

# **Avaliação da Proporção de Macrófagos e a Relação Dessas Células com o Prognóstico do Carcinoma Espinocelular de Cavidade Oral**

Diego Antônio Costa Arantes<sup>1</sup>, Nádia do Lago Costa<sup>2</sup>, Aline Carvalho Batista<sup>3</sup>

Universidade Federal de Goiás – Faculdade de Odontologia, 74605-220, Brasil

[diegoantonio\\_arantes@hotmail.com](mailto:diegoantonio_arantes@hotmail.com) e [ali.caba@uol.com.br](mailto:ali.caba@uol.com.br)

**PALAVRAS-CHAVE:** Macrófagos CD68, Carcinoma Espinocelular, Câncer de boca.

Revisado pelo orientador e doutoranda envolvida.

<sup>1</sup>Graduando do curso de Odontologia da FO/UFG

<sup>2</sup>Doutoranda em Ciências da Saúde da FM/UFG

<sup>3</sup>Profa. Dra. do Departamento de Estomatologia da FO/UFG

## 1 INTRODUÇÃO

O termo câncer de boca é uma denominação genérica que inclui tumores de variados perfis histológicos, embora majoritariamente se refira ao Carcinoma Espinocelular (CEC) (BARNES et al., 2005; BRENER et al., 2007). O CEC de cavidade oral é uma neoplasia maligna que se origina no epitélio de revestimento e pode acometer diferentes localizações da cavidade oral (mucosa oral, gengiva, palato duro e língua, assoalho da boca) e, também, o vermelhão do lábio (BARNES et al., 2005; INCA, 2010). Além disso, os fatores mais comumente associados ao aumento do risco de CEC de cavidade oral são o tabagismo e o etilismo (NEVILLE & DAY, 2002; PINDBORG & WAHI, 1997).

Apesar de parâmetros clínicos (Barnes et al., 2005; International Union Against Cancer, 1987) e microscópicos (PINDBORG & WAHI, 1997; BRIGATI et al., 2002) serem importantes para avaliação da agressividade tumoral, hoje se sabe que a resposta imunológica inata e adaptativa peritumoral (BRIGATI et al., 2002; ABBAS, 2008; BALKWILL & MONTONAVI, 2001; COUSSENS & WERB, 2002; LIOTTA & KOHN, 2001; SHIMURA et al., 2000) são fundamentais para o estabelecimento do real prognóstico da doença (BALKWILL & MONTONAVI, 2001; LIOTTA & KOHN, 2001). Neste contexto, dentre os diferentes leucócitos presentes no infiltrado inflamatório peritumoral os macrófagos parecem ser os mais abundantes (BRIGATI et al., 2002; PEREIRA, 2004).

Os macrófagos podem exercer importante papel na resposta inflamatória antitumoral, pois são responsáveis pela produção de vários fatores de crescimento como TNF- $\alpha$ , um mediador da citotoxicidade tumoral, e citocinas, tais como as IL-2, IL-12 e IL-18, estimulantes do sistema imunológico (COUSSENS & WERB, 2002). Por outro lado, os próprios macrófagos podem produzir fatores de crescimento e outros tipos de citocinas, que inclui o fator de crescimento fibroblástico-1, fator de crescimento derivado de plaquetas, IL-1, TGF- $\beta$ , que podem, diretamente, promover o crescimento do tumor (LI et al., 2002). Os macrófagos podem, ainda, sob algumas condições, secretar enzimas proteolíticas (metaloproteinases) capazes de degradar a matriz extracelular, facilitando, desta maneira, a disseminação das células tumorais, bem como secretar fatores angiogênicos (fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fosforilase timina) os quais podem favorecer o crescimento, a infiltração e metástase tumoral (COUSSENS & WERB, 2002).

