

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

Andréia de Souza Gonçalves, Nádia do Lago Costa, Aline Carvalho Batista

Faculdade de Odontologia

andrea.sg.odonto@gmail.com e ali.caba@uol.com.br

PALAVRAS-CHAVE: Células dendríticas, linfonodos, carcinoma espinocelular de cavidade oral

Revisado pelo orientador
Graduanda do curso de Odontologia da FO/UFG
Doutoranda em Ciências da Saúde da FM/UFG
Profa. Dra. do Departamento de Estomatologia da FO/UFG

1 INTRODUÇÃO

No período de 2010-11 foi desenvolvido o plano de trabalho intitulado “Avaliação comparativa da densidade das células dendríticas CCR7+ no carcinoma espinocelular de cavidade oral e lábio”. Na execução deste, ao término da etapa de padronização do anticorpo CCR7, foi visto que não seria possível distinguir as células dendríticas (CDs) imunomarcadas das células tumorais, pois ambas apresentaram a expressão da molécula CCR7, acrescido ao fato de que as CDs apresentaram características morfológicas que não nos permitiu diferenciá-las das demais células. Assim, o objetivo principal do estudo de investigar comparativamente a presença dessa população celular no carcinoma espinocelular (CEC) de cavidade oral e lábio não pode ser atingido. No entanto, adicionalmente foi realizada uma análise da presença de células dendríticas imaturas (CD1a+) em amostras de linfonodos cervicais removidos de pacientes com CEC primário de cavidade oral, e são os resultados dessa pesquisa que serão apresentados e discutidos no presente relatório final de iniciação científica.

Diante do exposto, o câncer é uma doença emergencial mundial e está entre as causas de óbito mais frequentes no Brasil. Estimativas realizadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelaram uma expectativa de 489.270 novos casos de câncer para o ano de 2011, sendo o câncer de boca o quinto mais comum em homens e o sétimo em mulheres (INCA, 2011).

O termo câncer de boca é uma denominação genérica que inclui tumores de variados perfis histológicos, embora predominantemente se refira ao Carcinoma Espinocelular (CEC), neoplasia maligna que origina-se no epitélio de revestimento e pode acometer a cavidade oral (língua, assoalho da boca, gengiva, mucosa bucal e palato duro) e também o vermelhão do lábio (BARNES et al., 2005; BRENER et al., 2007; INCA, 2011; JORDAN et al., 1997).

Atualmente já se sabe que embora parâmetros clínicos (BARNES et al., 2005; INTERNATIONAL UNION AGAINST CÂNCER, 1987) e microscópicos (ANNEROTH et al., 1987; PINDBORG & WAHI, 1997; SPIRO et al., 1999; VAN DIEST et al., 1998;) sejam de suma importância para avaliação da agressividade tumoral, as imunidades inata e adaptativa também exercem papel preponderante na vigilância imunológica e destruição tumoral (ABBAS et al., 2008; BALKWILL & MANTOVANI, 2001; LIOTTA & KOHN, 2001; VAN KEMPEN et al., 2002; VAN KEMPEN et al., 2003; VISSER & COUSSENS, 2005; VISSER et al., 2006). Nesse contexto, as CDs exercem função precípua na imunidade

antitumoral, principalmente devido sua eficiente capacidade de captura e apresentação de antígenos tumorais aos linfócitos T *naives* presentes nos linfonodos, os quais são capazes de desencadear uma efetiva resposta citotóxica antitumoral (GOLDMAN et al., 1998, KIKUCHI et al., 2002; WEI E TAHAN, 1998) .

As CDs constituem um grupo de células heterogêneo, que origina-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 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 (ABBAS et al., 2008; BANCHEREAU & STEINMAN, 1998; MARTÍN-FONTECHA et al., 2003; REICHERT et al., 2001).

