



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM-FFOE
CURSO DE ODONTOLOGIA**

ALOÍSIO DE LIMA RIBEIRO JÚNIOR

**PAPEL DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO PROGNÓSTICO DO
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL**

**FORTALEZA
2018**

ALOÍSIO DE LIMA RIBEIRO JÚNIOR

PAPEL DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO PROGNÓSTICO DO
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Odontologia
da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção
da graduação no curso de
Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Bitu
Sousa

FORTALEZA
2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- R387p Ribeiro Júnior, Aloísio de Lima.
Papel de marcadores inflamatórios no prognóstico do Carcinoma de Células Escamosas Oral / Aloísio de Lima Ribeiro Júnior. – 2018.
46 f. : il. color.
- Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Curso de Odontologia, Fortaleza, 2018.
Orientação: Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa.
1. Neoplasias Bucais. 2. Inflamação. 3. Carcinoma de Células Escamosas. 4. Sobrevivência. 5. Fator de Necrose Tumoral Alfa. I. Título.

CDD 617.6

ALOÍSIO DE LIMA RIBEIRO JÚNIOR

PAPEL DE MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO PROGNÓSTICO DO
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de Odontologia
da Universidade Federal do Ceará,
como requisito parcial para obtenção
da graduação no curso de
Odontologia.

Aprovada em: 06/12/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa (orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Antônio Ernando Carlos Ferreira Junior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Me. Camila Carvalho de Oliveira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus, ao meu mentor espiritual e a toda comunidade de espíritos de luz que me guiaram e permitiram a oportunidade de cursar e finalizar um curso superior e todas as bênçãos durante esse ciclo.

A minha família, em especial às minhas mães. **Lêda**, minha mãe biológica, a pessoa que sempre lutou para que eu tivesse as melhores oportunidades de estudo e que me deu condições de cursar essa graduação integral me dedicando exclusivamente a este fim. À **Therezinha**, minha avó materna e segunda mãe, pelos anos dedicados à minha criação e de meus irmãos. À **Ana Lúcia** e **Leonardo**, meus irmãos, por todo carinho e palavras de apoio quando se fizeram necessários nos momentos difíceis dessa jornada.

Agradeço também ao meu orientador **Fabício Bitu Sousa**, pela grande oportunidade a mim concedida de fazer parte da equipe do programa de iniciação científica do Instituto do Câncer do Ceará, e sob sua orientação, desenvolver este trabalho e pesquisa científica. Agradeço pela confiança para que desempenhasse esse papel ao lado dos mesmos e todos os ensinamentos passados a mim durante essa jornada. À toda equipe da estômato-patologia, professores, doutorandos e mestrandos, em especial a **Thinali Dantas**, por todo auxílio e confiança durante o desenvolvimento deste trabalho e por todo aprendizado e conhecimento compartilhado.

Agradeço a banca avaliadora, composta por **Antônio Ernando Carlos Ferreira Júnior** e **Camila Carvalho de Oliveira** pelas grandes contribuições para o aperfeiçoamento de nosso trabalho por meio de suas valiosas considerações.

À todos os professores que compõem a Universidade Federal do Ceará, grandes mestres da Odontologia cearense e do Brasil, por todos os ensinamentos durante a graduação. Em especial, à equipe da disciplina de Prótese Fixa, área a qual desenvolvi grande paixão, nos nomes dos professores **Wagner, Karina, Marcelo** e **Materson**, por todo aprendizado durante o ano em que estive na monitoria. Também agradecer aos profissionais das mais diversas áreas que compõem essa instituição, dentre eles, **Rui, Carlinhos, Nunes, Malu** e **Soninha** (in memorian) pela simpatia, amizade e ajuda na rotina diária.

Aos meus amigos mais próximos e companheiros de graduação, **Lívia, Dannylo, Paulo, Kalil, Paula, Guilherme, Ana Laura, Emanuel, Leonardo, Olavo, Lucas** e **Carol** por todos os momentos felizes que compartilhamos nesses 5 anos e o grande laço de amizade que criamos. Obrigado por vibrarem sempre nas vitórias e todo o apoio nos momentos mais difíceis.