Embora a presença de macrófagos associados a tumor (do inglês “TAM”) tem sido relatado (BRIGATI et al., 2002; LI et al., 2002; LIU et al., 2008; MARCUS et al., 2004), sua participação na patogênese do câncer ainda é controversa. Enquanto alguns estudos demonstram que a alta densidade de macrófagos (CD68<sup>+</sup>) intra e peritumoral está associada a

um pior prognóstico, sendo relacionado com maior proliferação e invasão tumoral, maior densidade de vasos sanguíneos (angiogênese), menor sobrevida e metástase linfonodal em pacientes com CEC de esôfago (KOIDE et al., 2002; KOIDE et al., 2004), orofaringe (MARCUS et al., 2004) e de boca (LI et al., 2002; LIU et al., 2008; MARCUS et al., 2004); outros estudos evidenciam que uma maior densidade e atividade destas células no microambiente tumoral estão relacionadas a um melhor prognóstico (maior sobrevida) de pacientes com cânceres coloretal (FUNADA et al., 2003) e próstata (SHIMURA et al., 2000).

Todavia, apesar do importante papel dos macrófagos na patogênese tumoral (SHIMURA et al., 2000; LI et al., 2002; LIU et al., 2008; MARCUS et al., 2004; KOIDE et al., 2002; KOIDE et al., 2004; TIMAR et al., 2005; FERREIRA et al., 2008), há escassos estudos que objetivaram avaliar essa população celular em CECs de boca (LI et al., 2002; LIU et al., 2008; MARCUS et al., 2004) e, especialmente, investigar a significância clínico-patológica das mesmas em pacientes acometidos com esta patologia.

## **2 OBJETIVOS**

Identificar e quantificar macrófagos CD68<sup>+</sup>, tanto na região peritumoral quanto intra-tumoral, em amostras de CEC de cavidade oral, bem como a relação dessas células com fatores de prognóstico clínico (tamanho da lesão primária, sobrevida e metástase linfonodal) e microscópico (gradação microscópica segundo a OMS, invasão local e índice de proliferação celular).

## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Amostras Selecionadas**

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, dos arquivos de blocos e laudos do Serviço da Anatomopatologia e Citopatologia do HAJ/ACCG, 42 amostras de CEC de cavidade oral de pacientes diagnosticados, tratados e acompanhados no Serviço de Cabeça e Pescoço do HAJ/ACCG, sendo 19 amostras de pacientes que apresentaram metástase para linfonodo cervical e 23 de pacientes que não apresentaram metástase. Adicionalmente, foram utilizadas, 10 amostras de mucosa clinicamente saudável (controle), pertencentes ao arquivo de blocos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (FO/UFG). Os dados clínicos das amostras (tamanho da lesão primária, sobrevida e metástase

linfonodal) foram obtidos junto aos prontuários médicos de atendimento do HAJ/ACCG 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 3 µm de espessura, em micrótomo (Leica), montados em lâminas silanizadas e submetidos à técnica da imunoistoquímica (método de polímeros) para identificação das seguintes proteínas: CD68, Ki-67 e Ciclina B1. Sendo assim, foi possível identificar os macrófagos pela expressão do marcador de superfície celular CD68 o índice de proliferação tecidual pela expressão das proteínas Ki-67 e Ciclina B1. Inicialmente, os cortes foram desparafinizados em xilol e hidratados em banhos crescentes de álcool etílico. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão citrato (pH= 6.0) por 25 minutos e aquecido à uma temperatura de 95°C para exposição antigênica. As lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio a 3%, por 30 minutos e posteriormente incubadas com um bloqueador de proteínas inespecíficas (Background Sniper), por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários, por 8 horas e mantidas na temperatura de 4°C. Os anticorpos primários utilizados foram: monoclonais de camundongo anti-CD68 humano (clone KP1; Novocastra, Newcastle, UK; 1:1000), monoclonal de camundongo anti-Ki-67 humano (clone MM1, Novocastra; 1:100); e monoclonal de camundongo anti-ciclina B1 humana (clone 7A9, Novocastra; 1:40). Após esse período, as lâminas foram lavadas e incubadas com o polímero (Trek Universal Link - Sistema Starr Trek Universal / HRP Detection) por mais 20 minutos, e depois foram lavadas e incubadas com o polímero 2 (Trekavidin/HRP Label - Sistema Starr Trek Universal / HRP Detection), durante 20 minutos. Novamente, as lâminas foram lavadas com TBS e, a seguir, procedeu-se à revelação da reação utilizando o Betazoid DAB Chromogen em uma solução de Betazoid DAB Substrate Buffer (Sistema Starr Trek Universal / HRP Detection), por 2 minutos, à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina.

