UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

MICHELE CONCEIÇÃO PEREIRA

Associação do polimorfismo do gene da proteína catiônica eosinofílica com a eosinofilia tecidual associada aos tumores em carcinomas espinocelulares de boca

**Bauru
2008**

MICHELE CONCEIÇÃO PEREIRA

**Associação do polimorfismo do gene da proteína catiônica eosinofílica com a eosinofilia
tecidual associada aos tumores em carcinomas espinocelulares de boca**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Bauru da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de doutor em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Tostes Oliveira

BAURU
2008

Pereira, Michele Conceição

P414a Associação do polimorfismo do gene da proteína catiônica eosinofílica com a eosinofilia tecidual associada aos tumores em carcinomas espinocelulares de boca / Michele Conceição Pereira. – Bauru, 2008.
183 p.: il. ; 30 cm.

Tese. (Doutorado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru.
Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Tostes Oliveira

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Projeto de pesquisa aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo – número 810/06, em reunião de 29 de agosto de 2006.

DADOS CURRICULARES

Michele Conceição Pereira

Nascimento 12 de junho de 1979

Naturalidade Jundiaí - SP

Filiação Sebastião Romualdo Pereira
Josefa Rios

1998-2001 Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

2002-2004 Mestrado em Estomatopatologia pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP)

2003-2005 Professora Substituta da Disciplina de Patologia Geral da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG)

2005-2008 Doutorado em Patologia Bucal pela Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP)

Associações SBPqO: Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica
SOME: Sociedade Mineira de Estomatologia
SOBE: Sociedade Brasileira de Estomatologia

DEDICATÓRIA

A **Deus**, por ter me permitido triunfar na mais difícil de todas as batalhas: vencer a mim mesma. A Ele toda honra, poder e glória, para sempre.

A minha mãe **Josefa**, exemplo de luta, força, perseverança e coragem. Obrigada por estar sempre ao meu lado e me apoiar em cada etapa dessa e de tantas outras caminhadas.

Ao **Júlio**, pela paciência, companheirismo e apoio incondicional. Obrigada por ter compreendido e aceitado minha ausência.

A minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Denise Tostes Oliveira**, pela amizade, carinho, confiança, incentivo, oportunidades e por ter acreditado no meu potencial. Obrigada por ter me ajudado a reescrever minha história profissional.

AGRADECIMENTOS

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo**, pelo auxílio financeiro concedido à Prof^a. Dr^a. Denise Tostes Oliveira, processo número 2006/03830.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior**, pela bolsa de doutorado concedida.

Ao **Prof. Dr. Luiz Fernando Pegoraro**, diretor da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa da **Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida de Andrade Moreira Machado**.

Ao **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**, coordenador do Programa de Pós-Graduação em Patologia Bucal.

Aos professores da Disciplina de Patologia, **Prof. Dr. Alberto Consolaro, Prof^a. Dr^a. Denise Tostes Oliveira, Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira e Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara**, pela dedicação e conhecimentos compartilhados.

Aos funcionários e ex-funcionários da Disciplina de Patologia: **Fátima Aparecida Silveira, Luís Fernando Bernardi, Maria Cristina Carrara Felipe, Marilza Dias de Almeida e Valdir João Afonso**.

À direção do Hospital do Câncer A.C. Camargo, na pessoa do diretor **Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani**.

Ao **Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**, que apesar dos muitos afazeres, sempre dispensou parte do seu precioso tempo para me ouvir e ajudar.

Ao **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**, chefe do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo. Obrigada por ter confiado em nosso trabalho e ter permitido a utilização das amostras do Banco de Tumores.

À **Prof^a. Dr^a. Sílvia Regina Rogatto**, que mesmo sem me conhecer, abriu as portas do Laboratório Neogene para a realização da parte experimental desse trabalho. Muito obrigada por toda a atenção, carinho e presteza com que sempre me ajudou.

Ao **Dr. Gilles Landman**, pela oportunidade e pelo acesso ao arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

À **Dr^a. Valéria Paixão**, pela ajuda na seleção das amostras do Banco de Tumores. Obrigada por toda a colaboração e boa vontade com que sempre me atendeu.

À **Júlia Mariko Toyota**, pelo auxílio na obtenção das amostras de DNA dos pacientes do Projeto IARC.

Aos funcionários do Arquivo da Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo **Marcelo e Glauber**.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo, em especial ao **César** pela confecção dos cortes microscópicos.

Aos funcionários do Serviço de Arquivo Médico do Hospital do Câncer A.C. Camargo, em especial a **Sra. Hirde Contesini** e ao **Sr. Luís Otílio de Lima**.

À **Eloísa Helena Ribeiro Olivieri**, por toda a paciência, dedicação e ensinamentos transmitidos durante minha permanência no Laboratório Neogene. Sem a sua ajuda, esse trabalho não teria se concretizado.

A toda equipe do Laboratório Neogene: **André, Cássia, Eliane, Eloísa, Fábio, Fabíola, Fabrício, Fernanda, Flávia, Lívia, Luciana, Miriam, Nádia, Greicy, Priscila, Renata, Rodrigo, Sara e Sandra**. Obrigada pela acolhida e orientações.

A **Dr^a. Cláudia Rainho**, pelas dicas, sugestões e por ter realizado a análise referente à genética de populações.

Ao **Dr. André Lopes Carvalho**, pela realização e orientação estatística desse trabalho.

A **Stela Peres**, pela enorme contribuição na realização da análise de sobrevida dos pacientes.

Ao **Eloésio**, pelas correções referentes à Língua Portuguesa.

À amiga **Rosário**, por ter sido minha companheira em todos os momentos, por compartilhar lágrimas, sorrisos e cumplicidades.

Ao amigo **Renato**: apesar do pouco tempo de convivência, sua presença e amizade foram muito importantes para minha adaptação inicial em Bauru. Saudades!

Ao amigo **João Adolfo**, por participar dos momentos mais importantes da minha vida acadêmica e sempre acreditar no meu potencial. Tenho você como meu “padrinho profissional”.

À **Fatiminha**, por sempre ter palavras de carinho e ânimo. Obrigada pela sua acolhida e amizade.

À amiga **Roberta**, pela amizade e pelos alegres momentos compartilhados.

Às meninas do pensionato: **Cristiane, Daniele, Natália, Priscilla, Marcela Cesarino, Marcela Ferreira**. Obrigada pela divertida convivência e por tornarem minha permanência em Botucatu mais fácil e agradável. Jamais esquecerei das nossas longas conversas na cozinha!

Aos meus colegas da turma de doutorado: **Gisele, Karen, Melaine, Milton, Roberta e Tiago**.

Aos demais colegas de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru: **Ana Carolina, Aroldo, Bruno, Carlos, Carine, Eliane, Érika Martins, Érika Sinara, Erick, Gastão, Janaína, Leda, Maria Carolina, Marta, Patrícia, Renata, Simone, Suzana, Sylvie**.

A todos os **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Bauru, pelas orientações no transcorrer do curso.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Bauru, pela prontidão com que sempre me atenderam.

A **todos os pacientes do Hospital do Câncer A.C. Camargo** que fizeram parte desse estudo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Aos meus avós **Francisco** e **Maria Dolores** (em memória). Vocês foram fundamentais para me tornar quem sou. Obrigada por toda a dedicação, paciência e amor.

Ao meu sobrinho **Juan**, que apesar da pouca idade, representa um exemplo de equilíbrio e coragem. Pena não poder ter acompanhado seu crescimento de perto... Você é muito especial e nunca se esqueça disso!

A minha irmã **Mirian**, que nos momentos de adversidade esteve ao meu lado e soube demonstrar todo seu carinho e atenção. Muito obrigada por todos os conselhos!

Aos meus amigos **Karina** e **Fabiano**, que apesar da distância física, sempre estiveram ao meu lado. Obrigada pela força e energias positivas. Adoro vocês!

À **Frauke**, que muitas vezes soube compreender meus sentimentos e inquietações antes mesmo das palavras. Obrigada pela sua amizade e carinho.

“O mais importante não é onde estamos, mas em que rumo nos dirigimos. Para chegar ao porto do paraíso, devemos, às vezes, navegar a favor do vento e, outras, contra; mas deve-se navegar e não ir à deriva e jogar as âncoras.”

Oliver W. Holmes Jr.

RESUMO

A proteína catiônica eosinofílica (ECP) presente nos grânulos específicos dos eosinófilos apresenta atividade citotóxica, particularmente para células tumorais, entretanto a função exata dos eosinófilos e de seus produtos nas neoplasias malignas continua obscura. O objetivo desse trabalho foi investigar a prevalência do polimorfismo 434(G>C) do gene *ECP* em pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) de boca e sua correlação com a eosinofilia tecidual associada aos tumores (TATE), bem como com as características demográficas, clínicas e microscópicas. O genótipo 434 do gene *ECP* em 165 pacientes saudáveis e em 157 pacientes com CEC de boca, tratados no Hospital do Câncer A.C. Camargo entre 1984 a 2002, foi detectado pela clivagem da sequência específica de DNA amplificada com a enzima de restrição PstI e análise dos produtos de clivagem pela eletroforese em gel de agarose. A TATE foi determinada por análise morfométrica. A associação entre os genótipos, a intensidade da TATE e as variáveis demográficas, clínicas e microscópicas foi avaliada pelo teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher. As análises das sobrevidas global, livre de doença e específica por câncer foram feitas pelo estimador limite de Kaplan-Meier e a comparação das curvas de sobrevida foi realizada utilizando-se o teste log-rank. Notou-se uma predominância dos indivíduos heterozigotos para o polimorfismo 434(G>C) do gene *ECP*. Nenhuma diferença estatística significativa foi obtida entre os diferentes genótipos, a intensidade da TATE e as variáveis demográficas, clínicas e microscópicas. Uma maior frequência de esvaziamento cervical bilateral, recidiva local, embolização vascular, comprometimento das margens cirúrgicas e realização de radioterapia pós-operatória foi observada nos pacientes com CEC de boca, TATE intensa e genótipos 434GC/CC. Não houve correlação estatística significativa entre os diferentes genótipos 434 do gene *ECP* e as sobrevidas global, livre de doença e específica por câncer. Baseados em nossos resultados, concluímos que houve uma tendência de os pacientes com CEC de boca, intensa eosinofilia tecidual e genótipos 434GC/CC do gene *ECP* apresentarem uma evolução clínica desfavorável, quando comparados aos indivíduos com genótipo 434GG, provavelmente pela presença de uma variante genética dessa proteína com propriedades citotóxicas alteradas.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular. Eosinófilos. Polimorfismo genético. ECP. Prognóstico.

ABSTRACT

Association of eosinophil cationic protein gene polymorphism with tumor-associated tissue eosinophilia in oral squamous cell carcinomas

Eosinophil cationic protein (ECP), found in secretory granules of human eosinophils, presents cytotoxic activity, particularly against cancer cells. The specific functional role of eosinophils in solid malignant tumors remains unclear. The aim of this study was to investigate the prevalence of the ECP-gene polymorphism 434(G>C) in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients and its association with tumor-associated tissue eosinophilia (TATE), as well as demographic, clinical and microscopic variables. The 434 genotypes in the ECP-gene of 165 healthy individuals and 157 OSCC patients, submitted to surgical treatment at the Hospital A.C. Camargo from 1984 to 2002, were detected by cleavage of the amplified DNA sequence with restriction enzyme PstI and analyses of the cleaved product by agarose gel electrophoresis. TATE, in OSCC, was obtained by morphometric analysis. Chi-square test or Fisher's exact test was used to analyze the association among ECP-gene polymorphism 434(G>C), TATE, demographic, clinical and microscopic variables. Disease-free survival and overall survival were calculated by the Kaplan-Meier product-limit actuarial method and the comparison of the survival curves were performed using log rank test. Most of healthy individuals and OSCC patients showed the genotype 434GC. There was no statistical association among 434 genotypes, TATE intensity and demographic, clinical or microscopic variables of OSCC patients. Higher frequency of bilateral neck dissection, local recurrence, vascular embolization, involved resection margins and postoperative radiotherapy was detected in OSCC patients with intense TATE and 434GC/CC genotypes. No statistically significant differences on survival rates were found among 434 genotypes. In conclusion, these results suggest a tendency of worse clinical outcome in OSCC patients with intense TATE and 434GC/CC genotypes, probably due an ECP genetic variant with altered cytotoxic activity.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Eosinophils. Gene polymorphism. ECP. Prognosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 - Estrutura do gene *ECP* e a proteína traduzida. O gene se localiza no cromossomo 14 e apresenta dois éxons. O quadrado preto representa uma seqüência de DNA localizada no íntron, que aumenta a atividade da região promotora. Na proteína, os elementos “+” indicam a presença do aminoácido básico arginina, as caixas representam os locais de glicosilação e “C”, as posições dos aminoácidos cisteína. Adaptado de VENGE e BYSTROM, 1998. 61
- Figura 2 - Diferenciação, maturação, transmigração e acúmulo do eosinófilos na região tumoral. A ECP, presente nos grânulos específicos dessas células, apresenta atividade citotóxica para células tumorais, entretanto a associação entre o polimorfismo 434(G>C) do gene *ECP* e a eosinofilia tecidual nos carcinomas espinocelulares de boca permanece desconhecida. Adaptada de GLEICH, 2000. 67
- Figura 3 - Esquema representando as condições utilizadas na reação em cadeia da polimerase para amplificação do gene da proteína catiônica eosinofílica. Adaptado de FARAH, 2007. 78
- Figura 4 - A) Ideograma do cromossomo 14 no qual está mapeado o gene *ECP* (14q24-31); B) o polimorfismo refere-se a uma transversão de G para C na posição 434; abaixo está a seqüência reconhecida pela enzima *Pst*I; C) seqüência nucleotídica do gene *ECP* amplificada pela PCR; em azul estão destacados os *primers*, em verde a seqüência reconhecida pela enzima de restrição e em vermelho o polimorfismo. 79
- Figura 5 - À esquerda, visualiza-se um esquema representativo da observação em gel de agarose a 2% dos fragmentos gerados após amplificação do gene *ECP* resultantes da digestão com a enzima de restrição *Pst*I. À direita, visualiza-se uma foto em gel de agarose a 2% correspondente aos genótipos do esquema (pb= pares de base). 81
-

Figura 6 - Fotos de géis de agarose a 2% representativas dos genótipos 434 do gene <i>ECP</i> . As imagens (A) e (B) exemplificam genótipos dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca e (C) do grupo controle.	99
Figura 7 - Carcinoma espinocelular com intensa queratinização e intenso infiltrado inflamatório mononuclear (A). Em B, nota-se padrão de invasão tumoral caracterizado por cordões grossos de células malignas (H&E).	103
Figura 8 - Diferentes intensidades da eosinofilia tecidual associada aos carcinomas espinocelulares de boca. Em (A), nota-se eosinofilia intensa e em (B) eosinofilia discreta (H&E).	107
Figura 9 - Infiltrações perineural (A) e muscular (B) do carcinoma espinocelular de boca (H&E).	119
Figura 10 - Sobrevida global dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca, de acordo com os genótipos 434 do gene <i>ECP</i> . Porcentagem de sobrevida acumulada de acordo com a técnica de Kaplan-Meier.	122
Figura 11 - Sobrevida livre de doença dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca, de acordo com os genótipos 434 do gene <i>ECP</i> . Porcentagem de sobrevida acumulada de acordo com a técnica de Kaplan-Meier.	123
Figura 12 - Sobrevida específica dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca, de acordo com os genótipos 434 do gene <i>ECP</i> . Porcentagem de sobrevida acumulada de acordo com a técnica de Kaplan-Meier.	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema utilizado para graduação histopatológica de malignidade.	83
Tabela 2 - Distribuição dos pacientes com carcinoma espinocelular e grupo controle, segundo as análises genética e morfológica.	91
Tabela 3 - Distribuição de frequência dos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de boca, segundo as características demográficas e história clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.	93
Tabela 4 - Distribuição de frequência dos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de boca, segundo o exame loco-regional. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.	95
Tabela 5 - Distribuição de frequência dos pacientes do grupo controle, segundo as características demográficas.	96
Tabela 6 - Distribuição de frequência dos genótipos 434 e dos alelos do gene <i>ECP</i> entre os pacientes portadores de carcinoma espinocelular de boca e os controles.	97
Tabela 7 - Distribuição de frequência dos carcinomas espinocelulares de boca, segundo a graduação de malignidade tumoral. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.	101
Tabela 8 - Distribuição de frequência dos carcinomas espinocelulares de boca, segundo o sistema de graduação de malignidade realizado no <i>front</i> de invasão tumoral. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.	102
Tabela 9 - Distribuição de frequência dos carcinomas espinocelulares de boca, segundo a intensidade da eosinofilia tecidual. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.	105
Tabela 10 - Correlação entre os genótipos 434 do gene <i>ECP</i> e a intensidade da eosinofilia tecidual associada aos tumores nos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.	109

Tabela 11 - Correlação entre os genótipos 434 do gene <i>ECP</i> e o tratamento, evolução e as variáveis microscópicas de infiltração neoplásica no subgrupo de pacientes com CEC de boca e eosinofilia tecidual intensa. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.	110
Tabela 12 - Correlação entre os genótipos 434 do gene <i>ECP</i> , as características demográficas e história clínica dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.	112
Tabela 13 - Correlação entre os genótipos 434 do gene <i>ECP</i> e as características clínicas dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.	113
Tabela 14 - Correlação entre os genótipos 434 do gene <i>ECP</i> , tratamento e evolução dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.	115
Tabela 15 - Correlação entre os genótipos 434 do gene <i>ECP</i> e a infiltração tumoral nos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.	117
Tabela 16 - Distribuição dos genótipos 434 do gene <i>ECP</i> , de acordo com a sobrevida global para cinco e dez anos. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.	122
Tabela 17 - Distribuição dos genótipos 434 do gene <i>ECP</i> , de acordo com a sobrevida livre de doença para cinco e dez anos. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.	123
Tabela 18 - Distribuição dos genótipos 434 do gene <i>ECP</i> , conforme a sobrevida específica por câncer para cinco e dez anos. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.	124

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

α	Alfa
β	Beta
μL	Microlitro
μm	Micrometro
μM	Micromolar
$^{\circ}\text{C}$	Grau centígrado
A	Base nitrogenada adenina
A.C.	Antônio Cândido
ADCC	Citotoxicidade celular dependente de anticorpo
arg	Aminoácido arginina
b-FGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
C	Base nitrogenada citosina
CEC	Carcinoma espinocelular
CEC I	Carcinoma espinocelular bem diferenciado
CEC II	Carcinoma espinocelular moderadamente diferenciado
CEC III	Carcinoma espinocelular pouco diferenciado ou indiferenciado
CEC SOE	Carcinoma espinocelular sem outra especificação
cm	Centímetro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
D.O.	Densidade óptica
ECP	Proteína catiônica eosinofílica
ECR	Esvaziamento cervical radical
ECRM (XI)	Esvaziamento cervical modificado, com preservação do nervo espinhal
ECRM (XI+VJ)	Esvaziamento cervical modificado, com preservação do nervo espinhal e da veia jugular interna
EDN	Neurotoxina derivada dos eosinófilos
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EOS	Eosinófilos
EOS/mm ²	Número de eosinófilos por milímetro quadrado
EPO	Peroxidase eosinofílica

ESOH	Esvaziamento cervical supra-omo-hióideo
ESR	Taxa de sedimentação de eritrócitos
E.U.A	Estados Unidos da América
Fc	Região constante do anticorpo (<i>Fragment crystallizable</i>)
FGF-2	Fator de crescimento fibroblástico-2
FMB	Faculdade de Medicina de Botucatu
G	Base nitrogenada guanina
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
H&E	Hematoxilina e eosina
HL	Linfoma de Hodgkin
Ig	Imunoglobulina
IgE	Imunoglobulina E
IgG	Imunoglobulina G
IFN- α	Interferon-alfa
IL	Interleucina
IL-2	Interleucina-2
IL-3	Interleucina-3
IL-4	Interleucina-4
IL-5	Interleucina-5
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
kDa	Quilodalton
M	Solução molar
MBP	Proteína básica maior
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
mL	Mililitro
mM	Milimol
mm ²	Milímetro quadrado
MOASS	Morte do paciente sem evidências de recidiva do tumor primário
MOCA	Morte do paciente decorrente do tumor primário
MPM	Marcador de peso molecular
N+	Presença de linfonodos regionais palpáveis

N0	Ausência de linfonodos regionais palpáveis
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3cm ou menos em seu maior diâmetro, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca
N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3cm e até 6cm em seu maior diâmetro, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca
N2b	Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6cm em seu maior diâmetro, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6cm em seu maior diâmetro, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca
N3	Metástase em linfonodo regional com mais de 6cm em seu maior diâmetro, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca
Nx	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
NaCl	Cloreto de sódio
ng	Nanograma
nm	Nanometro
NS	Esclerose nodular
PAF	Fator ativador plaquetário
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Concentração hidrogeniônica
pN+	Presença de metástase em linfonodos regionais confirmada microscopicamente
q	Braço longo do cromossomo humano
RCLB	Tampão de lise de células vermelhas
rECP 97 ^{arg}	Proteína catiônica eosinofílica recombinante contendo o aminoácido arginina na posição 97 do peptídeo maduro
rECP 97 ^{thr}	Proteína catiônica eosinofílica recombinante contendo o aminoácido treonina na posição 97 do peptídeo maduro
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RNase	Ribonuclease
RNase 3	Ribonuclease 3
RNase 4	Ribonuclease 4

RNase k6	Ribonuclease k6
rpm	Rotações por minuto
SAME	Serviço de arquivo médico
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
SNP	Polimorfismo genético de base única
T	Base nitrogenada timina
T1	Tumor com até 2cm em sua maior extensão, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca
T2	Tumor com mais de 2cm e até 4cm em sua maior extensão, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca
T3	Tumor com mais de 4cm em sua maior extensão, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca
T4	Tumor com mais de 4cm em sua maior extensão, invadindo estruturas adjacentes, segundo a classificação TNM para tumores malignos de boca
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
TABE	Eosinofilia sangüínea associada aos tumores
TATE	Eosinofilia tecidual associada aos tumores
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
Th2	Subpopulação de linfócitos T auxiliares
thr	Aminoácido treonina
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TNM	Classificação clínica de tumores malignos desenvolvida pela UICC baseada na extensão anatômica da doença (<i>Tumor Node Metastasis</i>)
U	Unidade
UICC	União internacional contra o câncer
UNESP	Universidade Estadual Paulista
V	Volt
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
Vivo 000	Vivo e sem evidência da doença

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	47
2 REVISÃO DE LITERATURA	53
2.1 EOSINÓFILOS E CÂNCER	55
2.2 EOSINOFILIA TECIDUAL ASSOCIADA AOS TUMORES (TATE)	57
2.3 PROTEÍNA CATIÔNICA EOSINOFÍLICA (ECP)	59
2.4 POLIMORFISMO 434(G>C) DO GENE <i>ECP</i>	62
3 PROPOSIÇÃO	69
4 CASUÍSTICA E MÉTODOS	73
4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	75
4.2 GRUPO CONTROLE	76
4.3 ANÁLISE DO POLIMORFISMO 434 (G>C) DO GENE <i>ECP</i>	76
4.3.1 Extração do DNA genômico	76
4.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)	77
4.3.3 Precipitação do produto da PCR	80
4.3.4 Polimorfismo avaliado por PCR-RFLP	80
4.3.5 Detecção das variantes alélicas do gene <i>ECP</i>	80
4.4 REGISTRO DOS DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS	81
4.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA	82
4.5.1 Análise microscópica qualitativa	82
4.5.2 Análise microscópica quantitativa	83
4.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO	84
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	86
4.8 QUESTÕES ÉTICAS	87
5 RESULTADOS	89
5.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO	91
5.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	92
5.3 CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA DO GRUPO CONTROLE	96
5.4 ANÁLISE DO POLIMORFISMO 434 (G>C) DO GENE <i>ECP</i>	97
5.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA	101
5.5.1 Análise microscópica qualitativa	101
5.5.2 Análise microscópica quantitativa	105

5.6 CORRELAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS 434 DO GENE <i>ECP</i> E A INTENSIDADE DA EOSINOFILIA TECIDUAL ASSOCIADA AOS TUMORES	109
5.7 CORRELAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS 434 DO GENE <i>ECP</i> E AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E MICROSCÓPICAS	111
5.8 CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DA EOSINOFILIA TECIDUAL ASSOCIADA AOS TUMORES E AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E MICROSCÓPICAS	121
5.9 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA	121
6 DISCUSSÃO	125
7 CONCLUSÕES	137
REFERÊNCIAS	141
APÊNDICES	151
ANEXOS	179

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A proteína catiônica eosinofílica (ECP), presente nos grânulos específicos dos eosinófilos, tem despertado especial interesse dos pesquisadores por sua atividade citotóxica, particularmente para as células tumorais (NAVARRO et al., 2008; TRULSON et al., 2007). Constitui-se de uma cadeia simples de 133 aminoácidos, com peso molecular de 15 a 22 kDa, cujo gene localiza-se no cromossomo 14 (q24-q31). Nas regiões adjacentes, encontram-se os genes de outras quatro proteínas, as quais constituem a superfamília das ribonucleases pirimidina-específicas (NAVARRO et al., 2008; DYER e ROSENBERG, 2006; CARRERAS et al., 2005; BYSTROM et al., 2002; ZHANG e ROSENBERG, 2000; VENGE et al., 1999; DOMACHOWSKE et al., 1998; VENGE e BYSTROM, 1998; ROSENBERG e DYER, 1995).