Evidências científicas têm sido levantadas sobre a possível participação das CDs na indução de respostas imunes em vários tipos de câncer. Entre estes, o CEC de boca tornou-se o alvo de estudo de alguns pesquisadores, como por exemplo de Wei e Tahan (1998) que evidenciaram que uma maior densidade de células dendríticas S100+ correlaciona-se com menor taxa de metástase em pacientes com CEC de lábio, e ainda que essas células poderiam atuar como importante fator de prognóstico em pacientes com CEC de boca, o que também foi evidenciado por Reichert et al. (2000) (REICHERT et al. 2000; WEI E TAHAN, 1998). Corroborando com esses estudos, Kikuchi et al. (2002) demonstraram que no CEC de cavidade oral o número de células dendríticas S100+ e CD1a+, na região peritumoral, foi maior nos pacientes que não apresentaram metástase para os linfonodos regionais quando comparado aos que apresentaram metástase, e que os metastáticos tiveram maior número de CDs CD83+ (dendríticas maduras) (KIKUCHI et al., 2002). Mais recentemente, O'Donnell et al. (2007) evidenciaram uma alta densidade de CDs imaturas e poucas maduras em pacientes com CEC de cavidade oral, hipotetizando, desta forma, que a ativação deficiente das CDs associadas a este tumor pode resultar em respostas imunocitotóxicas também comprometidas (O'DONNELL et al., 2007).

Sendo assim, considerando os dados da literatura científica, e sobretudo diante do fato de que poucos pesquisadores têm se dedicado a estudar essa população celular nos linfonodos de pacientes com CEC de cavidade oral, o presente estudo fará uma análise

comparativa da densidade de CDs imaturas (CD1a+) em linfonodos cervicais removidos de pacientes acometidos com tal neoplasia.

2 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi identificar e quantificar, através da técnica de imunistoquímica, células dendríticas imaturas CD1a+, em amostras de linfonodos cervicais removidos de pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) primário de cavidade oral em estágio T3 e T4.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostras Selecionadas

Para este estudo foram selecionadas, dos arquivos de blocos e laudos do Laboratório de Patologia do Hospital Araújo Jorge (HAJ) da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (Aprovação CEP/HAJ n.008/2010), aproximadamente 30 amostras de linfonodos cervicais removidos de pacientes com CEC de boca. Tais pacientes foram diagnosticados, tratados e acompanhados no Serviço de Cabeça e Pescoço do HAJ. Considerando as amostras obtidas, três grupos foram constituídos: grupo 1- amostras de linfonodos não metastáticos de pacientes que não apresentaram nenhum linfonodo metastático (LNM1) (n=10), grupo 2- amostras de linfonodos não-metastáticos (LNM2) (n=10) e grupo 3- amostras de linfonodos metastáticos (LM2) removidos de pacientes portadores de CEC primário de cavidade oral metastático. Os dados clínicos dos pacientes, como gênero, idade, grupo étnico e fatores de risco, foram obtidos dos prontuários médicos de atendimento e, quando necessário, em consulta aos laudos e lâminas.

3.2 Técnicas Utilizadas

3.2.1 Técnica de Rotina (Hematoxilina e Eosina)

O material selecionado, incluído em parafina, foi seccionado em micrótomo (Leica RM2165), obtendo-se de cada bloco cortes consecutivos de 5µm, que foram colocados

sobre lâminas histológicas e corados pelo método de HE. Esses cortes foram utilizados para caracterização microscópica das amostras.

3.2.2 Técnica da 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 imunoistoquímica, utilizando o método do polímero (Starr Trek Universal HRP Detection System), para identificação do antígeno CD1a. 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. Depois, as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-CD1a humano (MA1-80170, Thermo Scientific) a uma diluição de 1:50, durante 18 horas à 4⁰C. Passado o tempo, lavagens consecutivas foram realizadas e, posteriormente, as lâminas foram incubadas com o Sistema Trek Universal Link por 20 minutos. Novamente as lâminas foram lavadas com TBS e incubadas com o Sistema TrekAvidin-HRP (Label) por 20 minutos. Em seguida, procedeu-se à revelação da reação utilizando o 3.3'-Diaminobenzidina (DAB) em uma solução cromogênica, por 1 minuto à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina, por 30 segundos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água corrente por 10 minutos, as lâminas foram desidratadas com álcoois, passadas em xilol e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck).