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, Quantitativa dos Dados e Estatística dos Dados**

Na avaliação qualitativa investigamos a distribuição, morfologia e intensidade de coloração das células positivas, tanto na região intratumoral (em íntima associação com as células neoplásicas) quanto no estroma peritumoral. Após a análise qualitativa, foi determinado a proporção de células CD68<sup>+</sup>, Ciclina B1<sup>+</sup> e Ki-67<sup>+</sup>. Essa análise quantitativa foi realizada utilizando 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 0,0961mm<sup>2</sup>. Para cada amostra, foram analisados 10 campos microscópicos alternados, com área total de 0,961mm<sup>2</sup>. A análise quantitativa foi realizada considerando tanto as células positivas quanto negativas, possibilitando, assim, a avaliação da proporção das células positivas. O resultado foi expresso como média ± Desvio Padrão (DP) e o valor de P menor que 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. A influência das células CD68<sup>+</sup> no prognóstico de pacientes com CEC de boca foi avaliada através do teste de Kaplan-Meier. O período de sobrevida foi obtido calculando-se a quantidade de meses a partir da data da cirurgia até a última data de seguimento ou óbito do paciente. O número de células CD68<sup>+</sup> foi dicotomizado pelo valor médio e as diferenças na sobrevida entre os grupos foi avaliadas pelo teste Long rank. A invasão tumoral foi avaliada utilizando uma régua milimétrica (5mm) acoplado na objetiva de 10x ao microscópio óptico, onde verificou-se o tamanho do tumor da região superficial do epitelélio ao fronte de invasão tumoral. Em todos os testes estatísticos aplicados utilizou-se o programa SPSS 10.0 for Windows.

## **4 RESULTADOS**

A análise das 42 amostras selecionadas (23 casos de CEC de cavidade não metastático e 19 casos de CEC de cavidade metastático) revelou um predomínio do gênero masculino e idade média de 57 anos (95% IC: 24 – 90 anos ). Pela análise microscópica das amostras a média das proporções obtidas para as quantificações das células Ciclina B1<sup>+</sup> e Ki67<sup>+</sup> foi de 10,41 % e 22,81%, respectivamente. Além disso obteve-se um predomínio de casos que se classificam em grau III segundo a OMS (carcinomas pobremente diferenciados, com ausência de queratinização, grande quantidade de mitoses atípicas e intenso pleomorfismo nuclear). Os detalhes das características clínicas e microscópicas analisadas

estão resumidos na tabela 1 e 2, respectivamente.

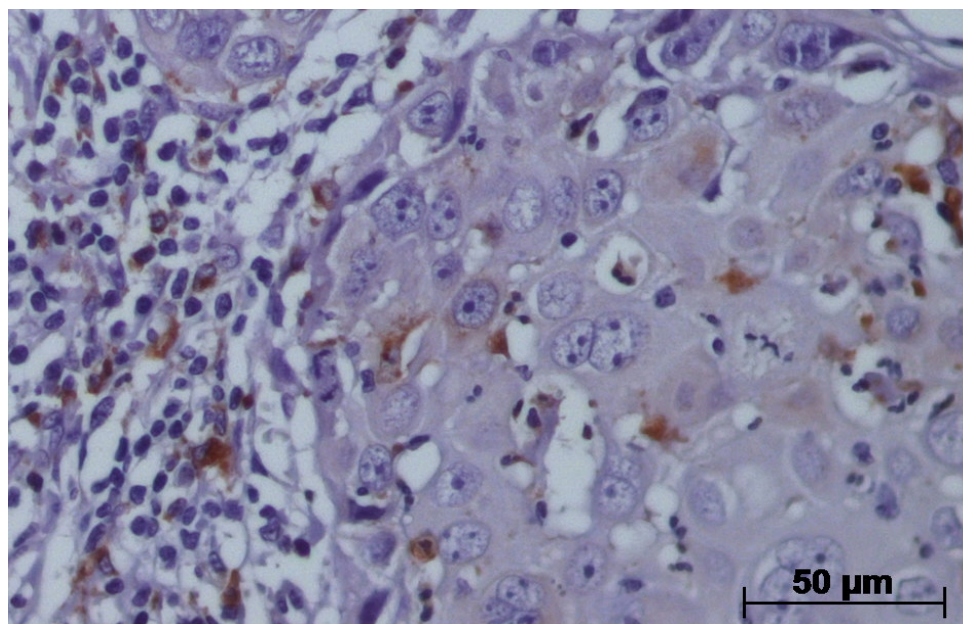
**Tabela 1:** Principais características clínicas (%) dos pacientes com CEC de cavidade oral (n=42).