Além de sua atividade citotóxica para vírus, bactérias, parasitas e células tumorais, a ECP apresenta outras propriedades biológicas como imunomodulação, regulação da atividade fibroblástica, indução para produção de muco pelas vias respiratórias e interação com os sistemas de coagulação e complemento (JONSSON et al., 2006; JONSSON et al., 2002; BYSTROM et al., 2002; VENGE e BYSTROM, 1998; YOUNG et al., 1986; MCLAREN, PETERSON e VENGE, 1984).

O principal mecanismo responsável pelo efeito citotóxico da ECP se baseia na criação de poros nas membranas celulares, permitindo a passagem de água e pequenas moléculas, o que resulta em lise osmótica (ERIKSSON et al., 2007a; KOH et al., 2007; CARRERAS et al., 2005; SUGIHARA et al., 2001; VENGE et al., 1999; VENGE e BYSTROM, 1998; BARKER et al., 1989; YOUNG et al., 1986).

A presença de variantes moleculares da ECP reflete a heterogeneidade dessa proteína, que pode ser atribuída a diferenças na glicosilação da molécula, já que a mesma possui três locais potenciais para tal evento em sua seqüência de aminoácidos, bem como à presença de polimorfismos genéticos (TRULSON et al., 2007; ERIKSSON et al., 2007b; KOH et al., 2007; JONSSON et al., 2002; VENGE et al., 1999).

Um dos polimorfismos previamente identificados no gene *ECP* foi o 434(G>C), causado pela substituição do aminoácido arginina por treonina, na posição 97 do peptídeo maduro (TRULSON et al., 2007; ERIKSSON et al., 2007a; ERIKSSON et al., 2007b; JONSSON et al., 2006; MOLIN, 2004; JONSSON et al., 2002). Em pacientes asmáticos com sintomas alérgicos, demonstrou-se uma alta prevalência do genótipo 434GG, enquanto os

indivíduos 434CC não desenvolveram sintomas alérgicos, sugerindo íntima relação entre esse polimorfismo e alergia (JONSSON et al., 2002). Em pacientes com Linfoma de Hodgkin, notou-se uma correlação entre o genótipo 434GG e a presença de esclerose nodular histológica e altas taxas de sedimentação de eritrócitos, ambos indicadores de um prognóstico desfavorável (MOLIN, 2004).

Estudos recentes têm sugerido que os eosinófilos podem afetar, com mecanismos diretos e indiretos, as células malignas e que o microambiente neoplásico poderia liberar sinais adicionais para a degranulação dessas células e destruição tumoral (COSTELLO, O'CALLAGHAN e SEBAHOUN, 2005; GLEICH, 2000). Essa atividade tumoricida (COSTELLO, O'CALLAGHAN e SEBAHOUN, 2005; MUNITZ e LEVI-SCHAFFER, 2004; VENGE et al., 1999; VENGE e BYSTROM, 1998; TRULSON, NILSSON E VENGE, 1997) estaria relacionada principalmente à ação citotóxica de suas proteínas, destacando-se a ECP, a proteína básica maior (MBP), a peroxidase eosinofílica (EPO) e a neurotoxina derivada dos eosinófilos (EDN).

Mesmo com todo o conhecimento a respeito dos produtos citotóxicos tumorais secretados pelos eosinófilos, como a ECP, a função exata dessas células nas neoplasias malignas sólidas, como nos carcinomas espinocelulares (CECs), continua sendo um enigma (MINGOMATAJ, 2008; SIMSON et al., 2007; LOTFI, LEE e LOTZE, 2007; CORMIER et al., 2006; MUNITZ e LEVI-SCHAFFER, 2004; SAMOSZUK, 1997).

Nos últimos anos, a correlação entre a eosinofilia tecidual, a evolução e o prognóstico dos pacientes com CEC de boca tem sido investigada (LORENA et al., 2003a; LORENA et al., 2003b; DORTA et al., 2002). No estudo de DORTA et al. (2002), os pacientes com CEC de boca que exibiam eosinofilia tecidual intensa apresentaram maior sobrevida global e livre de doença. Além disso, a análise multivariada demonstrou que a TATE intensa foi indicador prognóstico favorável independente para esses pacientes.

Se por um lado a infiltração de eosinófilos nas neoplasias malignas tem sido associada a sua atividade antitumoral, outros defendem a hipótese de que essas células participam da remodelação do tecido conjuntivo e angiogênese em resposta a destruição causada pela infiltração das células neoplásicas (SAMOSZUK, 1997). A atividade eosinofílica apresenta forte influência sobre as propriedades fibroblásticas (LEVI-SCHAFFER et al., 1999; VENGE e BYSTROM, 1998; HERNNAS et al., 1992), modulando o processo de reparo tecidual devido à liberação das proteínas básicas contidas em seus grânulos, somadas à atuação do fator de crescimento transformador- β (TGF- β), fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2), interleucina-4 (IL-4) e IL-3 (MUNITZ e LEVI-SCHAFFER, 2004). Os eosinófilos também

contribuem para a angiogênese graças à produção e liberação de diversos fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico básico (b-FGF), IL-8, IL-6, TGF- β e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (GLEICH, 2000).

A despeito da presença marcante dos eosinófilos no estroma de algumas neoplasias malignas sólidas e a comprovação de sua capacidade citotóxica, pouco se sabe sobre a exata atividade dessa célula no comportamento biológico tumoral. A investigação da variabilidade genética da ECP e sua associação com a eosinofilia tecidual nos CECs de boca, como proposto no presente estudo, poderá contribuir para o conhecimento referente à participação do eosinófilo na evolução clínica e biológica dessa neoplasia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 EOSINÓFILOS E CÂNCER

Os eosinófilos (EOS) consistem em um tipo raro de granulócito envolvidos na patogênese de processos inflamatórios, lesão tecidual, imunidade antitumoral e doenças alérgicas (ERIKSSON et al., 2007a; HOGAN, 2007; ROTHENBERG, 2007; PRUSSIN e METCALFE, 2006; GLEICH, 2000; LEVI-SCHAFFER et al., 1999; WELLER, 1997). Em condições homeostáticas, concentram-se nas superfícies mucosas e em tecidos com alto “turnover” e capacidade regenerativa (TRIVEDI e LLOYD, 2007; LOTFI, LEE e LOTZE, 2007; ROSENBERG, PHIPPS e FOSTER, 2007; ROTHENBERG e HOGAN, 2006).

Apesar da presença marcante dos EOS no estroma de alguns tipos de neoplasias malignas sólidas, particularmente as de origem epitelial, a função exata dessas células nesses tumores continua obscura (MINGOMATAJ, 2008; SIMSON et al., 2007; LOTFI, LEE e LOTZE, 2007; CORMIER et al., 2006; MUNITZ e LEVI-SCHAFFER, 2004; SAMOSZUK, 1997). Há autores que defendem a hipótese de que o eosinófilo exerça uma atividade antitumoral, contudo outros sugerem que tal efeito seja modesto, já que tumores agressivos continuam a progredir, a despeito da presença desses granulócitos (SAMOSZUK, 1997).

O recrutamento dos EOS para a neoplasia maligna parece ocorrer pela ação coordenada entre as respostas imunes inata e adaptativa, especialmente pela ação das citocinas produzidas pelos linfócitos Th2 e mastócitos, além da expressão constitutiva de quimiocinas específicas para a linhagem celular eosinofílica, como a eotaxina (ELLYARD, SIMSON e PARISH, 2007; SIMSON et al., 2007; LORENA et al., 2003a; ABBAS e LICHTMAN, 2005). Entretanto, um estudo experimental recente (CORMIER et al., 2006) demonstrou que o acúmulo de EOS parece ser uma resposta inflamatória inicial e persistente do hospedeiro ao tumor, restrita a regiões específicas da neoplasia e independente da resposta imune Th2, sugerindo que as áreas necróticas do tumor produzem fatores quimiotáticos para essas células.

Outros estudos têm sugerido que os EOS podem interagir com as células tumorais por mecanismos diretos e indiretos e o microambiente neoplásico provavelmente libera sinais adicionais para a degranulação dessas células e conseqüente destruição tumoral (TRULSON et al., 2007; SIMSON et al., 2007; COSTELLO, O’CALLAGHAN e SEBAHOUN, 2005; GLEICH, 2000). A citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) representa um

dos mecanismos de lise celular desenvolvidos pelo eosinófilo. Nesse mecanismo, os EOS se ligam às células-alvo, as quais estão revestidas com baixas concentrações de imunoglobulina (Ig) G, por meio de seus receptores para a região constante (Fc) de IgG e a lise celular ocorre sem fagocitose (MITCHELL et al., 2006; ABBAS e LICHTMAN, 2005).

Um dos mecanismos diretos de atuação dos EOS nas neoplasias malignas está relacionado à atividade tumoricida exercida pela ação das proteínas citotóxicas presentes em seus grânulos específicos, destacando-se a proteína catiônica eosinofílica (ECP), a proteína básica maior (MBP), a peroxidase eosinofílica (EPO) e a neurotoxina derivada dos eosinófilos (EDN) (TRULSON et al., 2007; LOTFI, LEE e LOTZE, 2007; COSTELLO, O'CALLAGHAN e SEBAHOUN, 2005; MUNITZ e LEVI-SCHAFFER, 2004; LORENA et al., 2003a; VENGE et al., 1999; VENGE e BYSTROM, 1998; TRULSON, NILSSON e VENGE, 1997). Em adição, o eosinófilo produz espécies reativas de oxigênio capazes de promover estresse oxidativo e subsequente morte celular por necrose e apoptose (ERIKSSON et al., 2007a; ROTHENBERG e HOGAN, 2006; MUNITZ e LEVI-SCHAFFER, 2004; GLEICH, ADOLPHSON e LEIFERMAN, 1993).

Outra importante constatação relativa à presença de EOS em pacientes com neoplasias malignas foi a identificação de uma maior e significativa contagem sangüínea dessa célula, bem como dos níveis séricos de ECP, EDN e EPO antes e durante o tratamento com interleucina (IL)-2 e interferon-alfa (IFN- α), em pacientes portadores de adenocarcinoma renal. Sugeriu-se, com base nesses resultados, que a secreção dessas proteínas pode ocorrer via fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e através da interação direta dos EOS com as células tumorais por meio de mecanismo anticorpo-dependente (TRULSON, NILSSON e VENGE, 1997).

Se por um lado a infiltração de EOS nas neoplasias malignas tem sido associada a sua atividade tumoricida, outros defendem a hipótese de que essas células participam da remodelação do tecido conjuntivo e angiogênese em resposta à destruição tecidual causada pelo desenvolvimento tumoral (ELLYARD, SIMSON e PARISH, 2007; LEE e LEE, 2006; SUGIHARA et al., 2001; SAMOSZUK, 1997).

A atividade eosinofílica apresenta forte influência sobre as propriedades fibroblásticas (LEVI-SCHAFFER et al., 1999; VENGE e BYSTROM, 1998; HERNNAS et al., 1992), modulando o processo de reparo tecidual devido à liberação das proteínas básicas contidas em seus grânulos, somadas à atuação do fator de crescimento transformador-beta (TGF- β), fator de crescimento fibroblástico-2 (FGF-2), IL-4 e IL-3 (MUNITZ e LEVI-SCHAFFER, 2004). Os EOS também contribuem para a angiogênese graças à produção e liberação de diversos

fatores angiogênicos como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento fibroblástico básico (b-FGF), IL-8, IL-6, TGF- β e fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (MINGOMATAJ, 2008; ELLYARD, SIMSON e PARISH, 2007; GLEICH, 2000). Somadas às evidências anteriores, experimentos *in vitro* (SUGIHARA et al., 2001) demonstraram que a ECP foi capaz de degradar proteínas miofibrilares, especialmente a cadeia pesada da miosina e α -actina, além de proteínas do citoesqueleto associadas à membrana, reforçando a hipótese de que os EOS podem contribuir para a degradação de células musculares em lesão tecidual causada, por exemplo, pela invasão tumoral.

2.2 EOSINOFILIA TECIDUAL ASSOCIADA AOS TUMORES (TATE)

A eosinofilia tecidual associada aos tumores (TATE) é definida como a infiltração de EOS no estroma tumoral, não associada à necrose e/ou ulceração (LEIGHTON et al., 1996). Apesar da eosinofilia sangüínea associada aos tumores (TABE) ser encontrada em 5% a 33% dos pacientes com CEC de boca e estar associada a um pior prognóstico, a TATE parece ocorrer independentemente da sua presença e resultar de uma reação tecidual local (HORIE et al., 2007; ALRAWI et al., 2005; LOWE e FLETCHER, 1984; LOWE, JORIZZO e HUTT, 1981).

A primeira descrição da TATE, em neoplasias malignas de origem epitelial, ocorreu há mais de cem anos em carcinomas de cérvix. Entretanto, desde essa época a correlação clínica da TATE com o prognóstico dos pacientes continua controversa (HORIE et al., 2007; LEE e LEE, 2006; ALKHABULI e HIGH, 2006; ERCAN et al., 2005; LORENA et al., 2003b; WONG et al., 1999).

Essa controvérsia pode ser explicada pela ausência de uniformidade adotada para a definição e mensuração da TATE (LOTFI, LEE e LOTZE, 2007; ALKHABULI e HIGH, 2006; DORTA et al., 2002; LEIGHTON et al., 1996). De acordo com a definição de LEIGHTON et al. (1996), as áreas de necrose e/ou ulceração deveriam ser excluídas da análise microscópica, a fim de evitar uma avaliação inadequada das características tumorais. Contudo, muitos trabalhos (HORIUCHI et al., 1993; GOLDSMITH et al., 1992; GOLDSMITH et al., 1987) não aplicaram esse critério de exclusão.

Considerando especificamente as metodologias empregadas para a contagem dos EOS e definição da TATE, dois métodos merecem destaque. No método clássico, utiliza-se a média do número de EOS em dez campos de grande aumento. No segundo, também conhecido como da densidade, considera-se a maior densidade de EOS por área para cada espécime (ALKHABULI e HIGH, 2006; ERCAN et al., 2005). Estudo recente (ALKHABULI e HIGH, 2006) comparando os resultados obtidos pelos dois métodos, sugere que o método da densidade seria melhor pelo fato de os EOS aparecem em grupos e pela maior relação com a função dessas células. Adicionalmente, os parâmetros disponíveis na literatura para a classificação da TATE em discreta, moderada ou intensa, nos tumores da região de cabeça e pescoço, apresentam grande variação e a omissão do número de campos ou da área total analisada impossibilita a comparação entre os diferentes estudos (ERCAN et al., 2005; LORENA et al., 2003b; DORTA et al., 2002).

Na tentativa de estabelecer uma avaliação microscópica objetiva e reproduzível, DORTA et al. (2002), avaliaram a influência da TATE no prognóstico de 125 CECs de boca. Foram analisados 75 campos microscópicos (área = 1,32mm²) percorridos aleatoriamente, desde a superfície até a porção tumoral mais profunda, incluindo as células epiteliais malignas e o estroma. Os pacientes com eosinofilia intensa apresentaram maior sobrevida global e livre de doença. Além disso, a análise multivariada demonstrou que a TATE intensa foi indicador prognóstico favorável independente de idade, sexo, tabagismo, etilismo, localização do tumor, estádios clínicos T e N, bem como ocorrência de embolização vascular. Baseados nesses resultados, os autores sugeriram uma atividade antitumoral dos EOS.

Utilizando parte dos CECs de boca com TATE estudados por DORTA et al. (2002), LORENA et al. (2003b) compararam o número de EOS identificados por hematoxilina-eosina (H&E) e por imuno-histoquímica em 30 espécimes cirúrgicos. Vinte e cinco imagens microscópicas (área = 0,396875mm²) obtidas da região do “front” de invasão tumoral foram analisadas e o número de EOS/mm² registrado. Diferença estatística significativa não foi encontrada entre o número de EOS identificados pelos dois métodos, entretanto a média do número de EOS/mm² foi maior do que a encontrada por DORTA et al. (2002).

Apesar de avaliarem os mesmos espécimes, a discrepância referente ao número de EOS/mm² encontrados nos trabalhos de DORTA et al. (2002) e LORENA et al. (2003b), poderia ser explicada pelo fato de que DORTA et al. (2002) avaliaram uma área maior do tumor desde a superfície até a porção tumoral mais profunda, enquanto LORENA et al. (2003b) analisaram uma área menor, obtida apenas da região do “front” de invasão. Esses resultados reforçam a observação de que a mensuração dos EOS em áreas previamente

determinadas, como a região do “front”, onde importantes interações carcinoma-estroma acontecem, pode não refletir precisamente a ocorrência da TATE nas neoplasias malignas.

Outros autores (GOLDSMITH et al., 1992; GOLDSMITH et al., 1987) também encontraram correlação estatística significativa entre a TATE, a evolução clínica favorável e a menor ocorrência de metástases a distância, em CECs da região de cabeça e pescoço. Tais resultados devem ser avaliados com cautela, já que o tempo de preservação dos pacientes foi de apenas dois anos e os espécimes avaliados pertenciam a diferentes localizações anatômicas da região de cabeça e pescoço, as quais apresentam prognósticos variáveis entre si (LEIGHTON et al., 1996).

Se por um lado a presença de EOS nas neoplasias malignas tem sido associada a um prognóstico favorável, outros autores (HORIUCHI et al., 1993) observaram que os pacientes com CECs de boca com intensa infiltração eosinofílica apresentaram prognóstico menos favorável, independentemente da localização e do estágio clínico. Resultados similares foram descritos em estudo posterior (ALRAWI et al., 2005), sugerindo que a contagem elevada do número de EOS em biópsias e peças cirúrgicas de CECs de trato aerodigestivo, incluindo a cavidade bucal, representa um indicador positivo para a invasão e agressividade tumoral.

Somando-se às evidências anteriores, os estudos experimentais também têm apresentado resultados discrepantes. Alguns autores (WONG et al., 1999) mostraram que a depleção da TATE utilizando anticorpo anti-IL-5, em CECs de boca induzidos por carcinogênese química, resultou em um atraso na visualização clínica inicial dos tumores, bem como em redução do tamanho das lesões. Controversamente, em camundongos geneticamente modificados, caracterizados pela presença de 25 a 50% de EOS na população de leucócitos circulantes, notou-se uma menor incidência de fibrossarcomas induzidos quimicamente, assim como um retardo no crescimento neoplásico e maior recrutamento de EOS para o tumor e tecidos circundantes. Além disso, camundongos deficientes em eotaxina-1 foram mais acometidos por essa neoplasia maligna, além de apresentarem um influxo reduzido de EOS para a região tumoral (SIMSON et al., 2007).

2.3 PROTEÍNA CATIÔNICA EOSINOFÍLICA (ECP)

A ECP, também denominada ‘ribonuclease 3’ (RNase 3), é uma proteína catiônica de cadeia simples de 133 aminoácidos, com peso molecular entre 15 a 22 kDa, cujo gene (RNS3)

localiza-se no cromossomo 14 (q24-q31) (Figura 1). Nas regiões adjacentes desse cromossomo existem os genes de outras quatro proteínas: angiogenina, RNase 4, RNase k6 e EDN. Juntamente com a ECP, constituem a superfamília das ribonucleases pirimidina-específicas (ROSENBERG, 2008; NAVARRO et al., 2008; DYER e ROSENBERG, 2006; CARRERAS et al., 2005; BYSTROM et al., 2002; ZHANG e ROSENBERG, 2000; VENGE et al., 1999; DOMACHOWSKE et al., 1998; VENGE e BYSTROM, 1998; ROSENBERG e DYER, 1995).

Apesar de a EDN e ECP apresentarem 70% de homologia na sequência de aminoácidos, a atividade de RNase da ECP é cem vezes menor do que a da EDN e essa atividade parece não estar relacionada com a maioria das suas propriedades biológicas descritas *in vitro* (ROSENBERG, 2008; JONSSON et al., 2006; CARRERAS et al., 2005; VENGE et al., 1999; VENGE e BYSTROM, 1998; ROSENBERG e DYER, 1995). Entretanto, outros autores (DYER e ROSENBERG, 2006) sugerem que devem existir outras funções biológicas ribonuclease-dependentes exercidas pela ECP ainda não descobertas.

A proteína catiônica eosinofílica consiste em uma das principais proteínas presentes na matriz dos grânulos específicos dos EOS e sua secreção ocorre após ativação celular por mecanismos mediados por imunoglobulinas, partículas recobertas com proteínas do sistema complemento ou mediadores lipídicos, como o fator ativador plaquetário (PAF) (KOH et al., 2007; CARRERAS et al., 2005; BYSTROM et al., 2002; VENGE et al., 1999).

Apesar de a ECP ser produzida exclusivamente pelos EOS, pequenas quantidades dessa proteína foram identificadas em neutrófilos circulantes, sugerindo que essas células são capazes de fagocitar a ECP da corrente sanguínea e estocá-la em seus grânulos primários (MONTESEIRÍN e VEGA, 2008; BYSTROM et al., 2002; VENGE et al., 1999). Com base nessas observações, os autores (MONTESEIRÍN e VEGA, 2008) salientam que a interpretação de reações imuno-histoquímicas deve ser feita com cuidado, quando anticorpo anti-ECP for utilizado como marcador específico de EOS, já que outras células podem apresentar marcação positiva para esse anticorpo.

Cromossomo 14

Figura 1 – Estrutura do gene *ECP* e a proteína traduzida. O gene se localiza no cromossomo 14 e apresenta dois éxons. O quadrado preto representa uma sequência de DNA localizada no íntron, que aumenta a atividade da região promotora. Na proteína, os elementos “+” indicam a presença do aminoácido básico arginina, as caixas representam os locais de glicosilação e “C”, as posições dos aminoácidos cisteína. Adaptado de VENGE e BYSTROM, 1998.