3.3 Análise Qualitativa e Quantitativa dos Dados

As amostras submetidas à técnica da imunoistoquímica foram avaliadas considerando as células CD1a+. Na avaliação qualitativa investigamos especialmente as células CD1a+ com morfologia de células dendríticas no microambiente de linfonodos cervicais de pacientes com CEC cavidade oral. Após a análise qualitativa, a densidade dessa

população celular foi determinada utilizando-se um microscópio óptico contendo um retículo de integração em rede quadrada (CARL ZEISS, Germany) acoplado na objetiva de 40x. A área do retículo no aumento de 40x corresponde a 0,0961mm². Para cada amostra, foram analisados 10 campos microscópicos alternados, com área total de 0,961 mm².

3.4 Análise Estatística dos Dados

Análises comparativas entre os grupos foram realizadas utilizando os testes estatísticos não-paramétricos Mann Whitney e Wilcoxon. Os resultados foram expressos como média ± DP e o nível de significância estatística foi aceito quando P<0.05. Os testes estatísticos foram aplicados utilizando-se o programa SPSS 10.0 for Windows.

4 RESULTADOS

Os resultados referentes à análise do CCR7 demonstraram que não somente as células dendríticas expressaram a molécula CCR7, mas também as células tumorais (Figura 1).

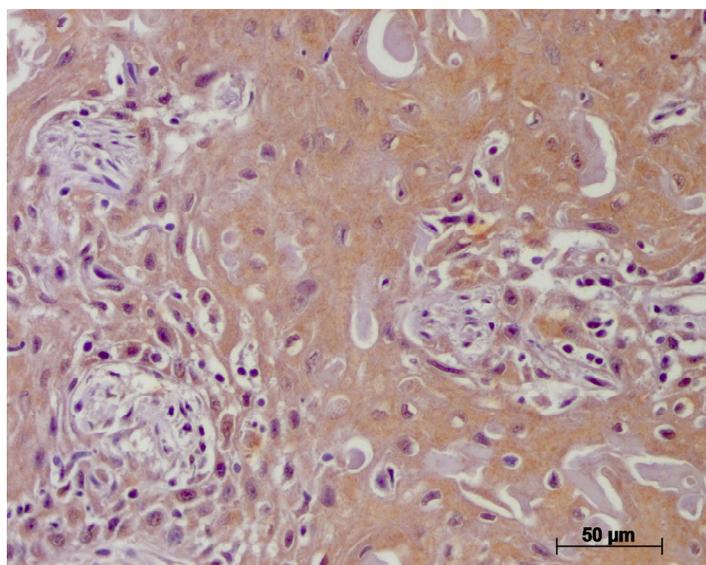


Figura 1. Expressão do marcador CCR7 pelas células tumorais em pacientes com CEC de cavidade oral. Imunoistoquímica, aumento original de 400x.

Com referência a análise dos 30 pacientes selecionados (10 LNM1, 10 LNM2 e 10 LM2), esta revelou predomínio do gênero feminino (60%) nos pacientes com LNM1, enquanto o gênero masculino predominou nos casos de LNM2 (70%) e LM2 (70%). A média

de idade dos pacientes foi de 45 (IC: 24 - 90) anos para os LNM1, e 51,8 (IC: 35 - 74) anos para os LNM2 e LM2. Os detalhes das principais características clínicas desses pacientes estão resumidos abaixo na tabela 1.

Tabela 1. Principais características clínicas (%) dos pacientes com LNM1 (n=10), LNM2 (n=10) e LM2 (n=10).

Características Clínicas		LNM1 (%)	LNM2 (%)	LM2 (%)
Idade	≤ 45 anos	40	30	30
	> 45 anos	60	70	70
Gênero	Masculino	40	70	70
	Feminino	60	30	30
Grupo étnico	Leucoderma	60	60	60
	Feoderma	20	20	20
	Melanoderma	20	20	20
Tabaco	Sim	85	90	90
	Não	85	10	10
Álcool	Sim	57	60	60
	Não	43	40	40

A análise comparativa da densidade de células dendríticas CD1a+, evidenciou que essa população celular foi significativamente maior nos LM2 quando comparado individualmente aos LNM1 e LNM2 (P=0,001 e P=0,005, respectivamente) (Figuras 2 e 4).