Características Clínicas		CEC Cavidade (%)
Idade	≤57 anos	42,85
	>57 anos	57,14
Grupo Étnico	Leucoderma	57,14
	Feoderma	16,67
	Melanoderma	26,19
Gênero	Masculino	71,42
	Feminino	28,58
Tamanho	T1	2,38
	T2	16,66
	T3	50,0
	T4	30,96
Metástase	Sim	52,38
	Não	47,62
Óbito	Sim	42,85
	Não	57,15
Localização	Língua	42,85
	Soalho bucal	28,57
	Outros	28,58
Consumo de Tabaco	Sim	85,71
	Não	14,29
Consumo de Álcool	Sim	64,28
	Não	35,72

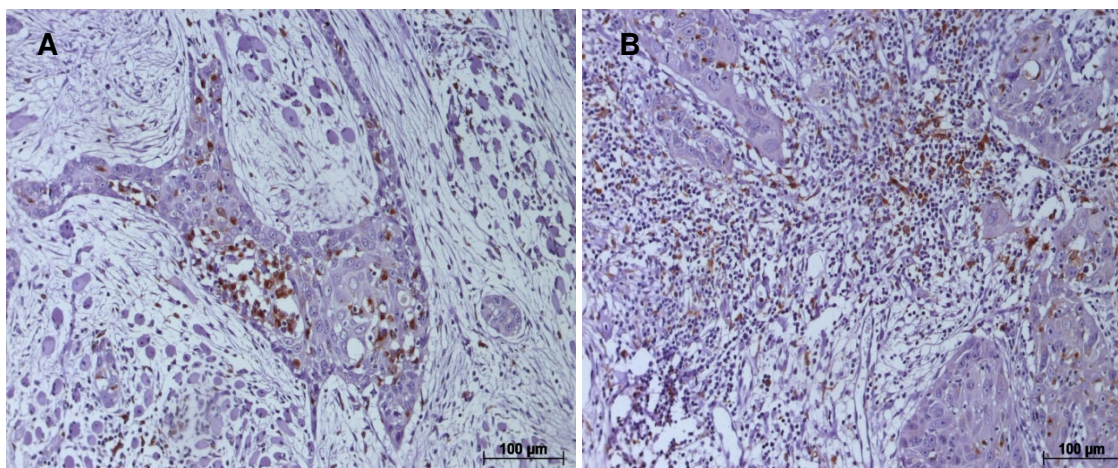
Tabela 2: Principais características clínicas (%) dos pacientes com CEC de cavidade oral (n=42).

Características Microscópicas		CEC Cavidade (%)
Invasão tumoral local	≤15,40 μm	57,14
	>15,40 μm	42,86
Classificação microscópica segundo a OMS	Grau I	9,52
	Grau II	35,72
	Grau III	54,76
Índice de proliferação celular <b>Ciclina B1<sup>+</sup></b>	≤10,41%	61,76
	>10,41%	38,24
<b>Ki67<sup>+</sup></b>	≤22,81%	45,45
	>22,81%	54,55

A análise qualitativa demonstrou que as células CD68<sup>+</sup> apresentaram morfologia de macrófagos, com um halo de coloração marrom (**Figura 1**). Observou-se, ainda que, essas células concentraram-se predominantemente na região peritumoral, em região de frente de invasão tumoral, quando comparada a região intratumoral em todos os grupos analisados (**Figura 2A e B**).