Ao Projeto de Extensão **NEPE** e toda equipe que o compõem, por um ano e meio a qual participei deste grupo e todas as oportunidades de crescimento científico, profissional e humano que a mim foram concedidos por meio das atividades desenvolvidas. Certamente esse projeto foi um divisor de águas na minha graduação e me possibilitou colher grandes frutos e conhecimento ao lado de grandes profissionais.

Ao Projeto **RONDON** e todos que já participaram e fazem parte dessa equipe, em especial aos meus amigos, **Eanes, Emanuel Martins, Luiz Natan, Debora Torquato, Yara, Pergentino, Pedro Fernandes, Rocharles, Keniesd** e **Dejamy** pela preceptoria e os ensinamentos durante as viagens, por me selecionarem para fazer parte dessa equipe, além de toda amizade durante os anos de convívio. Ao atual grupo que compõem esse projeto. A **Dra. Gressy** que coordenou tão bem esse grupo e o fez crescer durante seu período de gestão do projeto. Com toda certeza esse projeto de extensão influenciou positivamente a minha formação como um profissional e humano, me fazendo crescer imensamente durante os 3 anos a qual fiz parte.

Agradeço à minha dupla na faculdade, **Taíssa Alves**, por todo aprendizado mútuo durante a graduação e nos atendimentos clínicos, compartilhando todo conhecimento adquirido e contribuindo positivamente na minha formação e crescimento profissional.

À **Jaque** e **Rondinele**, e toda sua família, pelo enorme carinho e amizade durante esses cinco anos de graduação, sempre sendo muito receptivos e proporcionando momentos alegres mesmo nos dias mais difíceis.

À turma 143^a de Odontologia da Universidade Federal do Ceará, carinhosamente apelidada por nós de “odontosérios”, por toda união durante esse ciclo e todos os momentos de aprendizado que compartilhamos juntos.

E por fim, pela extrema importância que essa pessoa teve nesse período da minha vida, gostaria de agradecer e dedicar a vitória de concluir esse trabalho à **Mariana Muniz**, uma grande amiga e pessoa tão especial a qual pude compartilhar os melhores momentos da minha graduação, assim como os mais difíceis. Agradeço a ti por todo apoio nos piores momentos dessa jornada, sempre sendo meu porto e incentivando a me levantar e seguir; por toda alegria também nas vitórias e por toda contribuição e ajuda na minha formação profissional, e principalmente, em meu crescimento pessoal. Sou grato a ti por ter me apresentado a doutrina espírita, que me fez buscar ser melhor a cada dia. Foi um prazer e grande alegria compartilhar todos esses momentos contigo durante esses cinco anos e os quase três que tivemos de convivência íntima, você, certamente, tem grande impacto em quem sou hoje e nessa conquista.

RESUMO

Objetivo: Avaliar a imunomarcção de citocinas no carcinoma oral, em tecido de margem de ressecção cirúrgica (MRC) e linfonodos metastáticos, bem como seu papel no prognóstico do paciente. **Materiais e métodos:** Um estudo retrospectivo foi realizado em pacientes com carcinoma de células escamosas oral, e dados sociodemográficos e clínico-patológicos foram coletados. Além disso, a análise do sítio cirúrgico dos pacientes foi realizada por imuno-histoquímica, utilizando um microarranjo tecidual para marcadores inflamatórios (Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), Interleucina-1beta, Interleucina-6, Interleucina-10), transcrição Fator Nuclear-Kappa B (NF-kappa B) e CD68. A imunoexpressão foi avaliada semi-quantitativa e quantitativamente usando o software ImageJ®, e os dados foram correlacionados com os fatores prognósticos e taxas de sobrevivência dos pacientes. **Resultados:** Houve maior imunoexpressão das citocinas inflamatórias e CD68 na metástase tumoral primária e linfonodal do que na MRC. Em um modelo de regressão logística multinomial, pacientes com baixa escolaridade ($p = 0,041$) e um alto histoescore para TNF- α ($p = 0,021$) apresentaram sobrevivência de 15,64 (IC95% = 1,13-217,24) e 6,81 (IC95% = 1,02-105,96) pior que os pacientes dos demais grupos. **Conclusão:** Portanto, apesar do aumento da imunoexpressão das citocinas no tumor primário, apenas o TNF- α foi a citocina inflamatória que influenciou a sobrevivência de pacientes com câncer de boca, piorando o prognóstico e reduzindo a sobrevivência.