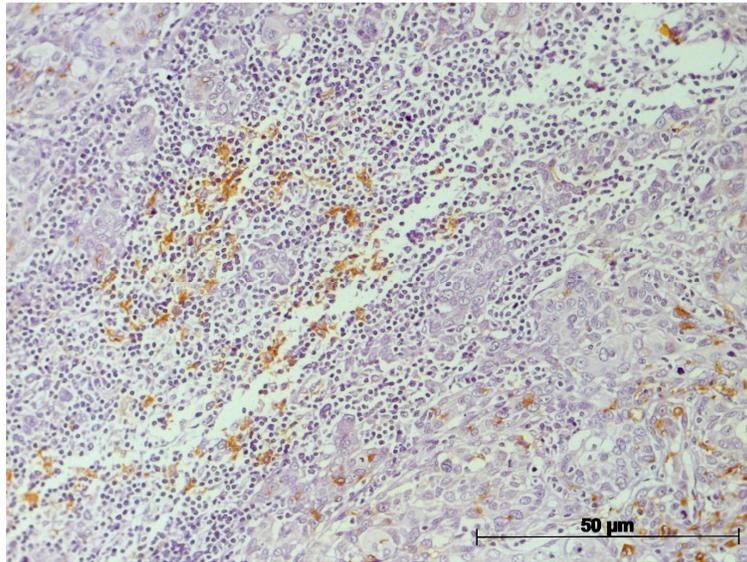


Figura 2: A fotomicroscopia ilustra células dendríticas imaturas (CD1a+) em linfonodos metastáticos de pacientes com CEC de cavidade oral com metástase linfonodal. Imunoistoquímica, aumento original de 400x.

Adicionalmente, nossos resultados demonstraram que não houve diferença estatística significativa entre os grupos de linfonodos não metastáticos de pacientes que não apresentaram nenhum linfonodo metastático (LNM1) e amostras de linfonodos não-metastáticos (LNM2) de pacientes que apresentaram metástase linfonodal ($P= 0,870$) (Figuras 3 e 4).

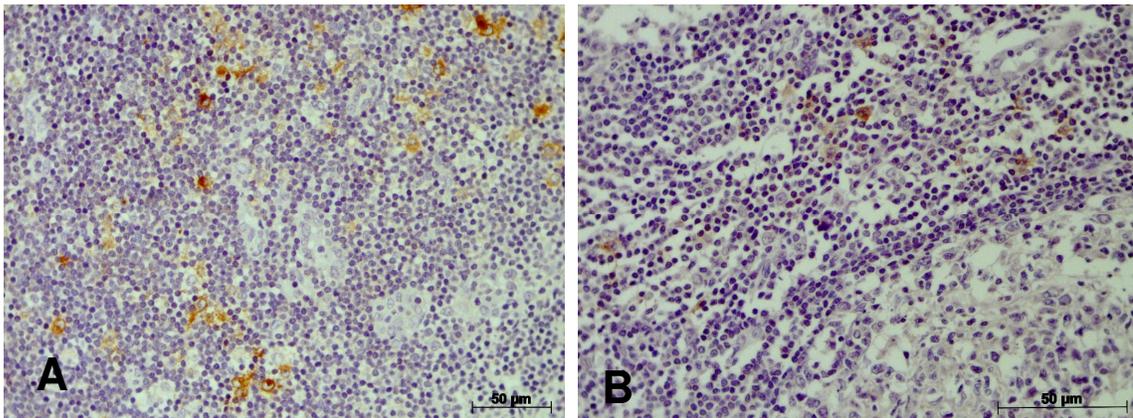


Figura 3. As fotomicroscopias ilustram células dendríticas imaturas (CD1a+) em linfonodos não metastáticos de pacientes que não apresentaram nenhum linfonodo metastático (LNM1) (A) e linfonodos não-metastáticos de pacientes que apresentaram metástase linfonodal (LNM2) (B). Imunoistoquímica, aumento original de 400x.