Devido a sua atividade citotóxica para vírus, bactérias, parasitas, células epiteliais respiratórias e células tumorais, a ECP tem despertado especial interesse dos pesquisadores (NAVARRO et al., 2008; TRULSON et al., 2007; ERIKSSON et al., 2007b; CARRERAS et al., 2005; MOLIN, 2004; BYSTROM et al., 2002). O principal mecanismo responsável pelo efeito citotóxico da ECP se baseia na criação de poros nas membranas celulares, por meio da desestruturação da bicamada fosfolipídica, permitindo a passagem de água e pequenas moléculas, resultando em lise osmótica (ERIKSSON et al., 2007a; KOH et al., 2007; CARRERAS et al., 2005; SUGIHARA et al., 2001; ZHANG e ROSENBERG, 2000; VENGE et al., 1999; VENGE e BYSTROM, 1998; ROSENBERG e DYER, 1995; LEHRER et al., 1989; BARKER et al., 1989; YOUNG et al., 1986). A sequência de eventos que ocorre

durante a atividade citotóxica da ECP foi descrita com riqueza de detalhes em experimentos recentes, utilizando linhagens celulares de leucemia promielocítica aguda humana e de adenocarcinoma de cérvix (NAVARRO et al., 2008). O mecanismo se inicia com a ligação e agregação da ECP na superfície celular, seguidas de uma alteração na permeabilidade da membrana, a qual resulta em modificações no equilíbrio iônico intracelular. Esses sinais iniciam mudanças morfológicas e bioquímicas específicas, como condensação da cromatina, produção de espécies reativas de oxigênio, ativação da atividade de caspase-3-like e, eventualmente, morte celular. Além disso, o grande número de resíduos de arginina na superfície molecular e o resíduo de triptofano na posição 35 do polipeptídeo parecem contribuir com as interações eletrostáticas para ligação da ECP na membrana celular (NAVARRO et al., 2008; CARRERAS et al., 2005).

Outras atividades biológicas não-citotóxicas também são desenvolvidas pela ECP, como imunomodulação, regulação da atividade fibroblástica, indução para produção de muco pelas vias respiratórias e interação com os sistemas de coagulação, fibrinólise e complemento (JONSSON et al., 2006; JONSSON et al., 2002; BYSTROM et al., 2002; VENGE e BYSTROM, 1998; YOUNG et al., 1986; MCLAREN, PETERSON e VENGE, 1984).

A presença de variantes moleculares da ECP reflete a heterogeneidade dessa proteína, que pode ser atribuída a diferenças na glicosilação da molécula, já que a mesma possui três locais potenciais para tal evento em sua seqüência de aminoácidos (Figura 1), bem como a presença de polimorfismos genéticos de base única (SNPs) (TRULSON et al., 2007; ERIKSSON et al., 2007b; KOH et al., 2007; JONSSON et al., 2002; VENGE et al., 1999).

2.4 POLIMORFISMO 434(G>C) DO GENE *ECP*

Polimorfismo genético consiste na ocorrência de dois ou mais genótipos alternativos em uma população, quando a frequência de cada um deles é superior àquela que poderia ser mantida somente por mutações recorrentes (FARAH, 2007; GRIFFITHS et al., 2006; MOLIN, 2004). A função fisiológica ou patológica dos SNPs é muito heterogênea. Alguns provavelmente não apresentam relevância, mas se o polimorfismo estiver situado na região do gene que codifica uma proteína com função patofisiológica em uma determinada doença e sua presença alterar a função ou nível de produção da mesma, então o polimorfismo pode causar ou alterar a progressão dessa patologia (MOLIN, 2004).

Estudo populacional realizado com indivíduos de diferentes etnias revelou a presença de sete SNPs no gene *ECP*, sendo seis deles localizados em regiões não codificadoras do gene e apenas um na região codificadora (ZHANG e ROSENBERG, 2000). Devido a estudos anteriores (MUNTHER-KAAS et al., 2007; ERIKSSON et al., 2007a; JONSSON et al., 2006; MOLIN, 2004; NOGUCHI et al., 2003; JONSSON et al., 2002) terem demonstrado uma associação entre o polimorfismo 434(G>C) e algumas patologias, esse polimorfismo tem despertado um maior interesse entre os pesquisadores.

O polimorfismo 434(G>C) localiza-se na região codificadora do gene *ECP* e resulta da substituição de G por C na posição 434, causando uma alteração do aminoácido arginina (arg) para treonina (thr) na posição 97 do peptídeo maduro (TRULSON et al., 2007; ERIKSSON et al., 2007a; ERIKSSON et al., 2007b; JONSSON et al., 2006; MOLIN, 2004; JONSSON et al., 2002). Experimentos realizados com linhagens celulares de eritroleucemia e de carcinoma de pequenas células de pulmão (TRULSON et al., 2007), revelaram que as propriedades biológicas da ECP são alteradas por esse polimorfismo, já que as proteínas recombinantes que continham uma thr na posição 97 (rECP 97^{thr}) perderam sua atividade citotóxica quando comparadas à proteína nativa ou com a forma recombinante que possuía uma arg (rECP 97^{arg}) na mesma posição. Baseados nesses resultados, os autores sugeriram que a capacidade citotóxica da ECP tem forte ligação com a região do aminoácido 97, mas que a arg não representa um pré-requisito para essa atividade, já que a deglicosilação da rECP 97^{thr} foi capaz de convertê-la em uma molécula citotóxica com propriedades similares à rECP 97^{arg}. Além disso, a mudança da arg para a thr permite o surgimento de um local potencial para glicosilação e essas modificações pós-traducionais apresentam forte influência nas propriedades citotóxicas da ECP.

A presença de EOS constitui uma característica marcante das doenças do trato respiratório superior e como a ECP representa uma molécula efetora chave nas inflamações alérgicas (TRULSON et al., 2007; MUNTHER-KAAS et al., 2007), alguns trabalhos têm investigado a possível associação entre os SNPs do gene *ECP* e a patogênese da asma (MUNTHER-KAAS et al., 2007; JONSSON et al., 2006; NOGUCHI et al., 2003; JONSSON et al., 2002). Dentre os polimorfismos pesquisados, o 434(G>C) apresentou correlação com o desenvolvimento de sintomas alérgicos em pacientes asmáticos, sendo que uma alta frequência do genótipo 434GG foi detectada nos indivíduos alérgicos, enquanto os portadores do genótipo homozigoto para o alelo 434C não desenvolveram esses sintomas (JONSSON et al., 2002).

Estudo recente (JONSSON et al., 2006) detectou uma estreita relação entre os polimorfismos 434(G>C) e 562(G>C), sendo que ambos ocorreram conjuntamente. O genótipo 434GG foi detectado somente em associação com genótipo 562GG. Todavia, a ligação de dependência entre eles não parecia ser bilateral, já que os polimorfismos 562(G>C) ocorriam com qualquer um dos genótipos 434(G>C). Em contrapartida, associações entre o polimorfismo 562(G>C) ou haplótipos dos dois polimorfismos com a alergia não foram encontradas. Outro aspecto interessante dessa pesquisa foi a constatação de que os níveis celulares de ECP de indivíduos 562GC ou 562CC foram significativamente menores, sugerindo que o conteúdo intracelular de ECP nos EOS do sangue periférico poderia ser influenciado por esse polimorfismo.

Controversamente, outros autores (MUNTHER-KAAS et al., 2007) constataram que a combinação dos SNPs -38CA, +371CG [434(G>C)] e +499CG [562(G>C)], particularmente o haplótipo A-G-G, apresentou associação significativa com a asma alérgica, hiperresponsividade brônquica, assim como níveis séricos elevados de ECP e IgE. Apesar desse trabalho ter demonstrado uma associação entre o alelo +371C (434C) e a asma do tipo não alérgica, o resultado não pode ser comparado ao de JONSSON et al. (2002), já que esses realizaram um estudo do tipo caso-controle, enquanto MUNTHER-KAAS et al. (2007) incluíram apenas famílias com pelo menos duas crianças afetadas pela asma.

Investigação semelhante (NOGUCHI et al., 2003), avaliou a correlação dos SNPs -393CT, -38CA e 124Arg/Thr [434(G>C)] com a asma. Embora, nenhuma associação entre esse haplótipo e a asma tenha sido encontrada, os indivíduos portadores do alelo -393T apresentaram níveis séricos de ECP significativamente menores.

Graças à importante participação da ECP nas parasitoses, alguns autores (ERIKSSON et al., 2007a) têm investigado o impacto do polimorfismo 434(G>C) na infecção por *Schistosoma mansoni*. A frequência dos genótipos variou entre as diferentes populações estudadas, sendo que os indivíduos residentes na região endêmica da esquistossomose apresentaram uma predominância do alelo 434C, enquanto o grupo controle mostrou uma predominância do alelo 434G, sugerindo o genótipo 434GG codifica uma proteína com atividade citotóxica para esse parasita, enquanto o genótipo 434CC traduz uma variante inativa.

Nas neoplasias malignas, muito pouco tem sido estudado sobre o polimorfismo 434(G>C). Um único trabalho (MOLIN, 2004), realizado em pacientes portadores de Linfoma de Hodgkin (HL), revelou que o genótipo 434GG foi correlacionado com esclerose nodular histológica (NS) e altas taxas de sedimentação de eritrócitos (ESR), contribuindo para um

prognóstico desfavorável. Além disso, a maioria dos pacientes apresentou elevados níveis séricos de ECP, os quais se correlacionaram com o número de EOS tumorais, NS, ESR e maior leucometria.

Na literatura indexada, nenhum trabalho sobre a associação entre o polimorfismo 434(G>C) do gene *ECP* e a eosinofilia tecidual associada aos CECs de boca foi encontrado, fato que justifica a relevância do presente estudo e sua possível contribuição para o conhecimento a respeito da evolução clínica e biológica dessa neoplasia.

Figura 2 – Diferenciação, maturação, transmigração e acúmulo do eosinófilos na região tumoral. A ECP, presente nos grânulos específicos dessas células, apresenta atividade citotóxica para células tumorais, entretanto a associação entre o polimorfismo 434(G>C) do gene *ECP* e a eosinofilia tecidual nos carcinomas espinocelulares de boca permanece desconhecida. Adaptada de GLEICH, 2000.

3 PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

Com base na análise retrospectiva dos 157 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, propôs-se:

- 3.1. investigar a prevalência do polimorfismo 434(G>C) do gene da proteína catiônica eosinofílica (*ECP*);
 - 3.2. quantificar a eosinofilia tecidual associada aos carcinomas espinocelulares de boca e classificá-la de acordo com a intensidade;
 - 3.3. verificar a existência de associação entre o polimorfismo 434(G>C) do gene *ECP* e a eosinofilia tecidual associada aos carcinomas espinocelulares de boca;
 - 3.4. correlacionar, se possível, o polimorfismo 434(G>C) do gene *ECP* com a evolução e o prognóstico desses pacientes.
-

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

A população de estudo foi composta por 157 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de boca submetidos a tratamento no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo, Fundação Antônio Prudente, São Paulo, Brasil, entre 1984 e 2002.

Parte das amostras utilizadas foi obtida em estudo anterior do tipo caso-controle de base hospitalar intitulado “Epidemiologia molecular dos carcinomas de vias aéreas digestivas superiores”, aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do referido hospital (ANEXO B).

Os critérios de inclusão adotados para a seleção compreenderam:

- 1) pacientes com tumor primário diagnosticado como carcinoma espinocelular de boca confirmado por biópsia;
- 2) pacientes com tumor localizado nas seguintes regiões: língua, assoalho bucal, gengiva superior, palato duro, palato mole, gengiva inferior, mucosa jugal e área retromolar;
- 3) pacientes submetidos a cirurgia como tratamento inicial com finalidade curativa, seguido ou não por radioterapia pós-operatória;
- 4) preservação clínica completa;
- 5) tecido tumoral disponível para análise (lâminas e/ou bloco de parafina);
- 6) amostra de sangue periférico ou DNA disponível para a análise molecular.

Os critérios de exclusão foram:

- 1) contra-indicação para cirurgia (pacientes considerados inoperáveis);
 - 2) presença de outros tumores primários simultâneos;
 - 3) pacientes que recusaram o tratamento cirúrgico;
 - 4) pacientes tratados com finalidade paliativa;
 - 5) pacientes com metástase a distância na época da admissão;
 - 6) tumores que apresentavam, microscopicamente, extensas áreas de ulceração e/ou necrose.
-

4.2 GRUPO CONTROLE

Para a análise do polimorfismo 434 (G>C) do gene *ECP* na população, foi utilizado um grupo controle composto por 165 pacientes sem história ou suspeita de carcinoma espinocelular de boca, encaminhados aos Departamentos de Ginecologia e Obstetrícia e Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP), bem como por pacientes oriundos do Departamento de Ética e Legislação Trabalhista da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

As amostras constituíam parte de um Banco de Controles do Laboratório Neogene do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP), obtido de pesquisas anteriores em colaboração com a Dr^a. Anaglória Pontes, Dr^a. Maria Fernanda Moreira Ferraz, Dr. José Carlos Souza Trindade Filho, Dr. João Lauro Viana de Camargo e Dr^a. Marcília de Araújo Medrada Faria.

As informações referentes aos dados demográficos dos pacientes do grupo controle foram registradas e obtidas a partir do banco de dados pertencente ao Laboratório Neogene.

4.3 ANÁLISE DO POLIMORFISMO 434 (G>C) DO GENE *ECP*

Todos os experimentos utilizados para a análise do polimorfismo 434 (G>C) do gene *ECP* foram realizados no Laboratório Neogene do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP), sob a responsabilidade da Prof^a. Dr^a Silvia Regina Rogatto.

4.3.1 Extração do DNA genômico

O DNA genômico foi extraído a partir das amostras de sangue periférico (5-10mL). O sangue colhido foi acondicionado com anticoagulante, solução estéril de EDTA 6%, e tratado com tampão de lise de células vermelhas (RCLB pH 7,6 1X: 10mM de Tris; 5mM de MgCl₂ e 10mM de NaCl), por três vezes. Após cada lavagem com esse tampão, as amostras foram

centrifugadas a 13000rpm (Centrifuge 5415D Eppendorf, Alemanha) por 30 minutos, com o objetivo de eliminar as hemácias.

Posteriormente, isolou-se a papa leucocitária e o sedimento foi ressuspendido em 500µL de tampão de lise de células brancas (75mM de NaCl; 24mM de EDTA pH 8,0 e 2% de SDS). A lise celular foi seguida pela adição de proteinase K (Sigma, E.U.A) a uma concentração final de 200µL/mL e o material foi incubado por 12 horas a 37°C.

Para a extração de proteínas e ácidos graxos, liberados juntamente com o DNA após o rompimento dos leucócitos, utilizou-se o tratamento com solventes orgânicos (fenol-clorofórmio). Adicionaram-se 500µL de solução fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção de 25:24:1, respectivamente. Homogeneizou-se por um minuto seguido da centrifugação por 30 minutos a 13000rpm (Centrifuge 5415D Eppendorf, Alemanha). O sobrenadante foi transferido para outro tubo e repetiu-se essa lavagem mais duas vezes. Em seguida, foram acrescidos, ao sobrenadante, 500µL de clorofórmio, para eliminar os resquícios do fenol e procedeu-se a última centrifugação por 30 minutos a 13000rpm.

O sobrenadante foi novamente isolado e acondicionaram-se 50µL de acetato de amônio 7M e etanol absoluto gelado (Merck, Alemanha). O DNA foi precipitado após aproximadamente 16 horas a -20°C. O material foi centrifugado a 14000rpm a 4°C (Centrifuge 5415D Eppendorf, Alemanha) e o etanol foi descartado.

O sedimento foi seco e o DNA foi posteriormente ressuspendido em um volume adequado de água ultrapura estéril. Para quantificação do material foi realizada a leitura da densidade óptica (D.O.) das soluções de DNA em espectrofotômetro (Spectronic Unicam, Genesys™8, E.U.A.), em cuvetas de quartzo, para o comprimento de onda de 260nm. Após a quantificação, uma alíquota do DNA genômico foi utilizada na reação em cadeia da polimerase para amplificação do fragmento específico do gene estudado.

4.3.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O polimorfismo estudado encontra-se na posição 434 do gene *ECP*, de acordo com o GenBank™ (NCBI – *National Center for Biotechnology Information* – NIH, E.U.A. – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), número de acesso NM 002935.

Esse polimorfismo refere-se à substituição de G por C na posição 434 (434G>C) do gene, causando uma alteração do aminoácido arginina (base G) na posição 97 para treonina (base C) – GenBank™ AF441205. Esta substituição cria um sítio polimórfico do tipo RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) detectado pela endonuclease de restrição PstI.

Para a análise desse RFLP, foi utilizada a PCR para a amplificação de um fragmento de 644pb. Os oligonucleotídeos utilizados foram: 5'-GTGTGTCATAACCGAGACCGGATCG-3' e 5'-GGACAGTTGCTGATACCCAGAGTAC-3' (GenBank™ – X16545).

Em um tubo de polipropileno de 0,2mL, aproximadamente 100ng de DNA genômico foram amplificados numa reação de 25μL, contendo 0,2 mM de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dNTP) (Invitrogen Life Technologies, E.U.A.), tampão da reação 1x (Invitrogen Life Technologies, E.U.A.), 1,25 mM de MgCl₂ (Invitrogen Life Technologies, E.U.A.), 0,4μM de cada primer (Invitrogen Life Technologies, E.U.A.) e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen Life Technologies, E.U.A.). As reações foram processadas em termociclador (Gene Amp PCR System 9700 - Applied Biosystems, E.U.A.) e compreenderam 30 ciclos, de acordo com a Figura 3.

Figura 3 – Esquema representando as condições utilizadas na reação em cadeia da polimerase para amplificação do gene da proteína catiônica eosinofílica. Adaptado de FARAH, 2007.

Para observação da origem e especificidade do produto amplificado, cerca de 3µL foram visualizados em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (0,5mg/mL) após corrida eletroforética a 120V constantes, em tampão contendo 45mM de Tris, 45mM de ácido bórico e 0,1mM de EDTA. A documentação fotográfica dos géis de agarose foi feita utilizando-se câmera digital (Kodak DC 290, E.U.A.) acoplada a um suporte colocado sobre o aparelho emissor de luz ultra-violeta. A câmera encontrava-se conectada a um microcomputador contendo o respectivo programa de aquisição e análise de imagens.

A localização cromossômica, sequência amplificada e região polimórfica do gene *ECP* estão representadas na Figura 2 A a C.

Figura 4 – **A)** Ideograma do cromossomo 14, no qual está mapeado o gene *ECP* (14q24-31); **B)** o polimorfismo refere-se a uma transversão de **G** para **C** na posição 434; abaixo está a sequência reconhecida pela enzima *Pst*I; **C)** sequência nucleotídica do gene *ECP* amplificada pela PCR; em **azul** estão destacados os *primers*, em **verde** a sequência reconhecida pela enzima de restrição e em **vermelho** o polimorfismo.

4.3.3 Precipitação do produto da PCR

Os produtos amplificados pela PCR foram transferidos para tubos de polipropileno de 0,5mL e incubados com 300µL de etanol absoluto gelado (Merck, Alemanha) por cerca de uma hora a -70°C. Em seguida, foram centrifugados a 11000rpm (Centrifuge 5415D Eppendorf, Alemanha) por 30 minutos e o sobrenadante descartado. O precipitado foi desidratado (Concentrator 5301 Eppendorf, Alemanha) por cerca de 15 minutos, ressuspendido em 5µL de água ultrapura estéril e mantido a -4°C por 24 horas para posterior utilização na reação de digestão com a enzima de restrição PstI.

4.3.4 Polimorfismo avaliado por PCR-RFLP

As amostras foram incubadas a 37°C por 24 horas em banho-maria (Precision Model 281, Precision Scientific Inc, E.U.A.) com 10U da enzima de restrição PstI (Invitrogen Life Technologies, E.U.A.).

A observação dos produtos do gene *ECP* digeridos com a enzima PstI foi realizada após eletroforese em gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (0,5mg/mL) após corrida eletroforética a 120V constantes, em tampão contendo 45mM de Tris, 45mM de ácido bórico e 0,1mM de EDTA.

4.3.5 Detecção das variantes alélicas do gene *ECP*

O polimorfismo do gene *ECP* apresenta duas variantes alélicas: G para a presença do sítio de restrição e C para ausência. Os três genótipos possíveis serão denominados **434GG** para o homozigoto predominante que apresenta o sítio de reconhecimento para *PstI*; um indivíduo homozigoto para o alelo raro possui genótipo **434CC** correspondendo a uma substituição de guanina por citosina e o indivíduo de genótipo **434GC** é heterozigoto.

Após a clivagem e eletroforese em gel agarose a 2%, foi identificada uma banda de 644pb (genótipo 434CC) caracterizada pela ausência desse sítio de restrição; um fragmento de 430bp e um de 214pb (genótipo 434GG) caracterizados pela presença do sítio de restrição e três fragmentos que representam os indivíduos heterozigotos (Figura 3).

Figura 5 – À esquerda, visualiza-se um esquema representativo da observação em gel de agarose a 2% dos fragmentos gerados após amplificação do gene *ECP* resultantes da digestão com a enzima de restrição *Pst*I. À direita, visualiza-se uma foto em gel de agarose a 2% correspondente aos genótipos do esquema (pb= pares de base).

4.4 REGISTRO DOS DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS

As informações clínicas e microscópicas referentes aos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de boca e à peça cirúrgica foram registradas em formulário próprio (APÊNDICE A) e obtidas a partir do banco de dados pertencente ao Hospital do Câncer A.C. Camargo.

Os registros incluíram a identificação, dados demográficos, história clínica, exame loco-regional, cirurgia, radioterapia pós-operatória, informações microscópicas da peça cirúrgica e evolução. Para os pacientes vivos, a evolução clínica foi atualizada até novembro de 2007, por meio de consulta aos respectivos prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico (SAME) do referido hospital.

4.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Pela impossibilidade de obtenção de blocos de parafina e/ou lâminas, 26 casos foram excluídos das análises microscópicas. As descrições seguintes se referem a 131 peças cirúrgicas de carcinomas espinocelulares de boca.

4.5.1 Análise microscópica qualitativa

Para a análise microscópica qualitativa, foram utilizados cortes de 3µm de espessura obtidos a partir de 131 peças cirúrgicas de carcinomas espinocelulares primários de boca incluídos em parafina e arquivados no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo. Esses cortes foram corados pela técnica da hematoxilina e eosina (H&E) seguindo-se os procedimentos histotécnicos de rotina do Laboratório de Anatomia Patológica desse hospital.

A graduação histopatológica de malignidade tumoral foi realizada em corte representativo do tumor primário de cada caso e baseou-se nos critérios estabelecidos por BRYNE et al. (1992).

Esse sistema multifatorial de avaliação compreende a análise de cinco características morfológicas: grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, número de mitoses, padrão de invasão e resposta do hospedeiro, representada pela presença e quantidade de infiltrado inflamatório mononuclear (Tabela 1).

Somente as células das porções mais profundas e invasivas dos cortes microscópicos dos carcinomas espinocelulares de boca foram graduadas, sendo que cada característica mencionada recebeu uma pontuação que variou 1 a 4 pontos.

As pontuações individuais para cada característica morfológica foram somadas, determinando um índice total de malignidade tumoral que variou de 5 a 20 pontos (Tabela 1). Os espécimes tumorais foram então classificados como pouco agressivos (escore final ≤ 12 pontos) ou muito agressivos (escore final > 12 pontos).

A análise microscópica foi realizada individualmente por dois examinadores (MCP e DTO) utilizando-se um microscópio óptico binocular (Axioskop2-plus - Zeiss, Alemanha),

sendo os pontos de discordância reavaliados e estabelecidos por um consenso dos referidos examinadores.

Tabela 1 – Sistema utilizado para graduação histopatológica de malignidade.

Características	Escore			
Morfológicas	1	2	3	4
Grau de queratinização	Alto (>50% células)	Moderado (20-50% células)	Mínimo (5-20% células)	Ausente (0-5% células)
Pleomorfismo nuclear	Escasso (> 75% células maduras)	Moderado (50-75% células maduras)	Abundante (25-50% células maduras)	Extremo (0-25% células maduras)
Número de mitoses	0-1	2-3	4-5	>5
Padrão de invasão	Compressivo	Cordões grossos	Cordões finos Pequenos grupos celulares	Células isoladas
Resposta do hospedeiro	Intensa	Moderada	Discreta	Ausente

Fonte: Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. J Pathol. 1992; 166(4):375-81.

4.5.2 Análise microscópica quantitativa

Para a análise microscópica quantitativa, foram utilizados os mesmos cortes microscópicos dos carcinomas espinocelulares de boca empregados para o estudo qualitativo.

A eosinofilia tecidual associada aos tumores (TATE) foi determinada por análise morfométrica e seguiu a metodologia estabelecida por DORTA et al. (2002) e LORENA et al. (2003b).