Palavras-chave

Neoplasias Buciais, Inflamação, Carcinoma de Células Escamosas, Sobrevivência, Fator de Necrose Tumoral alfa

ABSTRACT

Objective: This study evaluated the immunostaining of cytokines in oral carcinoma, in tissue of margin of surgical resectate (MSR) and metastatic lymph nodes, as well as their role in patient prognosis. **Study Design:** A retrospective study was carried out in patients with oral squamous cell carcinomas, and sociodemographic and clinical-pathological data were evaluated. In addition, surgical site analysis of the patients was conducted by immunohistochemistry, using a tissue microarray for inflammatory (Tumor Necrosis Factor-alpha, Interleukin-1beta, Interleukin-6, interleukin-10), transcription NF-kappa B and CD68 markers. Immunoexpression was assessed qualitatively and quantitatively using ImageJ software, and data were correlated with the prognostic factors and patient survival rates. **Results:** There was a greater immunoexpression of inflammatory and CD68 cytokines in primary tumour and lymph node metastasis than in MSR. In a multinomial logistic regression model, patients with low education ($p = 0.041$) and a high histoscore for TNF- α ($p = 0.021$) showed a survival rate of 15.64 (95% CI = 1.13-217.24) and 6.81 (95% CI = 1.02-105.96). **Conclusion:** Therefore, despite there is an increased immunoexpression of cytokines in the primary tumour, only TNF- α was the inflammatory cytokine that influenced the survival of patients with oral cancer.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	08
2. MATERIAIS E MÉTODOS	09
2.1. Desenho do estudo	
2.2. Cálculo do tamanho da amostra	
2.3. TMA e Imuno-histoquímica	
2.4. Análise Imuno-histoquímica	
2.5. Abordagens estatísticas	
2.6. Correlações éticas	
3. RESULTADOS	13
3.1. Dados clínico-patológicos e sobrevida em 5 anos do CEC	
3.2. Dados sociodemográficos e sobrevida em 5 anos do CEC	
3.3. Perfil imunohistoquímico para marcadores inflamatórios em CEC, metástase linfonodal e epitélio escamoso de margem de ressecção cirúrgica	
3.4. Análise multivariada e inter-relação entre variáveis prognósticas de sobrevida	
4. DISCUSSÃO	16
5. REFERÊNCIAS	20
6. ANEXOS	24

Artigo em formato especial para submissão na Revista Oral Diseases. Normas de formatação vide anexos.

1. INTRODUÇÃO

O câncer bucal é uma doença preocupante; tem alta incidência e mortalidade e é uma causa significativa de morte em todo o mundo (1). O carcinoma de células escamosas (CEC) é o tipo histológico mais prevalente na cavidade oral e representa aproximadamente 95% das malignidades da boca e um terço das neoplasias malignas na cabeça e pescoço (2).

O carcinoma de células escamosas oral é resultado da exposição crônica a carcinógenos e evolui a partir de uma série de alterações genéticas e epigenéticas (3). Neste contexto, a inflamação tem mostrado ter um papel importante nos campos de malignização, crescimento tumoral, invasão local, angiogênese e metástase. Embora a maioria desses mediadores seja produzida para ativar o sistema imunológico contra o tumor, eles podem estimular o crescimento tumoral (4).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e numerosas citocinas, como a interleucina 1 beta (IL-1 β), 6 (IL-6) e 10 (IL-10), estão associadas à ativação do ciclo celular, levando à progressão tumoral e ao desenvolvimento de metástases (5, 6). A interação entre o estroma e o parênquima tumoral é essencial para a progressão do câncer e pode modificar o prognóstico, sendo alvo de novas abordagens na terapia do câncer (7). Nos linfonodos, a superprodução natural de citocinas pode alterar o comportamento da neoplasia (7).

Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a imunomarcagem de citocinas no Carcinoma de células escamosas de Boca, em tecido de margem de ressecção cirúrgica (MRC) e linfonodos metastáticos e o papel dessas citocinas no prognóstico e sobrevida dos pacientes.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Desenho do estudo

Este estudo retrospectivo transversal avaliou 76 pacientes com Carcinoma de Células Escamosas em cavidade oral, de acordo com o cálculo do tamanho da amostra abaixo. Foram selecionados pacientes com CEC de boca diagnosticados e tratados entre os anos de 2011 a 2016 no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará), que tivessem prontuários médicos completos, lâminas histológicas e blocos de parafina com material suficiente e em bom estado.

Dados sobre fatores clínicos como sexo, idade, localização e tamanho do tumor, metástase linfonodal, metástase à distância, estágio de gradação histológica e tratamento foram coletados. Além disso, dados sócio-demográficos como etnia, procedência do paciente, estado civil, exposição ao tabagismo e à bebida alcoólica e grau de escolaridade foram avaliados. A taxa de sobrevivência em 5 anos foi calculada por meio da diferença entre a data do início do tratamento e data de óbito.

2.2. Cálculo do Tamanho da Amostra

O cálculo amostral foi realizado tendo como base o estudo de Piva et al. (8), que demonstrou que o número de CECs moderadamente/pobrementemente diferenciados que apresentavam alta expressão de TNF- α nas células tumorais (45,8%) era superior aos casos bem diferenciados (18,2%), estimando-se necessária uma amostra de 66 casos de CEC, a fim de se obter um resultado que represente com 95% de confiança e 90% de poder a hipótese de que o perfil inflamatório modifica ou é modificado pelo parênquima tumoral (método de Fleiss com correção de continuidade). Tendo em vista a possibilidade de perda de amostra, acresceu-se 15% de dados, elevando o total para 76 pacientes.

2.3. TMA e imuno-histoquímica

Após a revisão de todas as lâminas histológicas, foram selecionadas as que representassem: uma área da peça cirúrgica com microambiente tumoral adequado que representasse de maneira satisfatória todo o tumor; epitélio

escamoso não lesional, além da margem de ressecção cirúrgica. Para pacientes que apresentassem acometimento linfonodal, também foi selecionada uma lâmina que representasse essa metástase (9).

Após a seleção das lâminas, seus respectivos blocos (bloco doador) foram levantados para a confecção do bloco de TMA (bloco receptor).

Para a técnica de TMA, um dispositivo técnico chamado “*tissue microarray*” (Quick-Ray UNITMA®) foi utilizado. Com esse dispositivo, puncionou-se um fragmento de tecido com 2 mm de diâmetro, com maior representatividade do bloco doador e transferiu-se, de maneira ordenada, para o bloco receptor que apresentava um padrão de matriz precisamente espaçada.

Após a desparafinização e a reidratação, os cortes teciduais foram submetidos à avaliação imuno-histoquímica. A recuperação antigênica foi realizada por aquecimento em solução de citrato a pH 6,0. Após o resfriamento, as lâminas foram submetidas ao bloqueio da peroxidase com solução de H₂O₂ a 3% diluída em PBS (solução salina tamponada com fosfato), ou com solução de metanol, de acordo com a especificidade do anticorpo (30 min).

Após o bloqueio proteico (albumina) (1 h), realizamos a incubação durante a noite com o anticorpo primário CD68 (1: 100, Abcam®, Cambridge, UK), TNF- α (1: 100, Abcam®), IL-1 β (1: 150, Abcam®), IL-6 (1: 300, Abcam®), IL-10 (1: 100, Abcam®) e NF- κ B (1: 200, Abcam®).

Utilizou-se o Polímero Universal de Imuno-Peroxidase (anti-murganho e anti-coelho) (Histofin, Nicherei, Tokyo, Japan) para a incubação de anticorpos secundários. O sistema de visualização utilizado foi 5,5 tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB) (Abcam®). No controle negativo, o anticorpo primário foi suprimido.