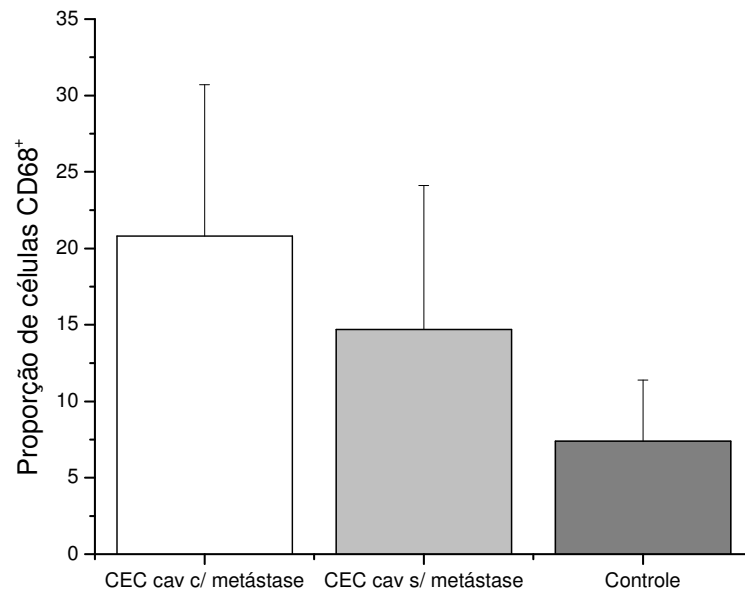
**Figura 1:** Células CD68<sup>+</sup> (coradas em marrom) em íntimo contato com as células tumorais no carcinoma espinocelular (CEC) de cavidade oral. Imunoistoquímica, aumento original de 400x.



**Figura 2:** Células CD68<sup>+</sup> presentes na região intra-tumoral (A) e distribuídas no frente de invasão tumoral (B) do CEC de cavidade oral. Imunoistoquímica, aumento original de 200X (A e B).

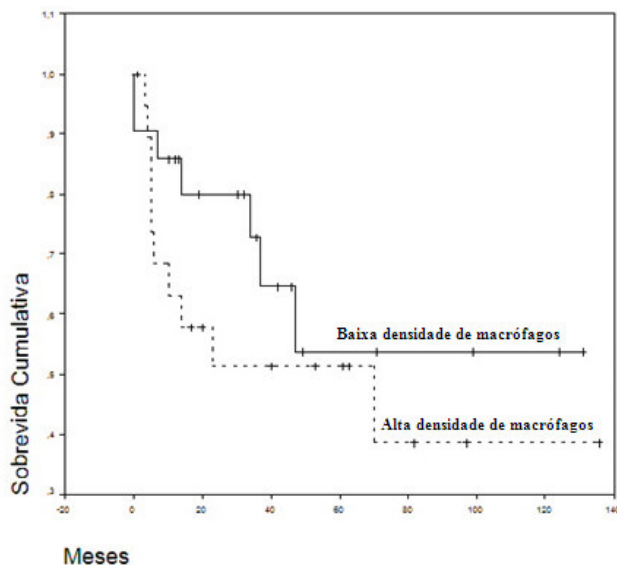
Nossos resultados revelaram, ainda, que a proporção de macrófagos CD68<sup>+</sup> foi significativamente maior no grupo de CEC metastático quando comparado ao não metastático e controle ( $p=0,05$  e  $0,001$ , respectivamente). Adicionalmente, a proporção dessas células foi significativamente maior no grupo de CEC não metastático quando comparado com o controle ( $p=0,05$ ) (**Figura 3**).





**Figura 3:** Proporção de células CD68<sup>+</sup> em CEC de cavidade oral com e sem metástase e mucosa oral normal (controle). Os resultados estão expressos como a média das proporções ± DP. \*P<0,05 quando comparado aos demais grupos e # P<0,05 quando comparado ao CEC de cavidade oral com metástase (teste de Mann-Whitney).