A quantificação dos eosinófilos foi realizada individualmente por dois examinadores (MCP e DTO) com o auxílio de um programa de captura, processamento e análise de imagens (AxioVision 4.5 - Zeiss, Alemanha) instalado em um microcomputador (Pentium IV, Intel, E.U.A.).

Para aquisição das imagens, utilizou-se câmera digital (AxioCam MRc - Zeiss, Alemanha) acoplada a um microscópio óptico binocular (Axioskop2-plus - Zeiss, Alemanha) contendo uma objetiva de 40x, resultando em um aumento final de 400x.

Vinte e cinco imagens obtidas da porção tumoral mais profunda foram capturadas para cada um dos 131 carcinomas espinocelulares de boca. Cada imagem microscópica capturada correspondia a uma área de $0,09471591\text{mm}^2$. O número total de eosinófilos encontrados nas 25 imagens foi registrado. Calculou-se o número de eosinófilos por milímetro quadrado dividindo-se a média dos eosinófilos presentes nas 25 imagens examinadas pela área total analisada. Três graus de intensidade da TATE foram estabelecidos: eosinofilia ausente/discreta, moderada ou intensa.

4.6 VARIÁVEIS DE ESTUDO

As variáveis analisadas nesse estudo incluíram a coleta dos dados demográficos relativos aos pacientes como gênero (masculino ou feminino), idade e raça (branca, amarela, negra ou outras).

Quanto à história clínica dos pacientes, pesquisou-se o tempo de história (em meses), história familiar de câncer (ausente, pais, irmãos, outros parentes ou desconhecida), tabagismo e etilismo.

O tabagismo e o etilismo foram graduados em 0, +, ++, +++ e ++++, sendo no tabagismo cada “+” correspondente ao consumo de aproximadamente dez cigarros industrializados ou dois cachimbos ou dois charutos ou quatro cigarros de palha por dia e no etilismo cada “+” correspondente aproximadamente ao consumo de um copo de bebida destilada ou uma garrafa de cerveja ou meia garrafa de vinho por dia.

A presença de eosinofilia sangüínea, quando valores superiores a 5% de eosinófilos fossem detectados no hemograma pré-operatório, também foi assinalada.

No exame loco-regional, a localização do tumor primário foi registrada como: língua, assoalho, gengiva superior, palato duro, palato mole, gengiva inferior, mucosa jugal e área retromolar.

A extensão do tumor foi registrada como: ausente, língua, assoalho, gengiva, retromolar, lábio superior, lábio inferior, mucosa jugal, palato, loja amigdaliana e outros.

Quanto às características clínicas, as lesões foram classificadas em úlcero-vegetante, úlcero-infiltrativa e outra. O nível dos linfonodos ipsi e contralaterais comprometidos clinicamente também foi registrado.

As classificações clínicas TN (International Union Against Cancer, 2002), T (T1, T2, T3, T4 e Tx) e N (N0, N1, N2a, N2b, N2c, N3 e Nx) foram registradas.

Quanto ao tratamento, registrou-se a data da cirurgia, realização ou não de esvaziamento cervical (ipsilateral ou ipsi e contralateral simultaneamente), tipo de esvaziamento cervical e realização ou não de radioterapia pós-operatória.

A embolização vascular foi classificada como ausente, linfática, sangüínea, ambas (linfática e sangüínea) ou ignorada. As infiltrações perineural, muscular, óssea e glandular como presente, ausente ou ignorada.

As margens cirúrgicas foram classificadas como livres, presentes, comprometidas ou ignoradas.

Quando do esvaziamento cervical, o número de linfonodos ipsi e contralaterais dissecados e comprometidos foi anotado.

Quanto à evolução dos pacientes, registrou-se a data e localização (local, pescoço ipsilateral, pescoço contralateral, pulmão, ossos, fígado ou outra à distância) da primeira recidiva. Quando presente o segundo tumor primário, sua data e localização foram anotadas.

A data e a situação na última informação objetiva de seguimento (vivo sem evidência de doença, vivo com câncer, morte pós-operatória, morte decorrente do câncer, morte por outras causas não relacionadas ao câncer e perdido de vista) também foram registradas.

O tempo, em meses, decorrido entre a data da cirurgia e a ocorrência da primeira recidiva ou até a última informação de seguimento correspondeu à sobrevida livre de doença (SLD). Da mesma forma, considerou-se como sobrevida global (SG) o tempo, em meses, decorrido entre a cirurgia e o óbito ou a última data de seguimento.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para microcomputador *SPSS for Windows* versão 15.0 (SPSS Inc., E.U.A.).

A associação entre os genótipos 434 do gene *ECP* e a intensidade da eosinofilia tecidual associada aos tumores, bem como as demais variáveis demográficas, clínicas e microscópicas foi avaliada pelo teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, com um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

As análises das sobrevidas global, livre de doença e específica por câncer foram feitas pelo estimador limite de Kaplan-Meier e a comparação das curvas de sobrevida foi realizada utilizando-se o teste log-rank, com nível de significância de 5%.

A frequência observada dos três genótipos possíveis foi determinada pela razão entre o número de indivíduos com um dado genótipo e o número total de indivíduos do grupo (casos ou controles).

Utilizou-se o teorema de Hardy-Weinberg ($p^2 + 2pq + q^2$; onde $q = 1 - p$) para estimar as frequências genotípicas esperadas para uma população em equilíbrio. Neste cálculo, “ p ” representa a frequência do alelo G e “ q ” a frequência do alelo C. A frequência esperada do genótipo GG corresponde a p^2 , do genótipo GC a $2pq$ e do genótipo CC a q^2 .

Para verificar se a população estudada seguia o equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizou-se o teste do qui-quadrado de Pearson na comparação das proporções observadas e esperadas, segundo a fórmula abaixo. O valor crítico do qui-quadrado adotado foi 3,84. Se o valor do qui-quadrado for maior ou igual a 3,84, conclui-se que a população não segue o equilíbrio. Se o valor do qui-quadrado for menor do que 3,84, aceita-se a hipótese de que a população está em equilíbrio.

$$\chi^2 = \sum \frac{(O - E)^2}{E}$$

O = frequência genotípica observada

E = frequência genotípica esperada

4.8 QUESTÕES ÉTICAS

Esse estudo foi submetido à Comissão de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente - Hospital do Câncer A.C. Camargo e aprovado na reunião de 29/08/2006, antes do início dos experimentos (projeto de pesquisa nº. 810/06) (ANEXO A).

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO

A população de estudo foi constituída de 322 pacientes, sendo 157 com carcinoma espinocelular de boca submetidos a tratamento no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo e 165 pacientes pertencentes a um Banco de Controles do Laboratório Neogene do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP), como mostra a Tabela 2.

A análise do polimorfismo 434(G>C) do gene *ECP* foi realizada nos 322 pacientes, visando comparar a distribuição desse polimorfismo na população em geral.

Na ocasião da seleção das lâminas e/ou blocos de parafina dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca, 131 peças cirúrgicas foram resgatadas para as análises morfológicas tumorais e da eosinofilia tecidual associada aos tumores (Tabela 2).

Tabela 2 – Distribuição dos pacientes com carcinoma espinocelular e grupo controle, segundo as análises genética e morfológica.

Populações de estudo	Análise genética		Análise morfológica	
	N	%	N	%
Pacientes com CEC de boca	157	48,76	131	100,0
Pacientes controle	165	51,24	0	0
TOTAL	322	100	131	100

N: número de pacientes; CEC: carcinoma espinocelular

5.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

A análise dos 157 pacientes com carcinoma espinocelular de boca revelou uma forte predominância do gênero masculino, sendo constituída por 124 homens (78,98%) e 33 mulheres (21,02%).

Na ocasião do diagnóstico, a idade mínima dos pacientes foi de 22 anos e a máxima de 87 anos, sendo a média igual a 57,04 anos (desvio padrão = 12,89), como mostra a Tabela 3.

Cento e quarenta e seis pacientes eram da raça branca (93%), três da amarela (1,91%), dois da negra (1,27%) e seis (3,82%) pertenciam a outras raças (Tabela 3).

Com relação ao tempo de história clínica, cento e sete pacientes (68,16%) apresentavam o tumor com duração inferior ou igual a seis meses, 24,20% superior a seis meses e para 7,64%, a informação referente a esse dado era desconhecida.

Quanto à história familiar de câncer, 77 pacientes (49,04%) não apresentavam antecedentes familiares da doença. Para aqueles com história familiar positiva, 10,83% possuíam pais afetados e nove pacientes apresentaram mais de um membro da família com câncer.

O tabagismo (77,71%) e o etilismo (68,16%) foram detectados na maioria dos pacientes estudados. Nessa amostra, trinta e sete (23,57%) eram ex-fumantes e vinte e quatro (15,29%) ex-etilistas. Um total de noventa e sete pacientes (61,78%) eram tabagistas e etilistas simultaneamente, como pode ser observado na Tabela 3.

A eosinofilia sangüínea foi observada em 12,10% da população de estudo, entretanto sua ocorrência não pode ser avaliada em 49 pacientes com carcinoma espinocelular de boca pela inexistência de hemograma pré-operatório nos respectivos prontuários (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição de frequência dos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de boca, segundo as características demográficas e história clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Características	Número de pacientes	%
Gênero		
Masculino	124	78,98
Feminino	33	21,02
Idade		
≤ 57 anos	81	51,59
> 57 anos	76	48,41
Raça		
Branca	146	93,00
Amarela	03	1,91
Negra	02	1,27
Outra	06	3,82
Tabagismo		
Sim	122	77,71
Não	32	20,38
Desconhecido	03	1,91
Etilismo		
Sim	107	68,16
Não	48	30,57
Desconhecido	02	1,27
Tabagismo e etilismo		
Sim	97	61,78
Não	57	36,31
Desconhecido	03	1,91
Eosinofilia sangüínea		
Sim	19	12,10
Não	89	56,69
Desconhecido	49	31,21
TOTAL	157	100

Na amostra estudada, os locais mais frequentemente acometidos pelo carcinoma espinocelular foram, em ordem decrescente: a língua (42,04%), o assoalho bucal (17,83%), a gengiva/rebordo inferior (14,01%), a área retromolar (10,83%), a mucosa jugal (7,01%), o palato mole (5,09%), a gengiva/rebordo superior (2,55%) e o palato duro (0,64%), como descrito na Tabela 4.

Em 24,84% dos pacientes, o tumor apresentava-se restrito ao seu local de origem, enquanto que 29,94% estendiam-se além do local inicial para uma única área anatômica adjacente. Em 71 pacientes (45,22%), o tumor acometeu duas ou mais regiões anatômicas.

Clinicamente, a maioria das lesões (78,98%) eram úlcero-infiltrativas e 10,19% dos tumores úlcero-vegetantes. Para 1,27% a informação referente ao tipo de lesão não pode ser resgatada.

Quanto ao estadiamento clínico T, a maioria dos pacientes apresentou tumores em estágio avançado, sendo classificados como T4. Carcinomas classificados como T2 e T3 apresentaram uma frequência de 27,39% e 26,76%, respectivamente. Uma menor porcentagem dos tumores foi classificada como T1 (Tabela 4).

Na ocasião do diagnóstico, um total de 89 pacientes com câncer de boca (56,70%) não apresentava comprometimento dos linfonodos regionais (N0). Em 42,03% da amostra, os linfonodos da região do pescoço já apresentavam comprometimento tumoral clinicamente (metástase regional), conforme a Tabela 4. Em dois pacientes com carcinoma espinocelular de boca (1,27%), os linfonodos regionais não puderam ser avaliados.

Tabela 4 – Distribuição de frequência dos pacientes portadores de carcinoma espinocelular de boca, segundo o exame loco-regional. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Características	Número de pacientes	%
Localização		
Língua	66	42,04
Assoalho	28	17,83
Gengiva inferior	22	14,01
Área retromolar	17	10,83
Mucosa jugal	11	7,01
Palato mole	08	5,09
Gengiva superior	04	2,55
Palato duro	01	0,64
Estádio T		
T1	16	10,19
T2	43	27,39
T3	42	26,76
T4	54	34,39
Tx	02	1,27
Estádio N		
N0	89	56,70
N1	38	24,20
N2a	06	3,82
N2b	09	5,73
N2c	08	5,10
N3	05	3,18
Nx	02	1,27
TOTAL	157	100

5.3 CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA DO GRUPO CONTROLE

O grupo controle de 165 pacientes utilizado para a análise do polimorfismo 434 (G>C) do gene *ECP* constituiu-se predominantemente por homens (72,12%), da raça branca (55,76%), com idade superior a 51 anos (Tabela 5).

A idade mínima observada foi 19 anos e a máxima 86 anos, sendo a média igual a 50,79 anos (desvio padrão = 17,7).

Tabela 5 – Distribuição de frequência dos pacientes do grupo controle, segundo as características demográficas.

Características	Número de Pacientes	%
Gênero		
Masculino	119	72,12
Feminino	46	27,88
Idade		
≤ 51 anos	76	46,06
> 51 anos	89	53,94
Raça		
Branca	92	55,76
Amarela	01	0,61
Negra	03	1,82
Outra	16	9,69
Desconhecido	53	32,12
TOTAL	165	100

5.4 ANÁLISE DO POLIMORFISMO 434 (G>C) DO GENE *ECP*

A frequência do polimorfismo 434(G>C) entre os pacientes portadores de carcinoma espinocelular de boca e os controles, bem como as frequências dos alelos 434G e 434C podem ser visualizados na Tabela 6.

Dentre os 157 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, 40,76% eram homozigotos para o alelo 434G, 57,97% heterozigotos (434GC) e 1,27% homozigotos para o alelo 434C.

Nos 165 pacientes do grupo controle, 46,67% eram homozigotos para o alelo 434G e 53,3% heterozigotos (434GC). Pacientes homozigotos para o genótipo 434CC não foram constatados.

As frequências genóticas observadas para esse polimorfismo não se apresentaram de acordo com as esperadas pelo Teorema de Hardy-Weinberg, indicando que as amostras analisadas foram retiradas de populações que não se encontravam em equilíbrio (pacientes com câncer: $p=22,11$; controles: $p=21,48$).

As imagens 6A, B e C exemplificam fotos dos géis de agarose correspondentes a genotipagem dos pacientes com CEC de boca e do grupo controle. Os demais géis de agarose podem ser observados no APÊNDICE B.

Tabela 6 – Distribuição de frequência dos genótipos 434 e dos alelos do gene *ECP* entre os pacientes portadores de carcinoma espinocelular de boca e os controles.

	Pacientes com Câncer	Pacientes Controles
Genótipos		
434GG	64 (40,76%)	77 (46,67%)
434GC	91 (57,97%)	88 (53,33%)
434CC	02 (1,27%)	0 (%)
Alelos		
434G	219 (69,75%)	242 (73,33%)
434C	95 (30,25%)	88 (26,67%)

Figura 6 – Fotos de géis de agarose a 2% representativas dos genótipos 434 do gene *ECP*. As imagens (A) e (B) exemplificam genótipos dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca e (C) do grupo controle.

5.5 ANÁLISE MICROSCÓPICA

Para as análises microscópicas referente às características tumorais e à intensidade da eosinofilia tecidual associada aos tumores, vinte e seis carcinomas foram excluídos da amostra pela impossibilidade de obtenção de blocos de parafina e/ou lâminas. As descrições seguintes se referem à análise de 131 peças cirúrgicas de carcinomas espinocelulares de boca.

5.5.1 Análise microscópica qualitativa

A grande maioria dos carcinomas espinocelulares de boca (93,13%) avaliados nesse estudo consistiam em tumores bem a moderadamente diferenciados, ou seja, menos agressivos, conforme a graduação histopatológica de malignidade tumoral baseada nos critérios estabelecidos por BRYNE et al. (1992) (Tabela 7).

O índice de malignidade total variou de 6 a 16 pontos e os tumores foram então classificados como pouco agressivos (escore final ≤ 12 pontos) ou muito agressivos (escore final > 12 pontos).

Tabela 7 – Distribuição de frequência dos carcinomas espinocelulares de boca, segundo a graduação de malignidade tumoral. Hospital do Câncer A.C., São Paulo, 1984 a 2002.

Graduação malignidade	N	%
Pouco agressivo (≤ 12)	122	93,13
Muito agressivo (> 12)	09	6,87
TOTAL	131	100

N: número de tumores

A maior parte dos tumores avaliados apresentava grau moderado de queratinização, escasso pleomorfismo nuclear, poucas figuras de mitose determinadas em 10 campos microscópicos de grande aumento (objetiva de 40x) e moderada resposta do hospedeiro, representada pelo infiltrado inflamatório mononuclear (Figura 7A). O padrão de invasão tumoral mais freqüente foi caracterizado pela presença de cordões grossos de células malignas (Tabela 8 e Figura 7B).

O resultado individual da graduação histopatológica de malignidade com base nos escores atribuídos para os carcinomas espinocelulares de boca pode ser visualizado no APÊNDICE C.

Tabela 8 – Distribuição de freqüência dos carcinomas espinocelulares de boca, segundo o sistema de graduação de malignidade realizado no *front* de invasão tumoral. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Característica	Escores			
Morfológica	1	2	3	4
Grau de queratinização	41 (31,30%)	58 (44,28%)	19 (14,50%)	13 (9,92%)
Pleomorfismo nuclear	61 (46,57%)	55 (41,98%)	14 (10,69%)	01 (0,76%)
Número mitoses	69 (52,67 %)	56 (42,75%)	06 (4,58%)	0 (0%)
Padrão de invasão	17 (12,98%)	79 (60,31%)	34 (25,95%)	01 (0,76%)
Resposta do hospedeiro	56 (42,75%)	62 (47,33%)	13 (9,92%)	0 (0%)

Figura 7 – Carcinoma espinocelular com intensa queratinização e intenso infiltrado inflamatório mononuclear (A). Em B, nota-se padrão de invasão tumoral caracterizado por cordões grossos de células malignas (H&E).

5.5.2 Análise microscópica quantitativa

A avaliação das vinte e cinco imagens microscópicas obtidas da porção tumoral mais profunda capturadas para cada um dos 131 carcinomas espinocelulares de boca revelou uma média de 57,10 eosinófilos/mm² (desvio padrão = 57,43 eosinófilos/mm²), sendo o valor mínimo de zero e o máximo de 282 eosinófilos por milímetro quadrado.

A classificação da eosinofilia tecidual associada aos tumores de acordo com sua intensidade em ausente/discreta, moderada e intensa foi feita baseando-se nos tercís do número de eosinófilos por milímetro quadrado obtidos nos 131 espécimes estudados, resultando em três grupos distintos descritos na Tabela 9.

A eosinofilia tecidual discreta ou intensa associada aos carcinomas espinocelulares de boca pode ser visualizada nas Figuras 8A e B.

O resultado individual da contagem de eosinófilos na porção tumoral mais profunda para cada um 131 carcinomas espinocelulares de boca pode ser observado no APÊNDICE D.

Tabela 9 – Distribuição de frequência dos carcinomas espinocelulares de boca, segundo a intensidade da eosinofilia tecidual. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Eosinofilia tecidual	N	%
Ausente/Discreta (0 a 21 eosinófilos/mm ²)	43	32,82
Moderada (22 a 68 eosinófilos/mm ²)	44	33,59
Intensa (69 a 282 eosinófilos/mm ²)	44	33,59
TOTAL	131	100

N: número de tumores

Figura 8 – Diferentes intensidades da eosinofilia tecidual associada aos carcinomas espinocelulares de boca. Em (A), nota-se eosinofilia intensa e em (B) eosinofilia discreta (H&E).

5.6 CORRELAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS 434 DO GENE *ECP* E A INTENSIDADE DA EOSINOFILIA TECIDUAL ASSOCIADA AOS TUMORES

Notou-se uma distribuição semelhante dos genótipos 434 do gene *ECP* nos pacientes com carcinomas espinocelulares de boca com diferentes intensidades de eosinofilia tecidual.

A maioria dos pacientes que possuía o genótipo 434GG (35,7%) apresentou tumores com intensa eosinofilia tecidual. Dentre os 75 pacientes portadores dos genótipos 434GC/CC, 34,7% apresentaram eosinofilia tecidual ausente/discreta, como mostra a Tabela 10.

Tabela 10 – Correlação entre os genótipos 434 do gene *ECP* e a intensidade da eosinofilia tecidual associada aos tumores nos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Eosinofilia tecidual	Genótipo 434GG		Genótipos 434GC/CC		<i>p</i> *
	N	%	N	%	
Ausente/Discreta	17	30,4	26	34,7	0,854
Moderada	19	33,9	25	33,3	
Intensa	20	35,7	24	32,0	
TOTAL	56	100,0	75	100,0	

N: número de pacientes

p*: valor obtido pelo teste do qui-quadrado considerando-se nível de significância de 5%

Na análise do subgrupo dos 44 pacientes com CEC de boca e eosinofilia tecidual intensa, em relação aos diferentes genótipos do gene *ECP*, algumas variáveis relativas ao tratamento e evolução dos indivíduos mereceram destaque e foram incluídas na Tabela 11.

Houve uma tendência de os pacientes com CEC de boca e genótipos 434GC/CC apresentarem uma maior porcentagem de esvaziamento cervical bilateral (45,8%), maior ocorrência de recidiva local (29,2%), embolização vascular (37,5%), comprometimento das margens cirúrgicas (16,7%) e realização de radioterapia pós-operatória (79,2%), quando comparados aos portadores de CEC de boca e genótipo 434GG.

Tabela 11 – Correlação entre os genótipos 434 do gene *ECP* e o tratamento, evolução e as variáveis microscópicas de infiltração neoplásica no subgrupo de pacientes com CEC de boca e eosinofilia tecidual intensa. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Variável	Genótipo 434GG		Genótipos 434GC/CC		p*
	N	%	N	%	
Esvaziamento					
Não esvaziado	02	10,0	01	4,2	0,484
Ipsilateral	12	60,0	12	50,0	
Ipsi e contralateral	06	30,0	11	45,8	
Radioterapia					
Sim	15	75,0	19	79,2	0,743
Não	05	25,0	05	20,8	
Recidiva local					
Sim	04	20,0	07	29,2	0,484
Não	16	80,0	17	70,8	
Embolização vascular[#]					
Ausente	15	78,9	15	62,5	0,244
Presente	04	21,1	09	37,5	
Margens cirúrgicas					
Livres	20	100,0	20	83,3	0,056
Comprometidas	0	0	04	16,7	
TOTAL	20	100,0	24	100,0	

N: número de pacientes

p*: valor obtido pelo teste do qui-quadrado considerando-se nível de significância de 5%

#: excluídos os pacientes com informações ignoradas

5.7 CORRELAÇÃO ENTRE OS GENÓTIPOS 434 DO GENE *ECP* E AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E MICROSCÓPICAS

Nenhuma diferença estatística significativa foi obtida entre os genótipos 434 do gene *ECP* e as características demográficas (gênero, idade e raça) e história clínica (tabagismo, etilismo e eosinofilia sangüínea), como mostra a Tabela 12.

A associação entre os genótipos e as características clínicas dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca pode ser visualizada na Tabela 13.

Independente do genótipo, a língua constituiu a localização tumoral mais freqüente, embora uma correlação estatística significativa não tenha sido obtida entre a localização anatômica do tumor e os diferentes genótipos.

Na ocasião do diagnóstico, a maioria dos pacientes apresentava estadiamento clínico avançado (III ou IV), como pode ser observado na Tabela 13. Ao comparar os dois grupos, notou-se que 43 (69,4%) dos indivíduos com o genótipo 434GG e 70 (76,1%) com os genótipos 434 GC/CC apresentavam estádios clínicos III ou IV.

Quanto ao estadiamento clínico T, no grupo 434GG, observaram-se freqüências (31,7%) idênticas de tumores classificados como T2 e T4. Dentre os pacientes que apresentavam os genótipos 434GC/CC, verificou-se que a maioria (36,9%) apresentou tumores T4 (Tabela 13).

Verificou-se que 36,5% dos pacientes com o genótipo 434GG apresentavam linfonodos palpáveis no momento do diagnóstico. No grupo 434GC/CC, 43 (46,7%) indivíduos apresentavam comprometimento dos linfonodos regionais (Tabela 13).