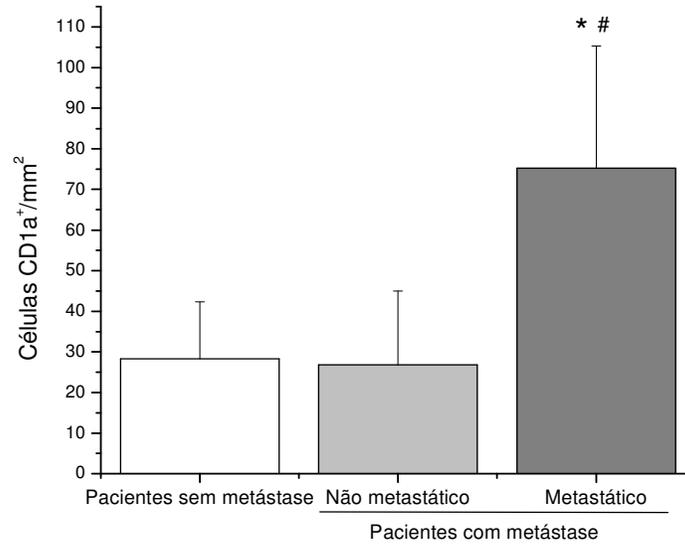


Figura 4. Densidade de células CD1a+ em linfonodos não metastáticos de pacientes que não apresentaram nenhum linfonodo metastático (LNM1) e linfonodos não-metastáticos (LNM2) e metastáticos (LM2) de pacientes que apresentaram metástase linfonodal. Os resultados estão expressos como a média das densidades/mm² ± DP. *P<0,05 em relação ao linfonodo não metastático do mesmo paciente (teste de Wilcoxon) e # P<0,05 em relação aos pacientes que não apresentaram metástase (teste de Mann-Whitney).

5 DISCUSSÃO

As CDs constituem uma população celular que desempenha importante papel na imunidade tumoral, sobretudo mediante sua capacidade de captura e apresentação de antígenos tumorais às células T *naives* presentes nos linfonodos, as quais são indispensáveis para o início e desenvolvimento de uma efetiva resposta citotóxica antitumoral (GOLDMAN et al., 1998; KIKUCHI et al., 2002; WEI E TAHAN, 1998).

Neste contexto, o presente estudo avaliou comparativamente a densidade de células dendríticas imaturas (CD1a+) em linfonodos cervicais de pacientes com CEC de cavidade oral. Nossos resultados evidenciaram que a densidade de CDs CD1a+ foi significativamente maior nos linfonodos metastáticos de pacientes com CEC primário de cavidade oral metastático (LM2) quando comparado individualmente com os linfonodos não metastáticos (LNM1) de pacientes que não apresentaram nenhum linfonodo metastático e amostras de linfonodos não-metastáticos (LNM2) de pacientes que apresentaram metástase linfonodal. Dessa forma, pode-se sugerir que o acúmulo de CDs imaturas nos LM2 ocorra

devido uma falha no processo de maturação dessas células, fato que possivelmente estaria contribuindo para progressão tumoral. Essa hipótese pode ser suportada por estudos prévios que têm demonstrado a capacidade do tumor em produzir vários fatores imunossupressivos que exercem importante efeito inibitório na maturação das CDs, entre estes se destaca a participação de moléculas como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), IL-10 e IL-6, as quais supostamente constituem uma estratégia das células neoplásicas em evadir ou superar a resposta imune do hospedeiro (ENK et al., 1997; KIERTSCHER et al., 2000; OYAMA et al., 1998; MARTI et al., 2005)