2.4. Análise Imuno-histoquímica

Para avaliação microscópica, foram fotografados cinco campos aleatórios por corte histológico em um aumento de 400x por meio de um microscópio com câmera acoplada (Leica DM 2000®). As amostras passaram tanto por uma avaliação semi-quantitativa categórica como quantitativa (10).

Na avaliação semi-quantitativa, foram determinados escores para a intensidade de coloração: 0 quando não havia coloração; 1, para marcação leve; 2, moderada; e 3, intensa. Para amostras que apresentavam mais de uma intensidade, foi considerado o maior escore.

Na avaliação quantitativa, as imagens foram exportadas para o software ImageJ® e, por meio do comando *cell counter*, foi determinada a porcentagem de células tumorais marcadas e não marcadas em áreas representativas de tumor e metástase linfonodal, e a porcentagem de células epiteliais marcadas e não marcadas em áreas perilesionais. Essa porcentagem foi categorizada de 1 a 4: 1, quando 0-25% das células eram positivas; 2, quando 26%-50% das células eram positivas; 3, quando 51%-75% das células eram positivas; e 4, quando 76%-100% das células eram positivas.

Para fins estatísticos, foram determinados histocores utilizando a multiplicação entre os escores de intensidade e a porcentagem de marcação. Obteve-se então: 0-4, marcação negativa ou leve; 5-8, marcação moderada; e 9-12, marcação intensa.

2.5. Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa estatístico SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) para Windows versão 22.0, com nível de confiança de 95% ($p < 0,05$). Os dados categóricos (frequência absoluta e percentual) foram analisados por meio do teste qui-quadrado. A taxa de sobrevida em 5 anos também foi demonstrada e analisada, e a média e o desvio padrão foram calculados e analisados pelo teste de Log-Rank Mantel-Cox. Os histocores foram apresentados como desvio padrão e comparados por meio do teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis / Dunn. Um modelo forward stepwise foi utilizado para selecionar as variáveis que apresentaram $p < 0,200$ com as taxas de mortalidade para regressão logística multinomial. Os resultados foram expressos em forma de hazard risk ajusted e a um intervalo de confiança de 95%.

3. RESULTADOS

3.1. Dados clínico-patológicos e sobrevida em 5 anos do CEC

Dos 76 pacientes avaliados neste estudo, a maioria era do sexo masculino (n = 50, 65,8%), tinha mais de 60 anos (n = 43, 56,6%) e tinha tumores no assoalho da boca (n = 35, 46,1%). A sobrevida em 5 anos foi de 86,6% (n = 66) e a sobrevida média foi de 49,11 ± 25,13 meses; estas taxas não foram influenciadas pelo sexo, idade ou localização do tumor (Tabela 1).

Os tumores T3 / T4 (n = 47, 61,8%) e N0 / 1 (n = 50, 65,8%) foram os mais prevalentes. A metástase foi demonstrada em apenas 2 casos. Os tumores T3 / T4 apresentaram menor sobrevida (p = 0,011) e menor média de sobrevida (p = 0,032). Metástase linfonodal e metástase à distância não influenciaram a sobrevida (Tabela 1).

O estágio que mais prevaleceu foi o III / IV (n = 60, 78,9%), a gradação histológica mais prevalente foi o carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado (n = 71, 93,4%), e a abordagem terapêutica mais utilizada foi cirurgia e radioterapia ou cirurgia, radioterapia e quimioterapia (n = 32, 43,2%). O estágio e a gradação histológica não influenciaram a sobrevida, mas os casos tratados apenas com cirurgia apresentaram sobrevida superior aos submetidos aos tratamentos combinados (p = 0,010) (Tabela 1).

3.2. Dados sociodemográficos e sobrevida em 5 anos do CEC

Dos 76 pacientes avaliados neste estudo, a maioria dos pacientes era analfabeta ou tinha ensino fundamental incompleto (n = 39, 51,3%), eram pardos (n = 61, 80,3%), procedentes de áreas rurais do estado (n = 51, 67,1%), eram casados (n = 55, 72,4%) e tabagistas (n = 30, 39,5%). Apenas o nível de escolaridade influenciou significativamente a sobrevida; os pacientes que eram analfabetos ou com ensino fundamental incompleto apresentaram menores taxas de sobrevida (p = 0,014) (Tabela 1).