Tabela 12 – Correlação entre os genótipos 434 do gene *ECP*, as características demográficas e história clínica dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Variável	Genótipo 434GG		Genótipos 434 GC/CC		<i>p</i> *
	N	%	N	%	
Gênero					
Masculino	49	76,6	75	80,6	0,537
Feminino	15	23,4	18	19,4	
Idade					
≤ 57 anos	33	51,6	48	51,6	0,995
> 57 anos	31	48,4	45	48,4	
Raça					
Branca	59	92,2	87	93,5	0,949
Amarela	01	1,6	02	2,2	
Negra	01	1,6	01	1,1	
Outra	03	4,6	03	3,2	
Tabagismo[#]					
Sim	49	77,8	73	80,2	0,713
Não	14	22,2	18	19,8	
Etilismo[#]					
Sim	40	63,5	67	72,8	0,217
Não	23	36,5	25	27,2	
Eosinofilia sangüínea[#]					
Sim	07	15,2	12	19,4	0,577
Não	39	84,8	50	80,6	
TOTAL	64	100,0	93	100,0	

N: número de pacientes

p*: valor obtido pelo teste do qui-quadrado considerando-se nível de significância de 5%

#: excluídos os pacientes com informações ignoradas

Tabela 13 – Correlação entre os genótipos 434 do gene *ECP* e as características clínicas dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Variável	Genótipo 434GG		Genótipos 434 GC/CC		p*
	N	%	N	%	
Localização					
Língua	28	43,7	38	40,9	0,546
Assoalho	09	14,1	19	20,4	
Gengiva superior	02	3,1	02	2,1	
Palato duro	0	0	01	1,1	
Palato mole	03	4,7	05	5,4	
Gengiva inferior	11	17,2	11	11,8	
Mucosa jugal	02	3,1	09	9,7	
Área retromolar	09	14,1	08	8,6	
Estádio clínico [#]					
I	04	6,4	09	9,8	0,320
II	15	24,2	13	14,1	
III	22	35,5	30	32,6	
IV	21	33,9	40	43,5	
Estádio T [#]					
T1	06	9,6	10	10,9	0,808
T2	20	31,7	23	25,0	
T3	17	27,0	25	27,2	
T4	20	31,7	34	36,9	
Estádio N [#]					
N0	40	63,5	49	53,3	0,206
N+	23	36,5	43	46,7	
TOTAL	64	100,0	93	100,0	

N: número de pacientes

p*: valor obtido pelo teste do qui-quadrado considerando-se nível de significância de 5%

#: excluídos os pacientes com informações ignoradas

De acordo com os critérios de inclusão estabelecidos para esse estudo, todos os pacientes foram submetidos à cirurgia como tratamento inicial, sendo que em 10,19% dos pacientes não foi realizado esvaziamento cervical, em 51,59 % realizou-se esvaziamento cervical ipsilateral e em 38,22% desses realizou-se esvaziamento ipsi e contralateral simultaneamente como parte do tratamento cirúrgico. Na comparação entre os grupos, o esvaziamento cervical foi realizado em 93,8% dos indivíduos com o genótipo 434GG e em 87,1% dos pacientes 434GC/CC (Tabela 14).

A radioterapia pós-operatória, como complementação do tratamento, foi realizada em 68,15% dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Notou-se uma distribuição semelhante entre o número de pacientes que receberam radioterapia pós-operatória, independentemente do genótipo (Tabela 14).

A ocorrência de recidiva local foi observada em 22,29% dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. A maior frequência dessa recidiva (22,6%) ocorreu nos pacientes com os genótipos 434GC/CC, como mostra a Tabela 14.

A recidiva regional foi detectada em 14,1% dos pacientes com o genótipo 434GG e em 17,2% dos portadores dos genótipos 434GC/CC (Tabela 14).

As metástases à distância ocorreram 17,83% dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca, sendo o pulmão o local mais acometido. A maior frequência (20,3%) desse evento ocorreu nos indivíduos com o genótipo 434GG (Tabela 14).

Constatou-se o desenvolvimento de um segundo tumor primário em 16,56% dos pacientes, sendo as frequências observadas entre os diferentes genótipos muito semelhantes, como demonstra a Tabela 14.

Tabela 14 – Correlação entre os genótipos 434 do gene *ECP*, tratamento e evolução dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Variável	Genótipo 434GG		Genótipos 434 GC/CC		p*
	N	%	N	%	
Esvaziamento					
Não esvaziado	04	6,2	12	12,9	0,347
Ipsilateral	36	56,3	45	48,4	
Ipsi e contralateral	24	37,5	36	38,7	
Radioterapia					
Sim	44	68,8	63	67,7	0,894
Não	20	31,2	30	32,3	
Recidiva Local					
Sim	14	21,9	21	22,6	0,917
Não	50	78,1	72	77,4	
Recidiva regional					
Sim	09	14,1	16	17,2	0,597
Não	55	85,9	77	82,8	
Metástase distância					
Sim	13	20,3	15	16,1	0,501
Não	51	79,7	78	83,9	
Segundo tumor					
Sim	11	17,2	15	16,1	0,861
Não	53	82,8	78	83,9	
TOTAL	64	100,0	93	100,0	

N: número de pacientes

p*: valor obtido pelo teste do qui-quadrado considerando-se nível de significância de 5%

As correlações entre os genótipos 434 do gene *ECP* e as variáveis microscópicas de infiltração neoplásica podem ser visualizada na Tabela 15.

Mesmo sem uma associação estatística significativa e excluindo os pacientes com informações ignoradas, notou-se uma maior frequência de embolização angio-linfática (29,0%) e infiltrações perineural (57,4%), muscular (100,0%), óssea (37,5%) e glandular (37,5%) nos pacientes com o genótipo 434GG (Tabela 15). As imagens 9A e B exemplificam tumores que apresentaram infiltrações muscular e perineural.

Verificou-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,01$) entre os genótipos, quanto às margens cirúrgicas. Em 100% dos carcinomas espinocelulares dos pacientes com o genótipo 434GG, as margens apresentaram-se livres de comprometimento neoplásico, enquanto que 9,9% dos pacientes com o genótipo 434GC/CC apresentaram margens comprometidas (Tabela 15).

Dentre os 141 pacientes submetidos ao esvaziamento cervical, 53,19% apresentaram metástase em linfonodos regionais, confirmada microscopicamente (pN+). As frequências de comprometimento linfonodal microscópico foram semelhantes entre os portadores do genótipo 434GG (53,3%) e os que possuíam os genótipos 434GC/CC (53,1%).

Tabela 15 – Correlação entre os genótipos 434 do gene *ECP* e a infiltração tumoral nos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Variável	Genótipo 434GG		Genótipos 434 GC/CC		<i>p</i> *
	N	%	N	%	
Embolização vascular[#]					
Ausente	44	71,0	64	73,6	0,727
Presente	18	29,0	23	26,4	
Infiltração perineural[#]					
Ausente	26	42,6	44	50,6	0,340
Presente	35	57,4	43	49,4	
Infiltração muscular[#]					
Ausente	0	0	01	2,6	0,385
Presente	29	100,0	38	97,4	
Infiltração óssea[#]					
Ausente	15	62,5	24	68,6	0,628
Presente	09	37,5	11	31,4	
Infiltração glandular[#]					
Ausente	20	62,5	25	64,1	0,889
Presente	12	37,5	14	35,9	
Margens cirúrgicas					
Livres	64	100,0	82	90,1	0,010
Comprometidas	0	0	09	9,9	
Comprometimento linfonodal^{##}					
pN0	28	46,7	38	46,9	0,977
pN+	32	53,3	43	53,1	
TOTAL	64	100,0	93	100,0	

N: número de pacientes

p*: valor obtido pelo teste do qui-quadrado considerando-se nível de significância de 5%

#: excluídos os pacientes com informações ignoradas

##: excluídos os pacientes não submetidos ao esvaziamento cervical

Figura 9 – Infiltrações perineural (A) e muscular (B) do carcinoma espinocelular de boca (H&E).

5.8 CORRELAÇÃO ENTRE A INTENSIDADE DA EOSINOFILIA TECIDUAL ASSOCIADA AOS TUMORES E AS VARIÁVEIS CLÍNICAS E MICROSCÓPICAS

A intensidade da eosinofilia tecidual associada aos carcinomas espinocelulares de boca não mostrou correlação com as principais variáveis demográficas e clínicas (APÊNDICES E e F), bem como com o tratamento e a evolução dos pacientes (APÊNDICE G) e as variáveis microscópicas de infiltração neoplásica, incluindo embolização vascular e infiltrações perineural, muscular, óssea e glandular (APÊNDICE H). Nessa população de estudo, a eosinofilia tecidual associada aos tumores (TATE) não se mostrou fator de prognóstico significativo (APÊNDICES I, J e K).

5.9 ANÁLISE DE SOBREVIDA

O período de seguimento clínico dos 131 pacientes com carcinoma espinocelular de boca variou de 0,07 a 273,88 meses (média 54,9; desvio padrão 46,5). Ao final do período de seguimento, a maioria dos pacientes (49,62%) veio a óbito em decorrência do tumor primário, 31,30% estavam vivos e sem evidências de recidiva da doença, 11,45% morreram por outras causas não relacionadas ao câncer, 3,05% tiveram morte pós-operatória e 1,53% estavam vivos com a doença. Quatro pacientes (3,05%) foram considerados perdidos de vista.

Em relação aos genótipos 434 do gene *ECP*, as probabilidades das sobrevidas global, específica por câncer e livre de doença, acumuladas em cinco e dez anos, foram calculadas pelo estimador limite de Kaplan-Meier.

A comparação entre as curvas das sobrevidas global, livre de doença e específica por câncer, realizada através do teste de log-rank, não apresentou diferença estatisticamente significativa entre aos genótipos 434 do gene *ECP*. As Tabelas 16, 17 e 18, bem como as Figuras 10, 11 e 12, apresentam, respectivamente, as probabilidades das sobrevidas global, livre de doença e específica por câncer acumuladas em cinco e dez anos.

Tabela 16 – Distribuição dos genótipos 434 do gene *ECP*, de acordo com a sobrevida global para cinco e dez anos. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Variável	Sobrevida global		<i>p</i>
	5 anos (%)	10 anos (%)	
434GG	49,3	31,6	0,763
434GC/CC	48,3	22,1	

p: nível descritivo do teste log-rank

Figura 10 – Sobrevida global dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca, de acordo com os genótipos 434 do gene *ECP*. Porcentagem de sobrevida acumulada de acordo com a técnica de Kaplan-Meier.

Tabela 17 – Distribuição dos genótipos 434 do gene *ECP*, de acordo com a sobrevida livre de doença para cinco e dez anos. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Variável	Sobrevida livre de doença		<i>p</i>
	5 anos (%)	10 anos (%)	
434GG	51,4	43,4	0,733
434GC/CC	52,8	44,9	

p: nível descritivo do teste log-rank

Figura 11 – Sobrevida livre de doença dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca, de acordo com os genótipos 434 do gene *ECP*. Porcentagem de sobrevida acumulada de acordo com a técnica de Kaplan-Meier.

Tabela 18 – Distribuição dos genótipos 434 do gene *ECP*, conforme a sobrevida específica por câncer para cinco e dez anos. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Variável	Sobrevida específica por câncer		<i>p</i>
	5 anos (%)	10 anos (%)	
434GG	50,2	36,9	0,607
434GC/CC	52,2	52,2

Figura 12 – Sobrevida específica dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca, de acordo com os genótipos 434 do gene *ECP*. Porcentagem de sobrevida acumulada de acordo com a técnica de Kaplan-Meier.

6 DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A proteína catiônica eosinofílica (ECP) representa uma das principais proteínas secretadas pelos eosinófilos ativados. Atualmente, a mensuração de seus níveis em diversos fluidos corporais, especialmente no soro, tem sido utilizada como marcador clínico de alta sensibilidade da atividade e do “turnover” dessas células, mostrando uma forte correlação com a destruição tecidual (NAVARRO et al., 2008; KOH et al., 2006; CARRERAS et al., 2005; SCHMEKEL et al., 2001; VENGE et al., 1999; VENGE et al., 1998).

Particularmente na asma, patologia em que a ECP tem sido amplamente estudada, sua atividade na estimulação e produção de muco pelas vias áreas, assim como a liberação de histamina pelos basófilos e mastócitos, reforçam as afirmativas de que os níveis dessa proteína refletem a intensidade da inflamação das vias aéreas e apresentam associação com o desenvolvimento de sintomas alérgicos (ROSENBERG, PHIPPS e FOSTER, 2007; KOH et al., 2006; VENGE et al., 1999).

Dentre as diversas propriedades biológicas da ECP, destaca-se a sua atividade citotóxica contra bactérias, parasitas, vírus, células epiteliais respiratórias, bem como células tumorais (KOH et al., 2006; PRUSSIN e METCALFE, 2006; ROTHENBERG e HOGAN, 2006; CARRERAS et al., 2005; VENGE et al., 1999; VENGE et al., 1998; GLEICH, ADOLPHSON e LEIFERMAN, 1993).

Uma pesquisa recente (TRULSON et al., 2007) demonstrou que a ECP apresenta diversas formas moleculares e que suas atividades biológicas, incluindo a citotoxicidade, podem ser alteradas. Parte dessa heterogeneidade funcional deve-se a diferenças na glicosilação da molécula, já que a mesma apresenta três locais potenciais para esse evento na sua seqüência de aminoácidos (TRULSON et al., 2007; ERIKSSON et al., 2007b; KOH et al., 2006; VENGE et al., 1999; VENGE et al., 1998). Além dessas modificações pós-traducionais, a presença de polimorfismos genéticos pode alterar o nível de produção ou a função da proteína, contribuindo naturalmente para a patogênese ou progressão de uma doença (MOLIN, 2004).

Dentre os diversos polimorfismos detectados no gene *ECP*, alguns estudos (MUNTHE-KAAS et al., 2007; ERIKSSON et al., 2007a; JONSSON et al., 2006; MOLIN, 2004; NOGUCHI et al., 2003; JONSSON et al., 2002) demonstraram a associação do polimorfismo 434(G>C) com diferentes patologias: infecção por *S. mansoni* e frequência de fibrose periportal (ERIKSSON et al., 2007a), desenvolvimento de sintomas alérgicos na asma

(MUNTHE-KAAS et al., 2007; JONSSON et al., 2006; JONSSON et al., 2002) e o prognóstico desfavorável em pacientes com Linfoma de Hodgkin (MOLIN, 2004).

Baseando-se nas premissas da possível atividade antitumoral dos eosinófilos, por meio das proteínas citotóxicas presentes em seus grânulos, especialmente a ECP, (NAVARRO et al., 2008; TRULSON et al., 2007) e da contribuição da TATE intensa para o prognóstico favorável dos pacientes com carcinoma espinocelular (CEC) de boca (DORTA et al., 2002), idealizou-se o presente trabalho. O principal questionamento foi verificar se os pacientes que possuíam tumores com TATE intensa apresentavam um genótipo 434 do gene *ECP* específico e se a presença do polimorfismo em questão poderia influenciar a evolução clínica e o prognóstico dos pacientes com CEC de boca.

Para análise do polimorfismo 434(G>C) do gene *ECP*, nossa casuística foi composta de 322 pacientes (Tabela 2), sendo 157 portadores de CEC de boca submetidos a tratamento no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital do Câncer A.C. Camargo, no período de 1984 a 2002. Um total de 165 indivíduos sem história ou suspeita dessa neoplasia maligna, pertencentes ao Banco de Controles do Laboratório Neogene do Departamento de Urologia da Faculdade de Medicina de Botucatu (FMB-UNESP), foi utilizado com o objetivo de comparar a distribuição desse polimorfismo na população em geral.

O grupo controle foi constituído predominantemente por homens (72,12%), da raça branca (55,76%) e com idade superior a 51 anos (Tabela 5). Na comparação das frequências genotípicas entre os pacientes com CEC de boca e o grupo controle, optou-se pela ausência de pareamento por sexo e idade, já que as variáveis em questão constituem fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de boca, porém não exerceriam influência sobre os genótipos dos indivíduos.

A análise das características morfológicas tumorais e quantificação do número de eosinófilos presentes na região do “front” de invasão foram realizadas em 131 peças cirúrgicas; entretanto, 26 espécimes foram excluídos da amostra pela impossibilidade de obtenção de lâminas contendo fragmentos representativos da neoplasia e/ou blocos de parafina.

Os dados referentes à análise das características clínicas dos pacientes com CEC de boca revelaram uma predominância de indivíduos brancos (93%), do gênero masculino (78,98%) e com idade média de 57,04 anos (Tabela 3). O perfil clínico observado nesse trabalho encontra-se em concordância com aquele descrito em estudos anteriores

(BINAHMED, NASON e ABDOH, 2007; LORENA et al., 2003a; LORENA et al., 2003b; DORTA et al., 2002).

O tabagismo e o etilismo foram freqüentes em nossa casuística, sendo detectados em 77,71% e 68,16% dos pacientes, respectivamente, de cujo total 61,78% eram tabagistas e etilistas simultaneamente (Tabela 3). Nossos dados reforçam as constatações de que o consumo de tabaco constitui o fator de risco mais importante para o CEC de boca e que o álcool parece agir sinergicamente com o fumo, potencializando sua ação (WOOLGAR, 2006; PARISE JR, 2000).

A eosinofilia sangüínea foi observada em 12,1% dos pacientes com CEC de boca (Tabela 3). Nossos resultados estão dentro dos valores descritos na literatura, sendo que alguns autores (HORIE et al., 2007) relatam a presença da eosinofilia sangüínea em 5% a 33% dos pacientes com CEC de boca. Apesar de outros trabalhos detectarem a presença desse fenômeno em 34,4% (DORTA et al., 2002) e 33,3% (LORENA et al., 2003a; LORENA et al., 2003b) de suas amostras, nossas taxas podem ter sido menores pelo fato de que 49 pacientes não puderam ser avaliados, devido à inexistência de hemograma pré-operatório em seus respectivos prontuários.

A língua constituiu o local mais acometido pelo CEC (42,04%) (Tabela 4), sendo que as lesões úlcero-infiltrativas representaram a forma mais comum de apresentação (78,98%) do tumor. Esses dados são similares aos descritos por outros autores (BINAHMED, NASON e ABDOH, 2007; LORENA et al., 2003a; LORENA et al., 2003b; DORTA et al., 2002; PARISE JR, 2000).

Verificou-se que a maioria dos pacientes (34,39%) apresentou tumores classificados como T4 (Tabela 4). Quanto ao estadiamento clínico T, nosso resultado não pode ser comparado aos de DORTA et al. (2000) e LORENA et al. (2003a, 2003b), já que somente tumores classificados como T1, T2 e T3 foram incluídos nesses estudos.

Na ocasião do diagnóstico, 56,70% dos pacientes com CEC de boca foram estadiados como N0 e 42,03% apresentaram linfonodos da região do pescoço com comprometimento tumoral (Tabela 4). Uma pesquisa recente (BINAHMED, NASON e ABDOH, 2007) realizada com 425 pacientes portadores de CEC de boca, detectou a presença linfonodos positivos em 26% da sua amostra. A alta porcentagem de comprometimento linfonodal observada em nossa casuística pode ser explicada pelo grande número de tumores classificados como T3 e T4, pois o tamanho do tumor apresenta estreita associação com aumento do risco de recorrência local e metástases linfonodais, além de contribuir para menores taxas de sobrevida (WOOLGAR, 2006).

Em relação aos genótipos 434 do gene *ECP*, notou-se uma predominância de heterozigotos (434GC) nos pacientes com CEC de boca (57,97%) e no grupo controle (53,33%), como mostra a Tabela 6. Nossos resultados contrastam com os de outros autores (JONSSON et al. 2006; MOLIN et al., 2004; JONSSON et al. 2002), os quais encontraram uma maior frequência de homozigotos para o alelo 434G em populações escandinavas. Contudo, experimentos realizados em populações provenientes da Uganda e do Sudão, compostas por diferentes tribos, também detectaram um predomínio de heterozigotos para esse polimorfismo (ERIKSSON et al., 2007a). A diversidade étnica e a intensa miscigenação observada nas populações brasileira e africana poderiam justificar as discrepâncias apresentadas entre os diferentes estudos, no que diz respeito às frequências genótípicas.

Em nossa casuística, notou-se um desvio das frequências genótípicas esperadas pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg. Deve-se considerar que esse teorema constitui um modelo teórico, no qual as frequências gênicas e genótípicas tendem a permanecer constantes nas populações com uniões ao acaso e na ausência de fatores evolutivos como mutação, seleção, fluxo gênico de migrantes e deriva genética (BEIGUELMAN, 1977; FREIRE-MAIA, 1974). Evidentemente, as condições citadas não são satisfeitas completamente por qualquer população real (BEIGUELMAN, 1977). Se considerarmos que grupos étnicos e populações separadas geograficamente diferem umas das outras em frequências gênicas e que existem altas taxas de endogamia entre grupos étnicos locais, então a reprodução não é aleatória e as premissas necessárias para o equilíbrio de Hardy-Weinberg deixam de ser satisfeitas (GRIFFITHS et al. 2006), como foi observado em nossa casuística.

Quanto à graduação histopatológica de malignidade, a maior parte dos tumores avaliados apresentou grau moderado de queratinização, escasso pleomorfismo nuclear, poucas figuras de mitose e padrão de invasão caracterizado por cordões grossos de células malignas (Tabela 8, Figuras 7A e B). Na grande maioria dos espécimes cirúrgicos, notou-se a presença de um infiltrado inflamatório mononuclear que variou de moderado a intenso, muitas vezes associado à TATE, refletindo a resposta do hospedeiro frente às células neoplásicas. Outros autores (LORENA et al., 2003a; DORTA et al. 2000) também verificaram uma associação entre a eosinofilia tecidual e o infiltrado inflamatório mononuclear, caracterizado predominantemente por linfócitos e plasmócitos.

Os mecanismos responsáveis pelo recrutamento e acúmulo dos eosinófilos nas neoplasias malignas não estão totalmente estabelecidos (MINGOMATAJ, 2008; LORENA et al., 2003a; SAMOSZUK, 1997). Entretanto, componentes das respostas imunes inata e adaptativa parecem estar envolvidos nesse processo (ELLYARD, SIMSON e PARISH, 2007;

SIMSON et al., 2007; MITCHELL et al., 2006; ABBAS e LICHTMAN, 2005). Há hipóteses que sugerem que os linfócitos TCD4⁺ e “natural killer” (NK) são capazes de secretar citocinas características da resposta Th2, como a IL-4 e IL-5, as quais apresentam um potente efeito quimiotático para os eosinófilos (ELLYARD, SIMSON e PARISH, 2007; SIMSON et al., 2007; COSTELLO, O’CALLAGHAN e SEBAHOUN, 2005; LORENA et al., 2003a). Além disso, a ação coordenada da eotaxina, expressa pelas células Th2, células epiteliais malignas e pelos próprios eosinófilos, parece ser fundamental para a permanência desses granulócitos nos tumores malignos (ELLYARD, SIMSON e PARISH, 2007, LORENA et al., 2003a). Alguns autores (CORMIER et al., 2006) especulam que metabólitos do ácido araquidônico, 5-oxo-eicosanóides ou mediadores lipídicos, como fator ativador plaquetário (PAF), podem representar outros agentes potenciais para esse evento.

Experimentos recentes realizados em modelo animal, empregando-se injeção subcutânea de linhagens celulares de melanoma (CORMIER et al., 2006), demonstraram que o recrutamento dos eosinófilos para os tumores constitui uma resposta inflamatória inicial e persistente do hospedeiro, independente da resposta Th2. Dentre os oito CECs de boca classificados como T1 que compuseram nossa amostra, apenas um deles apresentou TATE intensa, contrariando a afirmativa anterior de que o acúmulo de eosinófilos representa uma resposta inicial do hospedeiro frente ao tumor.