Alterações fenotípicas e funcionais promovidas pelo VEGF nas CDs têm sido descritas por alguns pesquisadores, apesar de até o momento não serem completamente esclarecidas. Por exemplo, Oyama et al. (1998) foram os primeiros a demonstrarem que o VEGF inibe a ativação do fator de transcrição NF- κ B, o que desencadeia a geração de CDs imaturas (OYAMA et al., 1998). Corroborando com esses achados, Marti et al. (2005) constataram, por meio de citometria de fluxo, que as CDs expostas ao VEGF apresentam uma menor expressão da proteína de superfície CD83, molécula co-estimulatória que desempenha papel fundamental na ativação dos linfócitos T (MARTI et al. 2005). Portanto, além do conhecido papel do VEGF na angiogênese e metástase, essa molécula também pode contribuir de forma significativa para progressão tumoral através de sua influência na maturação das CDs (OYAMA et al., 1998; MARTI et al., 2005). Já com referência aos efeitos inibitórios das citocinas IL-10 e IL-6 sobre as CDs, estes ocorrem de modo similar aos mecanismos desencadeados pelo VEGF (ENK et al., 1997; KIERTSCHER et al., 2000). Logo, o que se conclui com tais estudos é que as CDs imunocomprometidas geradas pela ação desses fatores podem induzir a deleção ou anergia de linfócitos T nos linfonodos, o que conseqüentemente contribui para uma indução ineficiente das respostas imunes antitumorais (ENK et al., 1997; KIERTSCHER et al., 2000; STEINMAN et al., 2003).

Em consonância com os nossos achados, Almand et al. (2000) também evidenciaram um acúmulo de CDs imaturas nos linfonodos regionais de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Adicionalmente, esses pesquisadores compararam a presença das moléculas M-CSF, GM-CSF, IL-6, IL-10, TGF- β e VEGF com a proporção de CDs imaturas, observando que apenas os pacientes com elevados níveis de VEGF mostraram um número significativamente maior de CDs imaturas. Dessa forma, supostamente o VEGF desempenha importante papel na diferenciação de CDs funcionalmente comprometidas (ALMAND et al., 2000).

Mais recentemente, Kikuchi et al. (2002) demonstraram que o número de células

CD1a+ é menor nos linfonodos de pacientes com CEC de boca que apresentaram metástase linfonodal quando comparado aos linfonodos de indivíduos que não apresentaram metástase, resultado que diverge daquele obtido por nós. Não obstante, este mesmo estudo não observou diferença significativa entre a densidade de CDs CD1a+ nos linfonodos não-metástáticos de pacientes que apresentaram metástase linfonodal e linfonodos de pacientes que não apresentaram metástase, dado condizente ao relatado por nós (KIKUCHI et al. 2002). Na tentativa de melhor compreender seus achados, esses pesquisadores em trabalho subsequente demonstraram que o VEGF pode atuar inibindo a diferenciação das CDs, evento condizente com dados da literatura científica que mostram a capacidade dessa molécula de afetar não só a maturação das CDs, mas também de influenciar prejudicialmente o processo de diferenciação e função dessas células (KIKUCHI et al. 2006). Por conseguinte, esses dados tomados em conjunto vêm a acrescentar e apoiar nossa hipótese de que fatores presentes no microambiente tumoral podem interferir de diferentes formas no processo de imunossupressão das CDs.

Dessa forma, considerando os dados obtidos no presente estudo, este apresenta grande relevância, principalmente por tornar ainda mais notório as evidências reportadas previamente de que a integridade da função desempenhada pelas CDs é imprescindível para o desenvolvimento da imunidade específica e que disfunções apresentadas por essas células podem comprometer drasticamente a regulação e manutenção das respostas imunes de combate ao câncer.

6 CONCLUSÃO

Os dados obtidos com o presente trabalho sugerem que o acúmulo de CDs imaturas (CD1a+) nos LM2 pode representar uma nova estratégia utilizada pelas células neoplásicas para escapar da imunovigilância, o que possivelmente estaria facilitando a progressão tumoral. Vale ressaltar que os mecanismos biológicos envolvidos na disfunção das CDs ainda não foram completamente elucidados, portanto, estudos suplementares nesta linha de investigação devem continuar a serem realizados, para que assim, nossos resultados possam ser melhor confrontados.