Com relação à sobrevida, os pacientes com alta proporção de macrófagos CD68<sup>+</sup> apresentaram uma menor sobrevida do que aqueles com baixa proporção dessas células, no entanto esse resultado não foi estatisticamente significativo (Kaplan-Meier, Log Rank, p>0,05) (**Figura 4**).



**Figura 4:** Curva de sobrevida de acordo com a proporção de células CD68<sup>+</sup> em estroma peritumoral de CEC de cavidade oral (Kaplan-Meier, Log Rank, P > 0,05).

Não houve relação com a proporção dessas células e as demais características clínicas e microscópicas analisadas.

## 5 DISCUSSÃO

A população celular bem como os mediadores químicos presentes no microambiente tumoral podem contribuir para progressão da neoplasia ou para sua inibição e controle (BALKWILL & COUSSENS, 2004; OLIVERIA-NETO et al., 2007; VAN et al., 2002; VISSER & COUSSENS, 2005). Os macrófagos associados ao tumor (TAM) são os principais componentes do microambiente imune-inflamatório tumoral e essas células desempenham uma diversidade de papéis que podem contribuir tanto com eventos de combate, pela produção de IL-2 IL-12 e IL-18 (estimulantes do sistema imune) e um mediador da citotoxicidade tumoral (TNF- $\alpha$ ), quanto para eventos de crescimento e progressão tumoral, pela produção de fator de crescimento fibroblástico-1, fator de crescimento derivado de plaquetas, IL-1, TGF- $\beta$ , e em algumas condições pela secreção de metaloproteinases, VEGF e fosforilase timina (COUSSENS & WERB, 2002).

Nesse contexto, o presente estudo demonstrou que a alta quantificação de macrófagos CD68<sup>+</sup> no microambiente do CEC de cavidade oral está relacionada com um maior índice de metástase e uma tendência a menor tempo de sobrevida desses pacientes.

Corroborando com nossos achados, alguns estudos também relacionaram a alta densidade dessas células com um pior prognóstico em amostras de CEC de esôfago (KOIDE et al., 2002; KOIDE et al., 2004), orofaringe (MARCUS et al., 2004). Adicionalmente, LI *et al* (2002), MARCUS *et al* (2004) e LIU *et al* (2008) demonstram que a alta proporção de macrófagos associados ao CEC de boca estava relacionado com eventos de proliferação celular, angiogênese e metástase linfonodal. Ao contrário dos resultados encontrados nesse trabalho, alguns estudos evidenciaram que uma maior densidade e atividade destas células no microambiente tumoral estavam relacionadas a um melhor prognóstico de pacientes com cânceres colorretal (FUNADA et al., 2003) e de próstata (SHIMURA et al., 2000).

Essa controvérsia encontrada na literatura pode ser explicada pelo fato de que diferentes tipos de cânceres apresentam diferentes tipos de microambientes, com diferentes tipos de respostas imune/inflamatórias. Além disso, com relação aos macrófagos, recentes descobertas têm demonstrado a existência de dois tipos de macrófagos: o M1 e o M2, os quais são subdivididos de acordo com sua capacidade de produzir diferentes respostas (REZENDE et al., 2007; GINDERACHTER et al., 2006). Os macrófagos M1, também denominados de classicamente ativados, produzem altos níveis de IL-12, INF-gamma e IL-23 e baixos níveis de IL-10 e são, conseqüentemente, fortes promotores da resposta imune Th1 (REZENDE et al., 2007; GINDERACHTER et al., 2006). Em adição, estas células exercem atividades anti-proliferativa e citotóxica - resultante particularmente da capacidade de secretar NO, peroxinitritos, peróxido de hidrogênio e superóxidos - e citocinas pro-inflamatórias (TNF-alfa, IL-1, IL-6) (GINDERACHTER et al., 2006). Os macrófagos M2, também denominados de alternativamente ativados, são caracterizado por sua capacidade de secretar citocinas anti-inflamatórias e imunossupressoras tais como IL-3, IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  (REZENDE et al., 2007; GINDERACHTER et al., 2006). Portanto, o M2 é capaz de inibir as funções do M1, particularmente, as funções inflamatórias e citotóxicas (GINDERACHTER et al., 2006). Adicionalmente, o M2 é capaz de promover a angiogênese e o reparo tecidual (SICA et al., 2006).