Nas regiões necróticas do tumor, os mesmos autores (CORMIER et al., 2006) observaram uma grande concentração de eosinófilos, bem como a presença de uma marcação difusa da matriz extracelular pelo anticorpo anti-MBP, indicativa de degranulação dessas células. Baseados nessas evidências, os autores sugeriram que áreas de necrose liberam fatores quimiotáticos para os eosinófilos. Em nossa casuística, a despeito da exclusão, da análise microscópica, de tumores com extensas áreas de necrose, um grande número de eosinófilos foi observado no “front” de invasão (Figura 8A), em íntima relação com as células epiteliais malignas, demonstrando que as áreas de necrose não constituíram a fonte primária de fatores quimiotáticos para esses granulócitos, nos CECs de boca avaliados.

Em relação à participação dos eosinófilos nas neoplasias malignas, duas vertentes de pensamento podem ser encontradas na literatura: uma defende a hipótese de que o eosinófilo exerça uma função antitumoral e a outra sugere que essas células façam parte de uma resposta do tecido conjuntivo do hospedeiro frente à destruição tecidual causada pelo desenvolvimento do tumor (MINGOMATAJ, 2008; LOTFI, LEE e LOTZE, 2007; CORMIER et al., 2006; SAMOSZUK, 1997).

A função protetora dos eosinófilos contra a progressão do tumor se correlaciona principalmente com a síntese e secreção das proteínas citotóxicas estocadas em seus grânulos específicos, como a ECP, MBP, EDN e EPO (SIMSON et al., 2007; LORENA et al., 2003a; VENGE et al., 1999; SAMOSZUK, 1997; TRULSON, NILSSON e VENGE, 1997; LEIGHTON et al., 1996). Em pacientes com adenocarcinoma renal, notou-se um aumento dos níveis séricos das proteínas ECP, EPO e EDN antes e durante o tratamento com IL-2 e IFN- α , sugerindo que a secreção dessas proteínas pode ser desencadeada via TNF- α e pela interação direta do eosinófilo com as células malignas por meio de mecanismo anticorpo-dependente (TRULSON, NILSSON e VENGE, 1997). Além disso, o microambiente tumoral parece influenciar a atuação dos eosinófilos, produzindo sinais para sua degranulação e conseqüente destruição das células malignas (MUNITZ e LEVI-SCHAFFER, 2004).

A participação dos eosinófilos nos processos de deposição e remodelação do tecido conjuntivo em diversas condições fisiológicas e patológicas fundamenta a teoria da possível função “reparadora” dessa célula (MUNITZ e LEVI-SCHAFFER, 2004). Estudos *in vitro* (LEVI-SCHAFFER et al., 1999) demonstraram que eosinófilos humanos afetam diretamente a proliferação dos fibroblastos dérmicos e pulmonares, assim como a síntese de colágeno e a contração das fibras colágenas, por meio da liberação de TGF- β . Contudo, os dois tipos de fibroblastos avaliados apresentaram respostas diferentes, sendo que houve um aumento da síntese de colágeno pelo tipo celular dérmico e um decréscimo pelo pulmonar. Esses resultados indicam a heterogeneidade dos diversos tipos de fibroblastos, bem como a variação da função dos eosinófilos no desenvolvimento dos processos de fibrose em diferentes tecidos e localizações anatômicas.

As proteínas eosinofílicas, como a ECP e MBP, parecem influenciar o comportamento dos fibroblastos, já que experimentos *in vitro* (HERNNAS et al., 1992) observaram que a ECP foi capaz de inibir a degradação de proteoglicanas e aumentar o acúmulo intracelular de glicosaminoglicanas, e a MBP interagiu sinergicamente com a IL-1 e TGF- β para aumentar a produção de IL-6 pelos fibroblastos. Além disso, outras citocinas e fatores de crescimento produzidos pelos eosinófilos, como GM-CSF, TNF- α , FGF-2, NGF, VEGF, IL-4, IL-6 e IL-13, apresentam efeito pró-fibrogênico (ELLYARD, SIMSON e PARISH, 2007; MUNITZ e LEVI-SCHAFFER, 2004).

Em adição, os eosinófilos parecem contribuir para a angiogênese, já que sintetizam e liberam muitos fatores pró-angiogênicos, como IL-8, IL-6, TGF- β , GM-CSF e leucotrienos vasoativos (LTC₄ e LTD₄) (MINGOMATAJ, 2008; HOGAN, 2007; MUNITZ e LEVI-

SCHAFFER, 2004), além de apresentarem imunopositividade para o b-FGF e VEGF, substâncias indutoras do crescimento, proliferação e diferenciação de células endoteliais.

Além das evidências anteriores, experimentos *in vitro* demonstraram a capacidade da ECP em degradar proteínas miofibrilares e do citoesqueleto associadas à membrana, indicando que os eosinófilos podem contribuir para a degradação de células musculares em lesão tecidual causada, por exemplo, pela invasão tumoral (SUGIHARA et al., 2001). Em nossa amostra, a associação dos eosinófilos com as fibras musculares esqueléticas foi uma observação microscópica freqüente nos CECs de boca avaliados, o que parece reforçar a participação dessas células na degradação muscular causada pela invasão neoplásica, provavelmente por meio da liberação da ECP. Entretanto, outras investigações da interação da ECP com as fibras musculares esqueléticas, *in vivo*, são necessárias para confirmar essas afirmativas.

A correlação de fatores prognósticos com a eosinofilia tecidual nos pacientes com neoplasias malignas permanece controversa e até o presente momento, uma perspectiva definitiva ainda não foi atingida (LOTFI, LEE e LOTZE, 2007; LEE e LEE, 2006). Especificamente para os pacientes com CEC de boca, alguns estudos (DORTA et al., 2002; GOLDSMITH et al., 1992; GOLDSMITH et al., 1987) têm demonstrado uma correlação da TATE com prognóstico favorável, enquanto outros (WONG et al., 1999; HORIUCHI et al., 1993) a relacionam com um prognóstico desfavorável.

As discrepâncias encontradas entre os diferentes estudos, em relação à associação da TATE com o prognóstico dos pacientes, podem ser atribuídas a diversos fatores, tais como critérios adotados para diagnóstico e mensuração, inclusão de espécimes obtidos de várias localizações anatômicas da região de cabeça e pescoço, tempo de preservação insuficiente, utilização de biópsias para efetuar a contagem do número de eosinófilos, além de casuísticas com baixa relevância estatística (HOGAN et al., 2007; LOTFI, LEE e LOTZE, 2007; ALKHABULI e HIGH, 2006; CORMIER et al., 2006; ERCAN et al., 2005; DORTA et al., 2002; LEIGHTON et al., 1996).

No presente trabalho, o número de eosinófilos por superfície de área tumoral nos CECs de boca foi determinado com base na metodologia previamente estabelecida por DORTA et al. (2002) e LORENA et al. (2003b). Em relação à mensuração da TATE, estudo recente (ALKHABULI e HIGH, 2006) comparando os resultados obtidos pelos métodos clássico e da densidade de células, sugeriu que essa última metodologia, como realizado por DORTA et al 2002, reflete com mais exatidão a TATE nos CECs de boca. Além disso, a classificação da TATE, de acordo com sua intensidade, foi feita baseando-se nos tercis do

número de eosinófilos por milímetro quadrado obtidos nos 131 CECs estudados, o que torna a metodologia passível de reprodução e permite a comparação dos resultados obtidos em diferentes estudos.

Quanto à correlação entre a TATE e o prognóstico dos pacientes com CEC de boca, nossos resultados não conseguiram reproduzir os obtidos por DORTA et al. (2002), os quais demonstraram que a eosinofilia intensa constituiu um fator de prognóstico favorável independente. Todavia, algumas diferenças podem ser encontradas entre os dois estudos, como número de campos microscópicos avaliados, extensão da análise microscópica, estadiamento clínico dos pacientes e localização tumoral. Como a grande maioria da nossa amostra foi composta por pacientes com estadiamentos clínicos III e IV, a análise isolada da eosinofilia tecidual não apresentou grande influência sobre o prognóstico, já que tumores avançados apresentam um prognóstico desfavorável, devido à maior dificuldade para o planejamento terapêutico e baixo índice de cura, contribuindo para uma redução da sobrevivência desses indivíduos.

Na correlação entre os genótipos 434 do gene *ECP* e a intensidade da TATE, nenhuma diferença estatística significativa foi obtida (Tabela 10). Todavia, a análise do subgrupo de pacientes que tiveram tumores com intensa eosinofilia tecidual revelou que os indivíduos 434GC/CC apresentaram maior frequência de esvaziamento cervical bilateral (45,8%) e radioterapia pós-operatória (79,2%), assim como maiores taxas de recidiva local (29,2%), de embolização vascular (37,5%) e de comprometimento das margens cirúrgicas (16,7%), quando comparados aos portadores do genótipo 434GG (Tabela 11). Com base nas diferenças numéricas encontradas entre os dois grupos, pode-se sugerir que houve uma tendência de os pacientes com genótipo 434GC/CC apresentarem um pior prognóstico.

O polimorfismo 434(G>C) do gene *ECP*, resultante da substituição de G por C na posição 434, causa uma alteração do aminoácido arginina para treonina na posição 97 do peptídeo maduro. Experimentos *in vitro* (TRULSON et al., 2007) sugeriram que a capacidade citotóxica da ECP tem forte ligação com a região do aminoácido 97 e que suas propriedades biológicas são alteradas por esse polimorfismo, já que as proteínas recombinantes que continham uma treonina na posição 97 perderam sua atividade citotóxica. No presente estudo, a tendência de os pacientes com CEC de boca, intensa eosinofilia tecidual e genótipos 434GC/CC apresentarem uma evolução clínica desfavorável sugere que, apesar da presença marcante dos eosinófilos nesses tumores, a possível atividade antitumoral dessa célula poderia estar comprometida, já que as moléculas da proteína ECP codificadas na presença desse polimorfismo exibiriam propriedades citotóxicas inativadas. Embora seja uma

hipótese interessante, devemos salientar que a análise isolada da influência de um polimorfismo genético na atividade celular antitumoral, como realizado nesse estudo, pode ser de difícil interpretação, tendo em vista as inúmeras variáveis a serem consideradas no desenvolvimento e evolução da neoplasia. Além disso, deve-se lembrar que a amostra de CECs de boca com TATE intensa avaliados nesse trabalho foi pequena, o que torna necessária a realização de outras pesquisas para confirmação dos resultados obtidos.

O conhecimento sobre a participação do polimorfismo 434 (G>C) nas neoplasias malignas é limitado. Na literatura, o trabalho de MOLIN (2004) avaliou a correlação desse polimorfismo genético de base única com TATE e o prognóstico dos pacientes com Linfoma de Hodgkin. Os indivíduos que apresentavam tumores com eosinofilia intensa tiveram um pior prognóstico e o genótipo 434GG apresentou associação com a presença de esclerose nodular histológica e altas taxas de sedimentação de eritrócitos, ambos indicadores de prognósticos desfavoráveis.

Outro aspecto interessante da pesquisa de MOLIN (2004) referiu-se aos níveis séricos da ECP. Na ocasião do diagnóstico, a maioria dos pacientes com Linfoma de Hodgkin apresentou níveis elevados dessa proteína que se correlacionaram com a TATE intensa, esclerose nodular histológica, alta taxa de sedimentação de eritrócitos e maior leucometria. Durante a preservação, notou-se uma redução dos níveis da ECP nos pacientes que apresentavam remissão da doença, entretanto somente um pequeno número de indivíduos foi submetido a essa nova mensuração. Baseado nesses resultados, sugeriu-se que os níveis séricos dessa proteína poderiam ser usados para avaliar os efeitos do tratamento, especialmente para possíveis estratégias direcionadas contra os eosinófilos.

Verificou-se uma correlação estatística significativa ($p=0,010$) entre os genótipos 434 do gene *ECP* e as margens cirúrgicas (Tabela 15). Dos 157 pacientes com CEC de boca avaliados, nove apresentaram tumores com margens comprometidas e, coincidentemente, todos eram portadores dos genótipos 434GC/CC. Independente do genótipo 434 do gene *ECP* apresentado por esses pacientes, o estado das margens de ressecção constitui um importante fator preditivo de prognóstico (WOOLGAR, 2006), sendo que alguns autores (BINAHMED, NASON e ABDOH, 2007) notaram uma maior probabilidade de sobrevida global (69%) em cinco anos nos pacientes cujos tumores apresentavam margens livres, quando comparados àqueles com margens exíguas (58%) e os com margens comprometidas (38%). Além disso, a presença de envolvimento das margens pelas células malignas aumentou o risco relativo de morte em cinco anos em 90% desses pacientes.

Nenhuma diferença estatística significativa foi detectada entre as probabilidades de sobrevida global e livre de doença, em relação aos genótipos 434 do gene *ECP* (Tabelas 16 e 17, Figuras 10 e 11). Contudo, houve uma maior probabilidade de sobrevida global, acumulada em dez anos, nos pacientes com CEC de boca que possuíam o genótipo 434GG (Tabela 16, Figura 10).

Nos pacientes com os genótipos 434GC/CC, notou-se que as probabilidades de sobrevida específica por câncer, acumuladas em cinco e dez anos, foram semelhantes (Tabela 18, Figura 12). Esse resultado indica que grande parte dos indivíduos portadores dos genótipos 434GC/CC veio a óbito pela doença antes do término dos 120 meses de preservação, demonstrando que esses pacientes apresentaram um pior prognóstico, quando comparados àqueles com genótipo 434GG.

Até o momento, o presente trabalho foi pioneiro no estudo da correlação entre a TATE e o polimorfismo 434 do gene *ECP* nos pacientes com CEC de boca. A tendência a uma pior evolução clínica para os pacientes com CEC de boca, TATE intensa e genótipos 434GC/CC justifica, no futuro, a investigação mais criteriosa da interação entre os eosinófilos e as células epiteliais malignas, particularmente no que se refere à função citotóxica das variantes genéticas da *ECP*. Esse conhecimento poderá contribuir para uma melhor compreensão da atividade dos eosinófilos na evolução das neoplasias malignas.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente trabalho, verificou-se que:

- ✓ houve uma predominância dos indivíduos heterozigotos (434GC) para o polimorfismo 434(G>C) do gene *ECP* nos pacientes com CEC de boca e no grupo controle;
- ✓ a presença de eosinófilos nos tumores, quantificada por análise morfométrica, variou de zero e o máximo de 282 eosinófilos/mm², sendo classificada como ausente/discreta quando se observavam 0 a 21 eosinófilos/mm², moderada quando se observavam 22 a 68 eosinófilos/mm² e intensa quando se observavam mais de 69 eosinófilos/mm²;
- ✓ houve uma distribuição semelhante dos genótipos 434 do gene *ECP* nos pacientes com CEC de boca com diferentes intensidades de eosinofilia tecidual;
- ✓ houve uma tendência dos pacientes com CEC de boca, TATE intensa e genótipos 434GC/CC apresentarem uma pior evolução clínica, caracterizada por uma maior porcentagem de esvaziamento cervical bilateral, maior ocorrência de recidiva local, embolização vascular, comprometimento das margens cirúrgicas e realização de radioterapia pós-operatória;
- ✓ o polimorfismo 434 do gene *ECP* não foi fator de prognóstico significativo para os pacientes com CEC de boca;
- ✓ nenhuma correlação estatística significativa foi obtida entre as probabilidades de sobrevida global, livre de doença e específica por câncer, em relação aos genótipos 434 do gene *ECP*; todavia houve uma maior probabilidade de sobrevida global, acumulada em dez anos, nos pacientes com CEC de boca que apresentavam o genótipo 434GG.

Baseados em nossos resultados, concluímos que houve uma tendência de os pacientes com CEC de boca, intensa eosinofilia tecidual e genótipos 434GC/CC do gene *ECP* apresentarem uma evolução clínica desfavorável, quando comparados aos indivíduos com genótipo 434GG, provavelmente pela presença de uma variante genética dessa proteína com propriedades citotóxicas alteradas.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Abbas AK, Lichtman AH. *Imunologia celular e molecular*. 5th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

Alkhabuli JO, High AS. Significance of eosinophil counting in tumor associated tissue eosinophilia (TATE). *Oral Oncol*. 2006; 42(8):849-50.

Alrawi SJ, Tan D, Stoler DL, Dayton M, Anderson GR, Mojica P, et al. Tissue eosinophilic infiltration: a useful marker for assessing stromal invasion, survival and locoregional recurrence in head and neck squamous neoplasia. *Cancer J*. 2005; 11(3):217-25.

Barker RL, Loegering DA, Ten RM, Hamann KJ, Pease LR, Gleich GJ. Eosinophil cationic protein cDNA. Comparison with other toxic cationic proteins and ribonucleases. *J Immunol*. 1989; 143(3):952-5.

Beiguelman B. *Genética médica*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 1977.

Binahmed A, Nason RW, Abdoh AA. The clinical significance of the positive surgical margin in oral cancer. *Oral Oncol*. 2007; 43(8):780-4.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol*. 1992; 166(4):375-81.

Byström J, Garcia RC, Håkansson L, Karawajczyk M, Moberg L, Soukka J, et al. Eosinophil cationic protein is stored in, but not produced by, peripheral blood neutrophils. *Clin Exp Allergy*. 2002; 32(7):1082-91.

Carreras E, Boix E, Navarro S, Rosenberg HF, Cuchillo CM, Nogués MV. Surface-exposed amino acids of eosinophil cationic protein play a critical role in the inhibition of mammalian cell proliferation. *Mol Cell Biochem*. 2005; 272(1-2):1-7.

Cormier SA, Taranova AG, Bedient C, Nguyen T, Protheroe C, Pero R, et al. Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response. *J Leukoc Biol*. 2006; 79(6):1131-9.

Costello R, O'Callaghan T, Sébahoun G. Eosinophils and antitumour response. *Rev Med Interne*. 2005; 26(6):479-84.

Domachowske JB, Dyer KD, Adams AG, Leto TL, Rosenberg HF. Eosinophil cationic protein/RNase 3 is another RNase A-family ribonuclease with direct antiviral activity. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26(14):3358-63.

Dorta RG, Landman G, Kowalski LP, Lauris JR, Latorre MR, Oliveira DT. Tumour-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology.* 2002; 41(2):152-7.

Dyer KD, Rosenberg HF. The RNase a superfamily: generation of diversity and innate host defense. *Mol Divers.* 2006; 10(4):585-97.

Ellyard JJ, Simson L, Parish CR. Th2-mediated anti-tumour immunity: friend or foe? *Tissue Antigens.* 2007; 70(1):1-11.

Ercan I, Cakir B, Başak T, Ozdemir T, Sayin I, Turgut S. Prognostic significance of stromal eosinophilic infiltration in cancer of the larynx. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005; 132(6):869-73.

Eriksson J, Woschnagg C, Fernvik E, Venge P. A SELDI-TOF MS study of the genetic and post-translational molecular heterogeneity of eosinophils cationic protein. *J. Leukoc. Biol.* 2007a; 82(6): 1491-500.

Eriksson J, Reimert CM, Kabatereine NB, Kazibwe F, Ileri E, Kadzo H, et al. The 434(G>C) polymorphism within the coding sequence of Eosinophil Cationic Protein (ECP) correlates with the natural course of *Schistosoma mansoni* infection. *Int J Parasitol.* 2007b; 37(12): 1359-66.

Farah SB. *D N A Segredos & Mistérios*. 2nd ed. São Paulo: Sarvier; 2007.

Freire-Maia N. *Genética de populações humanas*. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo; 1974

Gleich GJ. Mechanisms of eosinophil-associated inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 105(4):651-63.

Gleich GJ, Adolphson CR, Leiferman KM. The biology of the eosinophilic leukocyte. *Annu Rev Med.* 1993; 44:85-101.

Goldsmith MM, Belchis DA, Cresson DH, Merritt WD 3rd, Askin FB. The importance of the eosinophil in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1992; 106(1):27-33.

Goldsmith MM, Cresson DH, Askin FB. The prognostic significance of stromal eosinophilia in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1987; 96(4):307-18.

Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin R C, Gelbart W M, Wessler SR. *Introdução à Genética*. 8th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Hernnäs J, Särnstrand B, Lindroth P, Peterson CG, Venge P, Malmström A. Eosinophil cationic protein alters proteoglycan metabolism in human lung fibroblast cultures. *Eur J Cell Biol.* 1992; 59(2):352-63.

Hogan SP. Recent advances in eosinophil biology. *Int Arch Allergy Immunol.* 2007; 143 Suppl 1:3-14.

Horie N, Shimoyama T, Kaneko T, Ide F. Multiple oral squamous cell carcinomas with blood and tissue eosinophilia. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65(8):1648-50.

Horiuchi K, Mishima K, Ohsawa M, Sugimura M, Aozasa K. Prognostic factors for well-differentiated squamous cell carcinoma in the oral cavity with emphasis on immunohistochemical evaluation. *J Surg Oncol.* 1993; 53(2):92-6.

International Union Against Cancer. *TNM classification of malignant tumours*. 6th ed. New York: Wiley-Liss; 2002.

Jönsson UB, Byström J, Stålenheim G, Venge P. A (G->C) transversion in the 3' UTR of the human ECP (eosinophil cationic protein) gene correlates to the cellular content of ECP. *J Leukoc Biol.* 2006; 79(4):846-51.

Jönsson UB, Byström J, Stalenheim G, Venge P. Polymorphism of the eosinophil cationic protein-gene is related to the expression of allergic symptoms. *Clin Exp Allergy.* 2002; 32(7):1092-5.

Koh GC, Shek LP, Goh DY, Van Bever H, Koh DS. Eosinophil cationic protein: is it useful in asthma? A systematic review. *Respir Med.* 2007; 101(4):696-705.

Lee NA, Lee JJ. Interview with Dr. Nancy A. Lee and Dr. James J. Lee regarding Pivotal Advance: eosinophil infiltration of solid tumors is an early and persistent inflammatory host response. Interview by Helene F. Rosenberg. *J Leukoc Biol.* 2006; 79(6):1129-30.

Lehrer RI, Szklarek D, Barton A, Ganz T, Hamann KJ, Gleich GJ. Antibacterial properties of eosinophil major basic protein and eosinophil cationic protein. *J Immunol.* 1989; 142(12):4428-34.

Leighton SE, Teo JG, Leung SF, Cheung AY, Lee JC, van Hasselt CA. Prevalence and prognostic significance of tumor-associated tissue eosinophilia in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer.* 1996; 77(3):436-40.

Levi-Schaffer F, Garbuzenko E, Rubin A, Reich R, Pickholz D, Gillery P, et al. Human eosinophils regulate human lung- and skin-derived fibroblast properties in vitro: a role for transforming growth factor beta (TGF-beta). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999; 96(17):9660-5.

Lorena SC, Oliveira DT, Dorta RG, Landman G, Kowalski LP. Eotaxin expression in oral squamous cell carcinomas with and without tumour associated tissue eosinophilia. *Oral Dis.* 2003a; 9(6):279-83.

Lorena SC, Dorta RG, Landman G, Nonogaki S, Oliveira DT. Morphometric analysis of the tumor associated tissue eosinophilia in the oral squamous cell carcinoma using different staining techniques. *Histol Histopathol.* 2003b; 18(3):709-13.

Lotfi R, Lee JJ, Lotze MT. Eosinophilic granulocytes and damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs): role in the inflammatory response within tumors. *J Immunother.* 2007; 30(1):16-28.

Lowe D, Fletcher CD. Eosinophilia in squamous cell carcinoma of the oral cavity, external genitalia and anus--clinical correlations. *Histopathology.* 1984; 8(4):627-32.

Lowe D, Jorizzo J, Hutt MS. Tumour-associated eosinophilia: a review. *J Clin Pathol.* 1981; 34(12):1343-8.

McLaren DJ, Peterson CG, Venge P. *Schistosoma mansoni*: further studies of the interaction between schistosomula and granulocyte-derived cationic proteins in vitro. *Parasitology.* 1984; 88 (Pt 3):491-503.

Mingomataj EC. Eosinophil-induced prognosis improvement of solid tumors could be enabled by their vesicle-mediated barrier permeability induction. *Med Hypotheses.* 2008; 70(3):582-4.