REFERÊNCIAS

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

ALMAND B. RESSER J. R.; LINDMAN B. et al. Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in câncer. **Clin Cancer Res**, v. 6, p. 1755-66, 2000.

ANNEROTH G.; BATSAKIS J.; LUNA M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand J Dent Res**, v. 95, p.229-49, 1987.

BALKWILL F.; MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**, v.357, p.539-45, 2001.

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

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

BRENER S.; JEUNON F. A.; BARBOSA A. A.; GRANDINETTI H. A. M. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Rev Bras Cancerol**, v. 53, p. 53-63, 2007.

ENK A. H.; JONULEIT H.; SALOGA J.; KNOP J. Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. **Int J Cancer**, v. 73, p. 309-16, 1997.

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.

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.

INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER. **TNM classification of malignant tumours**. 4.ed. Berlin, Springer-Verlag, 1987.

JORDAN R.C.; DALEY T. Oral squamous cell carcinoma: new insights. **J Canad Dent Ass**, v. 63, p. 517-8, 1997.

KIERTSCHER S. M.; LUO J.; DUBINETT S. M.; ROTH M. D. Tumors promote altered maturation and early apoptosis of monocyte-derived dendritic cells. **J Immunol**, v. 164, p. 1269-76, 2000.

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.

KIKUCHI K.; KUSAMA K.; SANO M. et al. Vascular endothelial growth factor and dendritic cells in human squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Anticancer Res**, v. 26, p. 1833-48, 2006.

- LIOTTA L.A.; KOHN E.C. The microenvironment of the tumor-host interface. **Nature**, v. 411, p. 375-9, 2001.
- MARTI L. C.; TOBO P. R.; CARVALHO A. C. S. R. et AL. Vascular endothelial growth factor inhibits dendritic cell Maturation. **Einstein**, v. 1, p. 14-8, 2005.
- MARTÍN-FONTECHA A. SEBASTIANI S.; HÖPKEN U. E. et al. Regulation of dendritic cell migration to the draining lymph node: impact on T lymphocyte traffic and priming. **J Exp Med**, v. 198, p. 615–21, 2003.
- O'DONNELL R. K.; MICK R.; FELDMAN M. et al. Distribution of dendritic cell subtypes in primay oral squamous cell carcinoma is inconsistent with a functional response. **Cancer Letters**, v. 255, p. 145-52, 2007.
- OYAMA T.; RAN S.; ISHIDA T. et al. Vascular endothelial growth factor affects dendritic cell maturation through the inhibition of nuclear factor-kappa B activation in hemopoietic progenitor cells. **J Immunol**, v. 160, p. 1224-32, 1998.
- 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.
- SPIRO R.H.; GUILLAMONDEGUI O.J.R.; PAULINO A.F.; HUVOS A.G. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. **Head Neck**, v.21, p.408-13, 1999.
- STEINMAN R. M.; HAWIGER D.; NUSSENZWEIG M. C. Tolerogenic dendritic cells. **Annu Rev Immunol**, v. 21, p. 21:685-711, 2003.
- VAN-DIEST P.J.; BRUGAL G.; BAAK J.P. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. **J Clin Pathol**, v.51, p.716-24, 1998.
- VAN-KEMPEN L. C.; RHEE J. S.; DEHNE K. et al. Epithelial carcinogenesis: dynamic interplay between neoplastic cells and their microenvironment. **Differentiation**, v. 70, p. 610-23, 2002.
- VAN-KEMPEN L.C.; RUITER D.J.; VAN-MUIJEN G.N.; COUSSENS L.M. The tumormicroenvironment: a critical determinant of neoplastic evolution. **Eur J Cell Biol**, v.82, p. 539-48, 2003.
- VISSER K. E.; COUSSENS L. M. The interplay between innate and adaptive immunity regulates cancer development. **Cancer Immunol Immunother**, v. 54, p. 1143–52, 2005.
- VISSER K.E.; EICHTEN A.; COUSSENS L.M. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. **Nature**, v.6, p.24-36, 2006.

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.