Neste contexto, M1 e M2 parecem exercer papéis distintos na patogênese do câncer. Enquanto M1 está associada com atividades anti-inflamatórias e com a citotoxicidade tumoral, M2 está relacionada a atividades anti-inflamatórias, ao reparo tecidual e a angiogênese, favorecendo assim a progressão tumoral (GINDERACHTER et al., 2006; SICA et al., 2006). No presente estudo, não foi possível avaliar o fenótipo M1 e M2, no entanto nossos achados sugerem um predomínio do tipo M2 no microambiente do CEC de cavidade oral, visto que a alta proporção celular corroborou com um pior prognóstico dos pacientes

Todavia, para confirmar esta hipótese outros estudos estão sendo realizados em nosso laboratório com intuito de determinar o fenótipo do macrófago no CEC de boca e avaliar a relação destas células com a presença de metástase linfonodal e sobrevida dos pacientes acometidos pelo CEC.

Os macrófagos são os maiores organizadores na seqüência de eventos para o reconhecimento, morte e eliminação tumoral (FEINMESSER et al., 2004). Neste contexto, recentemente, Feinmesser et al. (2004) e Timár et al. (2005), demonstraram que a imunoterapia, através da administração local de linfocinas naturais (multikine, CelSci), como a IL-2, pode modular a densidade de várias células no CEC de boca, dentre elas os macrófagos. Esse tratamento coadjuvante contribui para a diminuição da extensão tumoral e o aumento da sobrevida dos pacientes, sendo os macrófagos os maiores organizadores na seqüência de eventos para o reconhecimento, morte e eliminação tumoral. Desta forma, estes autores consideram que os CECs de boca, os quais tipicamente demonstram progressão locoregional, são excelentes candidatos para a imunoterapia local, devido sua acessibilidade e à capacidade de infiltração intratumoral de substâncias de defesa susceptíveis a imunomodulação.

Acreditamos, portanto que estudos nessa linha de investigação devam continuar a serem realizados, para que assim, um melhor entendimento da imunidade que se desenvolve em tais lesões possa conduzir para a análise de meios de intervenção contra a doença e também indicar marcadores de predição do desenvolvimento e agressividade tumoral. Os resultados deste trabalho, contribuem também para entendimento destes mecanismos de imunidade que se desenvolve nestas patologias podendo, no futuro, auxiliar na compreensão da fisiopatologia dos processos neoplásicos com potencial para utilização no desenvolvimento de imunoterápicos e quimioterápicos.

## **6 CONCLUSÃO**

Em conclusão nossos resultados sugerem que a presença de macrófagos no microambiente do CEC de cavidade oral, pode desencadear eventos que levem a uma maior agressividade tumoral, contribuindo, assim, para um pior prognóstico dos pacientes. Acreditamos ainda, que estudos que objetivem investigar o dúbio papel dos macrófagos devam continuar a serem realizados, visando um melhor entendimento da imunidade tumoral e propiciando uma maior compreensão da fisiopatologia dos processos neoplásicos.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILAI, S. **Cellular and Molecular Immunology**. In: *Imunologia celular e molecular*. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **The Lancet**, v.411, p.375-539, 2001.

BALKWILL, F.; COUSSENS, L. M. Cancer: an inflammatory link. **Nature**, v. 431, p. 405-6, 2004.

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: IARC Press, 2005. p.166-75.

BRENER, S.; JEUNON, F. A.; BARBOSA, A. A. et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Ver Bras Cancerol**, v.53, p.63-69, 2007.

BRIGATI, C.; NOONAN, D. M.; ALBINI, A. et al. Tumor and inflammatory infiltrates: friends or foes. **Clin Exp Metastasis**, v.19, p.247-258, 2002.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and Cancer. **Nature**, v.420, p.19-26, 2002.

FEINMESSER, M.; OKON, E.; SCHWARTZ, A. et al. Histologic and immunohistochemical characterization of tumor and inflammatory infiltrates in oral squamous cell carcinomas treated with local multikine immunotherapy: the macrophage at the front line. **Eur Arch Otorhinolaryngol**, v.261, p.359-368, 2004.