Mitchell RN; Kumar V; Abbas AK; Fausto N. Fundamentos de Robbins & Cotran Patologia. 7th. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.

Molin D. Bystander cells and prognosis in Hodgkin lymphoma. Review based on a doctoral thesis. Ups J Med Sci. 2004; 109(3):179-228.

Monteseirín J, Vega A. Eosinophil cationic protein is not only a distinctive eosinophil protein. Thorax. 2008; 63(2):185.

Munitz A, Levi-Schaffer F. Eosinophils: 'new' roles for 'old' cells. Allergy. 2004; 59(3):268-75.

Munthe-Kaas MC, Gerritsen J, Carlsen KH, Undlien D, Egeland T, Skinningsrud B, et al. Eosinophil cationic protein (ECP) polymorphisms and association with asthma, s-ECP levels and related phenotypes. Allergy. 2007; 62(4):429-36.

Navarro S, Aleu J, Jiménez M, Boix E, Cuchillo CM, Nogués MV. The cytotoxicity of eosinophil cationic protein/ribonuclease 3 on eukaryotic cell lines takes place through its aggregation on the cell membrane. Cell Mol Life Sci. 2008 Jan;65(2):324-37.

Noguchi E, Iwama A, Takeda K, Takeda T, Kamioka M, Ichikawa K, Akiba T, et al. The promoter polymorphism in the eosinophil cationic protein gene and its influence on the serum eosinophil cationic protein level. Am J Respir Crit Care Med. 2003; 167(2):180-4.

Parise Jr, O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier; 2000.

Prussin C, Metcalfe DD. 5. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. J Allergy Clin Immunol. 2006; 117(2 Suppl Mini-Primer):S450-6.

Rosenberg HF. RNase A ribonucleases and host defense: an evolving story. J Leukoc Biol. 2008; 83(5):1079-87.

Rosenberg HF, Phipps S, Foster PS. Eosinophil trafficking in allergy and asthma. J Allergy Clin Immunol. 2007; 119(6):1303-10.

Rosenberg HF, Dyer KD. Eosinophil cationic protein and eosinophil-derived neurotoxin. Evolution of novel function in a primate ribonuclease gene family. J Biol Chem. 1995; 270(37):21539-44.

Rothenberg ME. Eosinophils in the new millennium. *J Allergy Clin Immunol*. 2007; 119(6):1321-2.

Rothenberg ME, Hogan SP. The eosinophil. *Annu Rev Immunol*. 2006; 24:147-74.

Samoszuk M. Eosinophils and human cancer. *Histol Histopathol*. 1997; 12(3):807-12.

Schmekel B, Ahlner J, Malmström M, Venge P. Eosinophil cationic protein (ECP) in saliva: a new marker of disease activity in bronchial asthma. *Respir Med*. 2001; 95(8):670-5.

Simson L, Ellyard JJ, Dent LA, Matthaei KI, Rothenberg ME, Foster PS, et al. Regulation of carcinogenesis by IL-5 and CCL11: a potential role for eosinophils in tumor immune surveillance. *J Immunol*. 2007; 178(7):4222-9.

Sugihara R, Kumamoto T, Ito T, Ueyama H, Toyoshima I, Tsuda T. Human muscle protein degradation in vitro by eosinophil cationic protein (ECP). *Muscle Nerve*. 2001; 24(12):1627-34.

Trivedi SG, Lloyd CM. Eosinophils in the pathogenesis of allergic airways disease. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64(10):1269-89.

Trulsson A, Byström J, Engström A, Larsson R, Venge P. The functional heterogeneity of eosinophil cationic protein is determined by a gene polymorphism and post-translational modifications. *Clin Exp Allergy*. 2007; 37(2):208-18.

Trulsson A, Nilsson S, Venge P. The eosinophil granule proteins in serum, but not the oxidative metabolism of the blood eosinophils, are increased in cancer. *Br J Haematol*. 1997; 98(2):312-4.

Venge P, Byström J, Carlson M, Håkansson L, Karawacjzyk M, Peterson C, et al. Eosinophil cationic protein (ECP): molecular and biological properties and the use of ECP as a marker of eosinophil activation in disease. *Clin Exp Allergy*. 1999; 29(9):1172-86.

Venge P, Byström J. Eosinophil cationic protein (ECP). *Int J Biochem Cell Biol*. 1998; 30(4):433-7.

Zhang J, Rosenberg HF. Sequence variation at two eosinophil-associated ribonuclease loci in humans. *Genetics*. 2000; 156(4):1949-58.

Young JD, Peterson CG, Venge P, Cohn ZA. Mechanism of membrane damage mediated by human eosinophil cationic protein. *Nature*. 1986; 321(6070):613-6.

Weller PF. Human eosinophils. *J Allergy Clin Immunol*. 1997;100(3):283-7.

Wong DT, Bowen SM, Elovic A, Gallagher GT, Weller PF. Eosinophil ablation and tumor development. *Oral Oncol*. 1999; 35(5):496-501.

Woolgar JA. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2006; 42(3):229-39.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Formulário utilizado para a coleta de dados clínicos e microscópicos relativos aos pacientes com carcinoma espinocelular de boca.

Faculdade de Odontologia de Bauru / USP
Departamento de Estomatologia - Área de Patologia
Fundação Antônio Prudente / Hospital do Câncer

Departamento de Anatomia Patológica

Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia

“Associação do polimorfismo do gene da proteína catiônica eosinofílica com a eosinofilia tecidual associada aos tumores em carcinomas espinocelulares de boca”

Michele Conceição Pereira; Dra. Denise Tostes Oliveira; Dr. Gilles Landman; Dr. Luiz Paulo Kowalski

I. Identificação e dados demográficos:

1. Número no estudo: _____
2. RGH: _____
3. Idade: _____ anos
4. Gênero: ☐ 1-masculino ☐ 2-feminino
5. Raça: ☐ 1-branca ☐ 2-amarela ☐ 3-negra ☐ 4-outra _____
6. Residência: ☐ 1-capital ☐ 2-outra cidade de São Paulo ☐ 3-outro estado

II. História clínica:

7. Tempo de história: _____ meses (999 se desconhecido)
8. Queixas: ☐ 1-somente do t. primário ☐ 2-somente da metástase ☐ 3-ambos ☐ 9-desc.
9. Biópsia prévia: ☐ 0-não ☐ 1-primário ☐ 2-linfonodo ☐ 3-ambos
10. História familiar de câncer: ☐ 0-não ☐ 1-pais ☐ 2-irmãos ☐ 3-outros parentes ☐ 9-desc.
11. Tabagismo: ☐ 0-não ☐ 1- + ☐ 2- ++ ☐ 3- +++ ☐ 4- ++++ ☐ 5-ex-fumante ☐ 9-desc.
12. Etilismo: ☐ 0-não ☐ 1- + ☐ 2- ++ ☐ 3- +++ ☐ 4- ++++ ☐ 5-ex-fumante ☐ 9-desc.
13. Eosinofilia sangüínea: _____

III. Loco-regional:

14. Local do tumor: ☐ 1-lábio superior ☐ 2-lábio inferior ☐ 3-língua ☐ 4-assoalho
☐ 5-gengiva superior ☐ 6-palato duro ☐ 7-palato mole ☐ 8-gengiva inferior ☐ 9-mucosa jugal
☐ 10-área retromolar
15. Extensão do tumor: ☐ 0-não ☐ 1-língua ☐ 2-assoalho ☐ 3-gengiva ☐ 4-retromolar
☐ 5-lábio superior ☐ 6-lábio inferior ☐ 7-mucosa jugal ☐ 8-palato ☐ 9- loja amigdaliana
☐ 10-outros
16. Linha média: ☐ 1-dista $\geq$ 1cm ☐ 2-dista <1cm ☐ 3-chega ☐ 4-ultrapassa <1cm
☐ 5-ultrapassa >1cm ☐ 9-desc.
17. Tipo de lesão: ☐ 1-úlcerovegetante ☐ 2-úlceroinfiltrativa ☐ 3-outra _____
18. Diâmetro aproximado da lesão: _____ cm
19. Nível de linfonodos ipsilaterais N+ clinicamente: ☐ 0-não ☐ 1-I ☐ 2-II ☐ 3-III ☐ 4-IV ☐ 5-V
20. Diâmetro do maior linfonodo ipsi+: _____ cm (0 se N-)
21. Nível de linfonodos contralaterais N+ clinicamente: ☐ 0-não ☐ 1-I ☐ 2-II ☐ 3-III ☐ 4-IV ☐ 5-V

22. Diâmetro do maior linfonodo cont. +: _____ cm (0 se N-)
23. Mobilidade dos linfonodos: ☐ 1-móveis ☐ 2-diminuição de mobilidade ☐ 3-fix. superf.
☐ 4-fix. profunda ☐ 9-desc.
24. Estádio T (atualizar UICC 87): ☐ 1-T1 ☐ 2-T2 ☐ 3-T3 ☐ 4-T4 ☐ 9-Tx
25. Estádio N (atualizar UICC 87): ☐ 0-N0 ☐ 1-N1 ☐ 2-N2a ☐ 3-N2b ☐ 4-N2c ☐ 5-N3 ☐ 9-Nx

IV. Cirurgia:

26. Data da cirurgia: ____/____/____
27. Cir. Tumor primário: ☐ 1-glossec. parcial ☐ 2-hemiglossec. ☐ 3-pelve glossec.
☐ 4-pelve (gl) mand. marg. (Pull) ☐ 5-pelve (gl) mand. sec. (com) ☐ 6-retrom.
☐ 7-retrom. ampliada ☐ 8-resssecção de lábio
28. Esvaz. cervical ipsilateral: ☐ 0-não ☐ 1-ESOH ☐ 2-ECR ☐ 3-ECRM (XI) ☐ 4-ECRM (XI+VJ)
29. Esvaz. cervical contral. (simult.): ☐ 1-não ☐ 2-ESOH ☐ 3-ECRM (XI) ☐ 4-ECRM (XI+VJ)
30. Esvaz. cervical: ☐ 0-não ☐ 1-monobloco ☐ 2-dibloco ☐ 9-desc.
31. Data da alta hospitalar: ____/____/____

V. Radioterapia pós-operatória:

32. Data do início ____/____/____ (0/0/0 se não fez)
33. Aparelho: ☐ 0-não fez ☐ 1-ortov. ☐ 2-cesium ☐ 3-cobalto ☐ 4-AL
34. Dose campo cérvico-facial: _____ Gy (0 se não fez)
35. Dose em fossa ipsilateral: _____ Gy (0 se não fez)
36. Dose em fossa contralateral: _____ Gy (0 se não fez ou irradi. unilateral)
37. Data do final: ____/____/____

VI. Anatomopatológico da peça da cirurgia inicial:

38. Número do AP: _____
39. Histologia do t. primário: ☐ 1-CEC I ☐ 2-CEC II ☐ 3-CEC III ☐ 4-CEC SOE
40. Hiper Cromatismo: ☐ 0-ausente ☐ 1-discreto ☐ 2-moderado ☐ 3-intenso
41. Pleomorfismo: ☐ 0-ausente ☐ 1-discreto ☐ 2-moderado ☐ 3-intenso
42. Mitoses atípicas: ☐ 0-ausente ☐ 1-discreto ☐ 2-moderado ☐ 3-intenso
43. Queratinização: ☐ 0-ausente ☐ 1-discreto ☐ 2-moderado ☐ 3-intenso
44. Padrão de invasão tumoral : ☐ 1-compressivo ☐ 2-cordões grossos ☐ 3-cordões finos ☐ 4-células isoladas
45. Distribuição do infiltrado inflamatório: ☐ 1-focal ☐ 2-difusa
46. Localização do infiltrado inflamatório: ☐ 1- epitélio ☐ 2- estroma ☐ 3-ambos
47. Infiltrado inflamatório PMN: ☐ 0-ausente ☐ 1-discreto ☐ 2-moderado ☐ 3-intenso
48. Infiltrado inflamatório MN: ☐ 0-ausente ☐ 1-discreto ☐ 2-moderado ☐ 3-intenso
49. Infiltrado inflamatório eosinofílico: ☐ 0-ausente ☐ 1-discreto ☐ 2-moderado ☐ 3-intenso
50. Embolização vascular: ☐ 0-não ☐ 1-linfática ☐ 2-sangüínea ☐ 3-ambas ☐ 9-ign.
51. Infiltração perineural: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado
52. Infiltração muscular: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado
53. Infiltração óssea: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado
54. Infiltração de glândulas salivares: ☐ 0-não ☐ 1-presente ☐ 9-ignorado
-

55. Margens: ☐ 0-livres ☐ 1-presentes ☐ 2-comprometidas ☐ 9-ign.
56. Espessura: _____ mm (999 se não relatado)
57. Número de linfonodos comprometidos ipsilaterais: _____ (99 se não esv.)
58. Número de linfonodos dissecados ipsilaterais: _____ (999 se não esv.)
59. Nível de linfonodos comprometidos ipsi.: ☐ 0-N ☐ 1-I ☐ 2-II ☐ 3-III ☐ 4-IV ☐ 5-V ☐ 9-ign./não esv.
60. Número de linfonodos comprometidos contralaterais: _____ (99 se não esv.)
61. Número de linfonodos dissecados contralaterais: _____ (999 se não esv.)
62. Nível de linfonodos comprometidos cont.: ☐ 0-N ☐ 1-I ☐ 2-II ☐ 3-III ☐ 4-IV ☐ 5-V ☐ 9-ign./não esv.

VII. Evolução:

63. Data da primeira recidiva: ____/____/____ (0/0/0 se não teve)
64. Locais de recidiva: ☐ 0-não teve ☐ 1-local ☐ 2-pescoço ipsi ☐ 3-pescoço contra ☐ 4-pulmão
☐ 5-osso ☐ 6-fígado ☐ 7-outra à distância _____
☐ 8-teve recidiva, local ignorado ☐ 9-ignorado (perdido de vista assintomático < 5 anos)
65. Data do diagnóstico do segundo tumor primário: ____/____/____ (0/0/0 se não teve)
66. Local do segundo tumor primário: CID-O _____ (0 se não teve)
67. Data da última informação objetiva de seguimento: ____/____/____
68. Situação na última informação de seguimento: ☐ 1-vivo 000 ☐ 2-vivo com CA
☐ 3-morte pós-operatória ☐ 4-MOCA ☐ 5-Moass _____ ☐ 6-perdido de vista
(definição: para pacientes com menos de 5 anos de seguimento todos os que deixaram de retornar por um período igual ao dobro estipulado. Pacientes assintomáticos perdidos após 5 anos devem ser classificados como vivos 000)

APÊNDICE B – Fotos dos géis de agarose a 2% correspondentes aos genótipos dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca e do grupo controle.

APÊNDICE C – Graduação histopatológica de malignidade.

AP	GQ	PN	M	PI	RH	Total
204672	3	1	2	2	1	9
206741	2	1	1	2	1	7
290394	1	1	1	2	2	7
316494	3	2	1	3	2	11
319343	2	2	1	2	2	9
319763	2	1	2	3	2	10
320264	1	1	1	2	1	6
320584	3	1	1	3	2	10
321256	2	1	1	1	1	6
321411	1	1	1	2	1	6
321984	1	1	1	2	1	6
322405	1	1	1	2	2	7
322567	2	2	2	1	1	8
322744	1	1	1	2	2	7
322826	4	2	3	2	3	14
323166	1	1	1	1	1	5
326122	2	1	1	2	2	8
327219	2	1	1	2	2	8
327898	2	1	1	2	2	8
331634	2	1	1	2	2	8
333852	2	2	1	2	2	9
334412	3	2	2	3	2	12
336207	2	1	2	2	1	8
336700	2	1	1	2	2	8
336826	2	1	2	2	1	8
336927	1	1	1	2	1	6
337309	2	2	1	2	1	8
340546	2	1	1	3	2	9
B97-00346	4	2	2	2	2	12
B97-02428	2	2	1	2	1	8
B97-03072	2	2	2	1	2	9
B97-03446	1	2	1	2	3	9
B97-03806	2	1	2	2	2	9
B97-04495	2	1	2	2	2	9
B97-04938	1	1	1	2	2	7
B97-06643	2	1	1	2	3	9
B97-08053	3	3	2	2	2	12
B98-00569	1	1	1	2	1	6
B98-00582	1	1	1	2	2	7
B98-01738	3	3	2	3	2	13
B98-02175	2	2	2	2	1	9
B98-02215	2	2	2	2	1	9
B98-02316	3	2	2	1	1	9
B98-03078	3	2	2	1	1	9
B98-03573	1	1	2	2	2	8
B98-03659	1	1	1	2	1	6
B98-04082	2	1	1	2	1	7
B98-04792	1	1	2	1	1	6
B98-05226	2	2	2	2	2	10
B98-06261	1	2	1	3	1	8
B98-06946	3	2	2	1	2	10
B98-07807	1	1	1	2	2	7
B98-08026	2	2	2	1	2	9
B98-08293	2	2	2	2	2	10
B98-08488	2	2	2	1	2	9
B98-09091	2	2	2	2	2	10
B98-09527	2	1	2	2	3	10
B98-09654	2	1	2	2	2	9
B99-00984	1	1	1	2	1	6
B99-01499	2	2	1	2	2	9
B99-01958	3	2	2	2	3	12
B99-02040	2	1	1	3	2	9
B99-02924	3	2	1	3	2	11
B99-02929	4	2	2	2	2	12
B99-03334	2	1	1	2	1	7
B99-04783	4	3	3	2	2	14

AP: número de registro do exame anátomo-patológico do paciente; GQ: grau de queratinização; PN: pleomorfismo nuclear; M: número de mitoses; PI: padrão de invasão; RH: resposta do hospedeiro.

AP	GQ	PN	M	PI	RH	Total
B99-05461	2	3	3	2	3	13
B99-05549	1	2	1	2	2	8
B99-06903	1	1	2	2	1	7
B99-07814	1	1	1	2	1	6
B99-07923	3	2	1	2	3	11
B99-08149	1	1	1	2	2	7
B99-09952	2	1	1	3	2	9
B99-10003	3	2	1	3	1	10
BA0-01766	1	1	1	2	1	6
BA0-01978	2	1	2	2	1	8
BA0-02057	1	2	2	3	1	9
BA0-02359	2	2	3	3	2	12
BA0-02659	1	1	2	2	2	8
BA0-02716	1	2	2	2	2	9
BA0-03197	2	1	2	1	1	7
BA0-03332	2	1	2	2	2	9
BA0-04769	1	3	1	1	1	7
BA0-05095	2	2	2	2	3	11
BA0-05463	1	1	1	2	1	6
BA0-05468	2	3	2	3	1	11
BA0-05519	1	2	3	2	1	9
BA0-06598	1	1	2	2	1	7
BA0-06727	1	2	2	3	1	9
BA0-06878	1	1	1	2	1	6
BA0-06883	3	2	2	2	2	11
BA0-06951	4	2	2	1	2	11
BA0-07024	2	2	1	3	2	10
BA0-08201	4	2	2	3	1	12
BA0-08270	4	4	2	3	3	16
BA0-09031	1	1	1	2	2	7
BA0-09391	3	3	2	2	2	12
BA0-09483	1	1	2	2	3	9
BA1-00013	2	2	1	2	1	8
BA1-00107	4	3	2	4	1	14
BA1-01570	1	1	1	2	1	6
BA1-03019	2	1	2	2	3	10
BA1-03670	3	2	2	2	2	11
BA1-04292	4	3	2	3	3	15
BA1-05174	2	1	1	2	1	7
BA1-06249	1	1	1	2	1	6
BA1-06390	2	2	1	3	2	10
BA1-06601	4	3	3	3	2	15
BA1-07687	3	2	1	3	2	11
BA1-09068	3	2	1	3	3	12
BA1-09187	2	1	1	3	1	8
BA1-09739	2	2	1	3	1	9
BA2-00611	2	2	2	3	2	11
BA2-02143	2	2	1	2	1	8
BA2-03285	3	2	1	3	2	11
BA2-03321	1	1	1	2	1	6
BA2-04224	2	1	2	2	2	9
BA2-04783	4	3	1	1	2	11
BA2-05187	4	3	2	3	1	13
BA2-05876	2	3	2	3	1	11
BA2-06316	1	2	2	2	2	9
BA2-06996	2	2	1	3	2	10
BA2-07124	1	1	1	2	1	6
BA2-07521	2	1	1	2	2	8
BA2-08815	2	2	2	3	1	10
BA2-09898	1	2	1	3	1	8
BA2-011295	2	2	1	1	1	7
BA2-011545	4	3	2	1	1	11
BA2-011817	2	2	1	3	2	10
BA2-012007	1	1	1	1	1	5
BA2-012154	2	2	1	3	2	10

AP: número de registro do exame anátomo-patológico do paciente; GQ: grau de queratinização; PN: pleomorfismo nuclear; M: número de mitoses; PI: padrão de invasão; RH: resposta do hospedeiro.

AP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Total	Campos capturados	Área/campo (mm ³)	Eosinófilos/mm ²
204672	24	20	28	45	49	45	33	43	39	44	58	36	44	18	0	6	1	3	4	5	1	38	31	35	18	668	25	0,09471591	282,11
206741	36	38	32	47	23	30	13	14	8	16	19	21	16	7	20	36	32	35	21	29	31	19	16	22	18	599	25	0,09471591	252,97
290394	10	10	0	1	2	1	0	5	2	2	0	0	0	0	1	4	3	0	1	0	1	0	0	1	0	44	24	0,09471591	19,36
316494	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	11	16	0,09471591	7,26
319343	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	20	0,09471591	1,06
319763	11	20	18	0	9	16	7	19	10	20	24	3	4	7	9	9	0	8	12	9	9	8	15	1	0	248	24	0,09471591	109,10
320264	29	9	3	7	5	7	5	46	19	18	32	13	11	27	39	32	13	18	2	6	2	7	10	1	8	369	25	0,09471591	155,83
320584	2	8	8	6	0	2	6	6	2	4	2	4	11	6	24	81	24	7	8	1	0	2	0	0	0	214	24	0,09471591	94,14
321256	0	0	3	0	1	8	10	5	6	15	8	7	12	6	14	12	10	6	12	17	14	15	17	17	5	220	25	0,09471591	92,91
321411	0	1	3	1	1	5	1	2	1	2	2	3	3	13	9	9	7	8	4	1	9	0	0	0	0	85	21	0,09471591	42,73
321984	6	5	1	3	5	2	0	0	4	0	0	1	18	4	8	2	3	3	9	7	13	5	6	10	0	115	24	0,09471591	50,59
322405	6	2	7	5	6	7	0	8	3	1	2	5	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	3	0	0	60	23	0,09471591	27,54
322567	23	5	17	11	13	3	11	20	8	14	10	19	12	9	13	15	14	24	8	7	6	2	6	15	0	285	24	0,09471591	125,37
322744	10	9	13	1	8	13	3	7	9	25	15	10	16	22	9	8	10	10	12	10	0	0	0	0	0	220	20	0,09471591	116,14
322826	33	16	5	20	14	1	4	0	15	9	7	2	1	7	1	0	3	8	4	10	12	4	6	6	0	188	25	0,09471591	79,40
323166	4	4	0	0	2	0	0	1	1	1	3	0	2	0	2	4	1	5	4	1	10	7	5	7	0	64	25	0,09471591	27,03
326122	0	0	2	0	0	3	0	1	1	3	0	0	0	0	1	0	0	0	5	1	1	0	2	0	0	20	25	0,09471591	8,45
327219	46	32	38	26	22	26	31	12	10	7	18	40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	308	12	0,09471591	270,99
327898	0	1	0	2	1	0	0	1	0	1	2	2	0	2	2	0	3	1	1	1	6	1	0	3	0	30	25	0,09471591	12,67
331634	0	3	0	0	3	2	0	0	4	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	3	5	0	1	6	8	38	25	0,09471591	16,05
333852	0	3	0	1	0	2	4	0	1	2	1	4	0	0	0	0	18	4	10	9	8	7	22	4	14	114	25	0,09471591	48,14
334412	13	20	11	12	18	11	18	7	23	44	25	18	13	16	21	30	20	13	14	22	10	3	4	3	16	405	25	0,09471591	171,04
336207	9	5	12	14	8	6	29	33	37	42	54	28	1	0	5	11	41	13	2	16	19	0	0	2	0	387	25	0,09471591	163,44
336700	15	14	4	2	3	2	4	24	35	8	10	1	8	5	7	8	15	12	6	4	8	9	0	15	18	237	25	0,09471591	100,09
336826	0	0	0	2	2	3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	10	23	0,09471591	4,59
336927	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	25	0,09471591	3,38
337309	3	3	6	6	3	3	4	3	1	0	0	0	0	0	2	1	3	3	7	2	1	2	7	2	1	63	25	0,09471591	26,6
340546	0	1	0	0	0	0	1	1	4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	13	0,09471591	6,50
B97-00346	6	6	6	6	3	10	4	0	2	5	0	1	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	54	25	0,09471591	22,81
B97-02428	6	12	32	16	15	15	24	12	11	12	6	13	11	11	7	10	2	6	4	1	21	19	28	30	27	351	25	0,09471591	148,23
B97-03072	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	7	25	0,09471591	2,96
B97-03446	7	10	16	6	3	2	1	34	7	7	5	5	6	6	9	10	3	6	7	13	9	0	0	0	0	172	22	0,09471591	82,54
B97-03806	18	17	15	5	19	10	14	13	11	2	5	2	8	11	2	10	5	4	4	4	12	9	2	12	4	218	25	0,09471591	92,06

APÊNDICE D - Planilha de contagem dos eosinófilos nos carcinomas espinocelulares de boca.

