital in Rio de Janeiro, **Brazil. Oral Oncol**, v.34, p. 347-52, 1998.

MASSANO J. et al. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol and Endod**, v. 102, p. 67-76, 2006.

MIDDEL P.; BRAUNECK S.; MEYER W.; RADZUN H. J. Chemokine-mediated distribution of dendritic cell subsets in renal cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 10, n. 578, 2010. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2407/10/578>>. Acesso em: 31 de maio de 2011.

NAKAGAWA S.; KOOMEN C. W.; BOS J. D.; TEUNISSEN M. B. M. Differential Modulation of Human Epidermal Langerhans Cell Maturation by Ultraviolet B Radiation, **J Immunol**, v. 163, p. 5192-5200, 1999.

NESS K. J.; WILKE W. W.; COLEMAN R. A.; COOK R. T.; SCHLUETER A. J. Chronic Ethanol Consumption Decreases Murine Langerhans Cell Numbers and Delays Migration of Langerhans Cells as Well as Dermal Dendritic Cells, **Alcohol Clin Exp Res**, v. 32, p. 667-668, 2008.

O'DONNELL R. K.; MICK R.; FELDMAN M. et al. Distribution of dendritic cell subtypes in primary oral squamous cell carcinoma is inconsistent with a functional response. **Cancer Letters**, v. 255, p. 145-52, 2007.

OLIVEIRA-NETO H. H. et al. Decrease in mast cells in oral squamous cell carcinoma: possible failure in the migration of these cells. **Oral Oncol**, v. 43, p.484-90, 2007.

PINDBORG J. J.; WAHI P. N. **Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. World Health Organization Classification of Tumours.** 2.ed. Berlin: Springer-Verlag, 1997.

REICHERT T. E.; SCHEUER C.; DAY R. 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, p. 2136–47, 2001.

SAKAKURA K. et al. Infiltration of dendritic cells and NK cells into the sentinel lymph node in oral cavity cancer. **Oral Oncol**, v.41, p. 89-96, 2005.

SOUTO G. R.; SEGUNDO T. K.; COSTA F. O.; AGUIAR M. C.; MESQUITA R.A. Effect of smoking on Langerhans and dendritic cells in patients with chronic gingivitis. **J Periodontol**, v. 82, p. 619-25, 2011.

SOUZA R. L. et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. *Med Oral Patol Cir Bucal*, jan. 2011. Disponível em: < <http://www.medicinaoral.com/medoralfree01/aop/16954.pdf>>. Acesso em 30 de maio de 2011.

STEINMAN R. M.; HAWIGER D.; NUSSENZWEIG M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 21:685-711, 2003.

SU Y.; XU Y.; LIU X. Quantitative differentiation of dendritic cells in lung tissues of smokers with and without chronic obstructive pulmonary disease. **Chin Med J**, v. 123, p. 1500-504, 2010.

TIMARES, L.; KATIYAR S.; ELMETS C. A. DNA Damage, Apoptosis and Langerhan cells – Activators of UV-induced Immune Tolerance. **Photochem Photobiol**, v. 84, p. 422-436, 2007.

VAN-KEMPEN L.C.; RUITER D.J.; VAN-MUIJEN G.N.; COUSSENS L.M. The tumor microenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. **Eur J Cell Biol**, v.82, p. 539-48, 2003.

VAN POTTELBERGE G. R et al. Selective accumulation of langerhan-type dendritic cell in small airways of patients with COPD. **Respiratory Research**, v. 11:35, 2010.

VASSALLO R. et al. Cigarette smoke promotes dendritic cell accumulation in COPD; a Lung Tissue Research Consortium study, **Respiratory Research**, v.11:45, 2010.

VISSER K. E.; COUSSENS L. M. The inflammatory tumor microenvironment and its impact on cancer development. **Contrib Microbiol**, v. 13, p. 118-37, 2006.

WAHI P. N. The epidemiology of oral and oropharyngeal cancer: A report of the study in Mainpuri district, Uttar Pradesh, India. **Bull World Health Organ**, v. 38, p.495-521, 1968.

WEI N.; TAHAN S. R. S100+ cell response to squamous cell carcinoma of the lip: inverse correlation with metastasis. **J Cutan Pathol**, v. 25, p. 463-68, 1998.

ZANCOPÉ E. et al. Differential infiltration of CD8+ and NK cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 39, p. 162-7, 2010.