FERREIRA, F. O.; RIBEIRO, F. L. L.; BATISTA, A. C. et al. Association of CCL2 with lymph node metastasis and macrophage infiltration in oral cavity and lip squamous cell carcinoma. **Tumor Biol**, v.29, p.114-121, 2008.

FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. In: *Inflamações*. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

FUNADA, Y.; NOGUCHI, T.; KIKUCHI, R. et al. Prognostic significance of CD8+ T cell and macrophage peritumoral infiltration in colorectal cancer. **Oncol Rep**, v.10, p.309-313, 2003.

GINDERACHTER, J. A.; MOVAHEDI, K.; GHASSABEH, G.H.; MEERSCHAUT, S.; BESCHIM, A.; RAES, G.; BAETSELIER, P. D. Classical and alternative activation of mononuclear phagocytes: Picking the best of both worlds for tumor promotion. **Immunobiology**, v.211, p.487-501, 2006.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: Incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2010. Disponível em: <<http://www.inca.org.br/estimativa/2010>> Acesso em: 20 Fev. 2011.

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

KOIDE, N.; NISHIO, A.; HIRAGURI, M. et al. Differences and relationship of thymidine phosphorylase expression in tumor-associated macrophages and cancer cells in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Dis Esophagus**, v.15, p.57-73, 2002.

KOIDE, N.; NISHIO, A.; SATO, T. et al. Significance of macrophage chemoattractant protein-1 expression and macrophage infiltration in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Am J Gastroenterol**, v.99, p.1667-1674, 2004.

LI, C.; SHINTANI, S.; TERAKADO, N. et al. Infiltration of tumor-associated macrophages in human oral squamous cell carcinoma. **Oncol Rep**, v.9, p.1219-1223, 2002.

LIOTTA, L. A.; KOHN, E. C. The microenvironment of the tumor-host interface. **Nature**, v.411, p.375-379, 2001.

LIU, S. Y.; CHANG, L. C.; PAN, L. F. et al. Clinicopathologic significance of tumor cell-lined vessel and microenvironment in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v.44, p.277-285, 2008.

MARCUS, B.; ARENBERG, D.; LEE, J. et al. Prognostic factors in oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Cancer**, v.101, p.2779-2787, 2004.

MILLS, C.D.; KINCAID, K.; ALT, J. M.; HEILMAN, M.J.; HILL, A. M. M-1/M-2 macrophages and the TH1/Th2 paradigm. **J Immunol**, v.164, n. 16, p.166-173, 2000.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral Cancer and Precancerous Lesions. **CA Cancer J Clin**, v.52, p.195-215, 2002.

OLIVEIRA-NETO, H. H.; LEITE, A. F.; COSTA, N. L. 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<sup>a</sup> ed. Berlin: Springer-Verlag; 1997.

REZENDE, T. M. B.; VIEIRA, L.Q.; CARDOSO, F. P.; OLIVEIRA, R. R.; OLIVEIRA, M. S. T.; JORGE, M. L. R.; RIBEIRO SOBRINHO, A.P. The effect of mineral trioxide aggregate on phagocytic activity and production of reactive oxygen, nitrogen species and arginase activity by M1 and M2 macrophages. **Int Endod J**, v.40, p. 603-611, 2007.

SHIMURA, S.; YANG, G.; EBARA, S. et al. Reduced infiltration of tumor-associated macrophages in human prostate cancer: association with cancer progression. **Cancer Res**, v.60, p.5857-5861, 2000.

SICA, A.; SHIOPPA, T.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. Tumor-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. **Eur J Cancer**, v.42, p.717-772, 2006.

TIMAR, J.; LADANYI, A.; FORSTER-HORVATH, C. et al. Neoadjuvant immunotherapy of oral squamous cell carcinoma modulates intratumoral CD4/CD8 ratio and tumor microenvironment: a multicenter phase II clinical trial. **J Clin Oncol**, v.23, p.3421-3431, 2005.

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.

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.