AP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Total	Campos capturados	Área/campo (mm ³)	Eosinófilos/mm ²
B97-04495	15	15	12	9	1	1	0	3	7	11	9	6	5	10	16	7	9	2	3	6	4	6	3	4	6	170	25	0,09471591	71,79
B97-04938	6	1	0	2	6	13	13	0	0	0	3	0	3	2	3	3	3	2	1	3	14	4	1	0	1	84	25	0,09471591	35,47
B97-06643	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	24	0,09471591	0,44
B97-08053	34	28	48	29	32	35	20	39	34	27	14	33	39	26	8	14	4	8	4	3	6	6	2	7	13	513	25	0,09471591	216,65
B98-00569	0	0	1	4	0	1	3	2	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	2	5	0	2	0	0	0	22	23	0,09471591	10,10
B98-00582	6	1	6	0	0	2	1	0	4	8	6	3	13	5	1	7	5	7	3	0	0	0	1	0	5	84	25	0,09471591	35,47
B98-01738	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	3	0	1	0	1	0	12	25	0,09471591	5,07
B98-02175	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	2	4	2	2	1	10	3	0	0	0	0	0	0	0	0	27	22	0,09471591	12,96
B98-02215	7	9	17	10	2	5	12	9	10	25	24	2	3	2	3	0	7	4	6	10	8	9	5	12	8	209	25	0,09471591	88,26
B98-02316	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	5	25	0,09471591	2,11
B98-03078	0	1	2	2	4	10	3	3	3	0	0	2	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	36	18	0,09471591	21,12
B98-03573	3	0	5	5	7	3	19	15	0	2	3	1	2	5	4	1	2	4	6	1	2	0	6	7	0	103	24	0,09471591	45,31
B98-03659	9	1	2	15	11	5	0	2	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	2	3	3	1	57	25	0,09471591	24,07
B98-04082	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	17	0,09471591	0,00
B98-04792	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4	0	3	12	0	0	0	1	0	1	2	1	0	0	9	36	25	0,09471591	15,20
B98-05226	9	3	0	4	0	6	4	3	4	1	6	1	1	3	7	13	11	5	2	7	1	1	3	0	5	100	25	0,09471591	42,23
B98-06261	0	1	4	1	3	11	4	1	2	1	2	5	0	3	2	1	0	1	8	14	0	0	0	0	0	64	20	0,09471591	33,79
B98-07807	0	1	3	3	6	5	5	7	9	10	8	7	8	12	11	8	9	8	10	6	6	13	5	4	3	167	25	0,09471591	70,53
B98-06946	6	8	15	5	18	24	16	9	6	10	11	14	16	9	12	16	9	7	13	3	2	1	0	0	4	234	25	0,09471591	98,82
B98-08026	1	0	3	8	5	6	30	18	14	13	4	3	13	12	8	8	6	8	17	0	8	3	4	1	6	199	25	0,09471591	84,04
B98-08293	0	0	4	2	1	4	6	10	3	3	5	5	3	14	5	10	4	6	3	4	2	1	0	1	0	96	25	0,09471591	40,54
B98-08488	1	0	0	1	0	0	0	1	0	2	0	0	0	2	14	1	0	1	1	0	7	9	2	2	3	47	25	0,09471591	19,85
B98-09091	0	0	0	7	1	0	0	3	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	22	0,09471591	7,20
B98-09527	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	3	1	13	5	3	1	0	0	0	0	29	25	0,09471591	12,25
B98-09654	0	0	0	0	3	2	4	4	12	4	5	2	2	4	6	2	4	11	3	0	1	1	0	1	2	73	25	0,09471591	30,83
B99-00984	1	1	3	5	7	12	20	21	17	11	3	10	8	6	1	1	2	4	10	3	5	3	6	4	1	165	25	0,09471591	69,68
B99-01499	25	15	27	23	27	8	11	15	4	10	3	1	0	0	0	0	10	0	5	3	1	0	0	0	0	188	21	0,09471591	94,52
B99-01958	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	14	0,09471591	0,00
B99-02040	8	8	2	9	15	9	12	1	17	19	40	16	17	14	10	3	8	7	6	27	23	17	17	11	18	334	25	0,09471591	141,05
B99-02924	8	11	14	8	14	24	5	4	9	9	12	14	17	19	18	19	14	23	22	16	40	19	1	0	0	340	25	0,09471591	143,59
B99-02929	14	17	18	6	10	9	17	13	13	10	10	11	6	6	11	6	8	11	14	17	5	4	7	12	0	255	24	0,09471591	112,18
B99-03334	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	0	1	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	15	0,09471591	11,26

AP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Total	Campos capturados	Área/campo (mm ²)	Eosinófilos/mm ²
B99-04783	0	0	0	0	0	1	0	0	1	6	0	0	2	2	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	17	25	0,09471591	7,18
B99-05461	3	3	4	5	10	7	9	22	2	0	3	2	4	10	14	2	1	0	1	0	0	1	0	3	0	106	25	0,09471591	44,77
B99-05549	9	1	5	4	10	15	20	7	9	4	6	6	8	10	16	17	8	9	10	7	5	5	9	7	23	230	25	0,09471591	97,13
B99-06903	2	2	16	15	21	14	3	2	0	1	4	11	6	1	0	0	0	0	0	2	1	1	6	5	0	113	24	0,09471591	49,71
B99-07814	0	4	5	12	6	12	4	9	2	1	0	0	4	13	9	7	6	2	0	1	2	1	6	2	0	108	24	0,09471591	47,51
B99-07923	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2	0	2	2	0	0	0	0	0	0	3	6	2	0	3	0	21	25	0,09471591	8,87
B99-08149	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	25	0,09471591	0,00
B99-09952	8	8	5	8	7	13	18	14	2	0	0	6	0	1	1	0	0	0	3	6	3	7	6	2	1	119	25	0,09471591	50,26
B99-10003	2	2	0	0	0	0	1	3	0	0	1	0	0	1	3	0	0	3	2	2	0	0	0	0	2	22	25	0,09471591	9,29
BA0-01766	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	16	0,09471591	0,66
BA0-01978	1	7	6	0	3	9	3	3	9	8	3	9	9	7	4	6	11	12	6	3	3	5	5	7	18	157	25	0,09471591	66,30
BA0-02057	0	3	0	1	0	0	2	1	2	1	0	0	1	0	5	1	2	0	9	10	6	2	2	0	0	48	23	0,09471591	22,03
BA0-02359	8	5	5	17	12	4	13	15	14	6	12	13	10	5	0	0	0	6	1	0	3	0	4	3	3	159	25	0,09471591	67,15
BA0-02659	0	0	3	0	0	0	0	2	0	0	2	0	11	12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	21	0,09471591	15,08
BA0-02716	1	6	5	2	0	1	3	1	3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	24	19	0,09471591	13,34
BA0-03197	0	13	2	1	9	7	11	5	22	35	37	14	20	12	10	4	8	2	16	7	6	6	13	5	3	268	25	0,09471591	113,18
BA0-03332	2	6	20	6	5	5	10	6	6	1	2	5	7	5	9	8	7	7	3	3	8	6	7	11	7	162	25	0,09471591	68,42
BA0-04769	2	4	5	3	5	3	1	3	1	3	0	3	0	2	0	0	0	0	0	0	3	4	1	3	0	46	25	0,09471591	19,43
BA0-05095	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	11	0,09471591	6,72
BA0-05463	1	2	0	3	3	4	2	2	2	8	5	14	11	6	13	14	2	4	6	10	11	11	5	8	2	149	25	0,09471591	62,93
BA0-05468	0	1	6	9	2	2	4	7	5	3	1	1	0	0	0	0	0	0	1	2	2	2	0	4	2	54	25	0,09471591	22,81
BA0-05519	7	6	2	11	10	3	0	2	4	0	4	2	2	2	1	5	7	3	6	9	4	1	3	3	3	100	25	0,09471591	42,23
BA0-06598	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	25	0,09471591	0,84
BA0-06727	0	0	0	0	0	1	1	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	10	25	0,09471591	4,22
BA0-06878	1	3	4	1	7	10	13	3	9	13	11	6	3	6	2	1	7	7	7	4	1	9	11	10	6	155	25	0,09471591	65,46
BA0-06883	8	2	6	2	4	4	3	1	1	0	0	2	0	2	2	3	1	0	2	0	0	0	0	0	7	50	25	0,09471591	21,12
BA0-06951	5	10	16	13	15	13	11	15	10	5	12	12	12	18	7	12	4	5	4	4	9	5	3	1	11	232	25	0,09471591	97,98
BA0-07024	4	12	9	1	3	0	0	0	0	6	19	16	6	5	8	8	7	2	5	8	2	4	3	0	0	128	23	0,09471591	58,76
BA0-08201	53	18	6	3	2	4	3	3	2	1	4	4	6	6	11	14	6	6	8	5	11	14	10	15	24	239	25	0,09471591	100,93
BA0-08270	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	23	0,09471591	0,00
BA0-09031	4	6	8	3	3	4	5	5	6	0	2	3	0	2	3	2	5	2	2	2	4	6	2	8	4	91	25	0,09471591	38,43
BA0-09391	4	5	3	4	2	6	1	4	15	23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	67	10	0,09471591	70,74
BA0-09483	2	5	3	11	7	5	1	0	0	1	0	1	0	1	5	2	2	5	0	0	0	1	0	0	3	55	25	0,09471591	23,23

AP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	Total	Campos capturados	Área/campo (mm ²)	Eosinófilos/mm ²
BA1-00013	0	0	0	4	3	6	5	0	0	0	5	5	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	31	16	0,09471591	20,46
BA1-00107	3	4	2	3	7	9	6	4	3	7	1	8	4	9	8	4	2	1	1	2	0	3	2	5	1	99	25	0,09471591	41,80
BA1-01570	8	7	13	6	15	4	5	2	1	3	0	0	1	0	6	3	11	4	0	0	0	0	0	0	0	89	18	0,09471591	52,20
BA1-03019	0	0	0	2	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	8	0,09471591	5,28
BA1-04292	5	0	3	2	8	7	2	0	6	5	2	3	5	0	5	0	1	4	4	1	0	0	2	0	0	65	25	0,09471591	27,45
BA1-05174	11	12	14	19	21	2	4	8	16	5	10	17	23	8	12	9	13	17	18	2	6	4	12	20	16	299	25	0,09471591	126,27
BA1-06249	2	7	4	1	0	2	1	0	3	3	10	1	1	0	2	0	0	2	4	4	5	5	1	3	2	63	25	0,09471591	26,61
BA1-06390	1	0	0	1	0	9	7	10	4	3	0	3	5	3	7	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	56	25	0,09471591	23,65
BA1-06601	15	14	19	11	24	17	1	9	14	5	19	12	9	14	11	15	14	8	5	1	4	6	3	9	16	275	25	0,09471591	116,14
BA1-07687	3	0	1	3	9	12	2	1	6	7	9	2	5	0	4	1	5	11	5	7	8	8	0	2	3	114	25	0,09471591	48,14
BA1-09068	1	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	15	0,09471591	2,11
BA1-09187	0	6	8	6	6	15	1	0	2	0	2	2	5	0	1	6	4	3	1	3	1	1	5	3	0	81	24	0,09471591	35,63
BA1-09739	0	0	1	0	0	0	0	1	6	0	16	2	3	0	8	10	5	5	8	18	7	4	3	3	8	108	25	0,09471591	45,61
BA2-00611	1	0	0	0	0	1	3	7	24	15	5	0	6	2	6	15	10	5	11	12	13	5	11	13	5	170	25	0,09471591	71,80
BA2-02143	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0,09471591	0,00
BA2-03285	0	0	0	2	2	2	0	1	0	1	8	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	19	20	0,09471591	10,03
BA2-03321	1	1	0	2	2	0	5	13	11	20	11	9	10	17	16	20	18	14	6	14	10	2	6	2	3	213	25	0,09471591	89,95
BA2-04224	7	10	8	20	12	6	8	8	5	8	11	3	8	7	1	10	6	5	7	9	3	12	7	3	17	201	25	0,09471591	84,89
BA2-04783	19	16	14	14	13	7	3	8	0	2	1	2	1	2	1	8	8	0	4	9	5	29	27	21	10	224	25	0,09471591	94,60
BA2-05187	19	20	18	23	32	24	15	20	20	9	6	4	8	13	17	11	25	26	25	10	16	21	51	48	0	481	24	0,09471591	211,60
BA2-05876	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	5	19	0,09471591	2,78
BA2-06316	3	4	2	1	8	9	9	4	12	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	57	10	0,09471591	60,18
BA2-06996	5	4	0	5	2	0	5	1	0	1	6	7	5	2	22	1	3	15	6	11	1	4	1	0	0	107	23	0,09471591	49,12
BA2-07124	14	16	1	8	6	5	10	13	17	3	0	9	4	6	3	3	7	5	3	1	3	4	4	19	0	164	24	0,09471591	72,15
BA2-07521	0	7	0	1	1	5	0	0	0	0	0	0	0	3	1	3	1	1	1	12	6	7	0	0	0	49	22	0,09471591	23,52
BA2-08815	1	2	9	15	16	12	17	23	10	7	3	0	3	12	7	8	10	3	3	0	1	6	13	22	9	212	25	0,09471591	89,53
BA2-09898	14	10	11	2	3	0	0	2	1	0	0	0	1	8	2	0	0	0	4	19	7	1	0	2	0	87	25	0,09471591	36,74
BA2-011295	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	6	24	0,09471591	2,64
BA2-011545	4	2	13	17	16	12	9	16	16	9	5	17	9	7	10	17	15	21	18	9	14	13	11	11	8	299	25	0,09471591	126,27
BA2-011817	0	1	0	6	3	3	1	0	0	0	3	11	3	11	4	6	3	1	0	2	0	5	0	0	0	63	22	0,09471591	30,23
BA2-012007	0	1	1	7	1	14	3	22	18	16	15	12	11	2	15	9	11	7	9	10	6	7	3	3	3	206	25	0,09471591	87,00
BA2-012154	8	29	15	22	24	19	15	8	15	16	23	12	18	15	9	8	11	23	9	12	7	18	19	9	4	368	25	0,09471591	155,41

APÊNDICE E – Correlação entre a intensidade da eosinofilia tecidual, as características demográficas e história clínica dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Eosinofilia Tecidual Associada aos Tumores							
Variável	Discreta		Moderada		Intensa		p*
	N	%	N	%	N	%	
Gênero							
Masculino	36	83,7	34	77,3	34	77,3	0,693
Feminino	07	16,3	10	22,7	10	22,7	
Idade							
≤ 57 anos	20	46,5	22	50,0	23	52,3	0,864
> 57 anos	23	53,5	22	50,0	21	47,7	
Raça							
Branca	39	90,7	41	93,2	41	93,2	0,336
Amarela	01	2,3	01	2,3	01	2,3	
Negra	0	0	02	4,5	0	0	
Outra	03	7,0	0	0	02	4,5	
Tabagismo#							
Sim	31	72,1	35	81,4	32	76,2	0,594
Não	12	27,9	08	18,6	10	23,8	
Etilismo#							
Sim	27	62,8	29	67,4	31	72,1	0,655
Não	16	37,2	14	32,6	12	27,9	
Eosinofilia sangüínea#							
Sim	03	11,1	03	9,1	07	23,3	0,232
Não	24	88,9	30	90,9	23	76,7	
TOTAL	43	100,0	44	100,0	44	100,0	

N: número de pacientes

p*: valor obtido pelo teste do qui-quadrado considerando-se nível de significância de 5%

#: excluídos os pacientes com informações ignoradas

APÊNDICE F – Correlação entre a intensidade da eosinofilia tecidual e as características clínicas dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Eosinofilia Tecidual Associada aos Tumores							
Variável	Discreta		Moderada		Intensa		p*
	N	%	N	%	N	%	
Localização							
Língua	12	27,9	23	52,3	16	36,4	0,295
Assoalho	09	20,9	07	15,9	10	22,7	
Gengiva superior	03	7,0	0	0	01	2,3	
Palato duro	01	2,3	0	0	0	0	
Palato mole	02	4,7	01	2,3	03	6,8	
Gengiva inferior	09	20,9	04	9,1	06	13,6	
Mucosa jugal	04	9,3	04	9,1	01	2,3	
Área retromolar	03	7,0	05	11,4	07	15,9	
Estádio clínico#							
I	04	9,5	01	2,3	01	2,3	0,527
II	09	21,4	06	14,0	09	20,9	
III	14	33,3	18	41,9	19	44,2	
IV	15	35,7	18	41,9	14	32,6	
Estádio T#							
T1	05	11,9	02	4,7	01	2,3	0,463
T2	11	26,2	13	30,2	13	29,5	
T3	11	26,2	10	23,3	16	36,4	
T4	15	35,7	18	41,9	14	31,8	
Estádio N#							
N0	25	58,1	19	44,2	25	58,1	0,326
N+	18	41,9	24	55,8	18	41,9	
TOTAL	43	100,0	44	100,0	44	100,0	

N: número de pacientes

p*: valor obtido pelo teste do qui-quadrado considerando-se nível de significância de 5%

#: excluídos os pacientes com informações ignoradas

APÊNDICE G – Correlação entre a intensidade da eosinofilia tecidual, tratamento e evolução dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Eosinofilia Tecidual Associada aos Tumores							
Variável	Discreta		Moderada		Intensa		p*
	N	%	N	%	N	%	
Esvaziamento							
Não esvaziado	06	14,0	02	4,5	03	6,8	0,341
Ipsilateral	24	55,8	21	47,7	24	54,5	
Ipsi e contralateral	13	30,2	21	47,7	17	38,6	
Radioterapia							
Sim	27	62,8	32	72,7	34	77,3	0,315
Não	16	37,2	12	27,3	10	22,7	
Recidiva Local							
Sim	10	23,3	09	20,5	11	25,0	0,877
Não	33	76,7	35	79,5	33	75,0	
Recidiva regional							
Sim	07	16,3	06	13,6	08	18,2	0,843
Não	36	83,7	38	86,4	36	81,8	
Metástase distância							
Sim	11	25,6	08	18,2	07	15,9	0,498
Não	32	74,4	36	81,8	37	84,1	
Segundo tumor							
Sim	05	11,6	08	18,2	09	20,5	0,521
Não	38	88,4	36	81,8	35	79,5	
TOTAL	43	100,0	44	100,0	44	100,0	

N: número de pacientes

p*: valor obtido pelo teste do qui-quadrado considerando-se nível de significância de 5%

#: excluídos os pacientes com informações ignoradas

APÊNDICE H – Correlação entre a intensidade da eosinofilia tecidual e a infiltração tumoral nos pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1984 a 2002.

Eosinofilia Tecidual Associada aos Tumores							
Variável	Discreta		Moderada		Intensa		p*
	N		N		N		
Embolização vascular[#]							
Ausente	29	74,4	30	68,2	30	69,8	0,817
Presente	10	25,6	14	31,8	13	30,2	
Infiltração perineural[#]							
Ausente	21	52,5	14	32,6	19	45,2	0,177
Presente	19	47,5	29	67,4	23	54,8	
Infiltração muscular[#]							
Ausente	01	5,9	0	0	0	0	0,285
Presente	16	94,1	22	100,0	20	100,0	
Infiltração óssea[#]							
Ausente	18	78,3	10	66,7	10	58,8	0,409
Presente	05	21,7	05	33,3	07	41,2	
Infiltração glandular[#]							
Ausente	15	75,0	12	57,1	14	63,6	0,480
Presente	05	25,0	09	42,9	08	36,4	
Margens cirúrgicas							
Livres	38	90,5	44	100,0	40	90,9	0,113
Comprometidas	04	9,5	0	0	04	9,1	
Comprometimento linfonodal^{##}							
pN0	14	36,8	22	51,2	19	46,3	0,425
pN+	24	63,2	21	48,8	22	53,7	
TOTAL	43	100,0	44	100,0	44	100,0	

N: número de pacientes

p*: valor obtido pelo teste do qui-quadrado considerando-se nível de significância de 5%

#: excluídos os pacientes com informações ignoradas

##: excluídos os pacientes não submetidos ao esvaziamento cervical

APÊNDICE I – Sobrevida global dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca, de acordo com a intensidade da eosinofilia tecidual. Porcentagem de sobrevida acumulada de acordo com a técnica de Kaplan-Meier.

APÊNDICE J – Sobrevida livre de doença dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca, de acordo com a intensidade da eosinofilia tecidual. Porcentagem de sobrevida acumulada de acordo com a técnica de Kaplan-Meier.

APÊNDICE K – Sobrevida específica por câncer dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca, de acordo com a intensidade da eosinofilia tecidual. Percentagem de sobrevida acumulada de acordo com a técnica de Kaplan-Meier.

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo referente ao projeto de pesquisa intitulado “Associação do polimorfismo do gene da proteína catiônica eosinofílica com a eosinofilia tecidual associada aos tumores em carcinomas espinocelulares de boca”.

Comitê de Ética em Pesquisa CEP

São Paulo, 14 de setembro de 2006.

À

Sra. Michele Conceição Pereira

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 810/06

“Associação do polimorfismo do gene da proteína catiônica eosinofílica com a eosinofilia tecidual associada aos tumores em carcinomas espinocelulares de boca”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer – A.C. Camargo, em sua última reunião de 29/08/2006, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 25/07/2006, **aprovaram** a realização do projeto em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- ✓ Folha de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos;
- ✓ Termo de Compromisso do Pesquisador, Patrocinador e Instituição responsável;
- ✓ Justificativa para não utilização do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- ✓ Justificativa de Orçamento;
- ✓ Declaração de Ciência do Departamento de Anatomia Patológica;
- ✓ Declaração de Ciência do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dra. Vilma Regina Martins
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

C.C.

Responsável na Instituição: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

ANEXO B – Aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo referente ao projeto de pesquisa intitulado “Epidemiologia molecular dos carcinomas de vias aéreas digestivas superiores”.

CENTRO DE TRATAMENTO E PESQUISA
HOSPITAL
DO CANCER

A. C. CAMARGO

São Paulo, 26 de julho de 2000.
DC-454/00frp

A

Sra. Inês Nobuko Nishimoto
At. Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

Ref: Projeto de Pesquisa nº 265/00

“Epidemiologia Molecular dos carcinomas de vias aerodigestivas superiores”.

Seu projeto de pesquisa, acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital do Câncer em sua última reunião de 25/07/2000. Os membros desta comissão aprovaram a realização deste estudo. Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhados à secretaria do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dr. Agnaldo Anelli
Presidente da Comissão de Ética em Pesquisa

COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP
Rua Prof. Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo – SP CEP 01509-900
PABX(0XX11)3272-5000 ramal 1117