3.3. Perfil imunohistoquímico para marcadores inflamatórios em CEC, metástase linfonodal e epitélio escamoso de margem de ressecamento cirúrgico

As células CD68 mononucleares positivas foram significativamente maiores no tecido conjuntivo do tumor do que no tecido de margem de ressecção cirúrgica e nas metástases linfonodais ($p < 0,001$) (Figura 2). As amostras de metástases linfonodais apresentaram significativamente mais células CD68 mononucleares positivas do que o tecido de margem de ressecção cirúrgica ($p < 0,001$) (Figura 2).

A imunomarcação de NF-kB, IL-1 β , IL-6 e IL-10 foi significativamente maior em tumor e metástases linfonodais do que no epitélio escamoso da margem de ressecção cirúrgica ($p < 0,001$), e a imunomarcação de TNF- α foi significativamente maior no tumor do que na metástase linfonodal e no epitélio escamoso da margem de ressecção cirúrgica ($p < 0,001$).

3.4. Perfil imunohistoquímico para marcadores inflamatórios no CEC, metástase linfonodal e epitélio escamoso de margem de ressecamento cirúrgico e sobrevida em 5 anos

A imunoeexpressão de NF-kB, IL-1 β , IL-6 ou IL-10 e células CD68 mononucleares positivas em pacientes vivos não diferiu no epitélio escamoso da margem de ressecção cirúrgica, tumor ou metástase linfonodal quando comparado com o de pacientes falecidos. No entanto, pacientes que vieram ao óbito nos últimos 5 anos apresentaram uma maior imunomarcação de TNF- α em tumores ($p = 0,032$) e metástases linfonodais ($p = 0,009$) em comparação com pacientes vivos (Tabela 2).

3.5. Análise multivariada e inter-relação entre variáveis prognósticas de sobrevida

O modelo de regressão logística multinomial mostrou que os pacientes com baixa escolaridade ($p = 0,041$, HR = 15,64, IC95% = 1,13 - 217,24) e alta imunomarcação de TNF- α ($p = 0,021$, HR = 6,81, IC95% = 1,02 -

105,96) tiveram menor sobrevida. Quando agrupados, os pacientes com baixa escolaridade e/ou alta imunomarcção de TNF- α apresentaram menores taxas de sobrevida ($p = 0,003$, HR = 8,16, IC95% = 1,87 - 35,62) e menor sobrevida média ($p = 0,005$) do que os demais pacientes.

A baixa imunomarcção de TNF- α em pacientes não foi associada ao estágio e nível de escolaridade ($p = 1,000$). No entanto, nos pacientes imunocomprometidos com TNF- α mais elevados, os estágios III / IV foram mais prevalentes naqueles com baixa escolaridade ($p = 0,033$, HR = 5,61, IC95% = 1,21 - 25,76). Além disso, os pacientes com maior imunomarcção de TNF- α e menor escolaridade foram 3,82 vezes (IC95% = 1,24 - 11,8) (Tabela 3) mais tratados com cirurgia, radioterapia e quimioterapia, e não somente com cirurgia ($p = 0,026$) (Tabela 4) (Figura 3).

4. DISCUSSÃO

O Câncer de boca está fortemente associado à exposição a fatores de risco e a fatores sociodemográficos (9), mas é necessário investigar o papel dos componentes biológicos do tumor, pois os fatores clínicos isoladamente não conseguem explicar o prognóstico dos pacientes com Carcinoma de Células Escamosas Oral (11).

Neste estudo, os dados clínicos mostraram uma alta prevalência de homens com menos de 60 anos de idade, uma idade incomum em estudos epidemiológicos (9-12). A localização tumoral mais prevalente foi no assoalho de boca e língua (12,13), os estágios mais frequentes foram III / IV (3) e o principal fator de risco foi o tabagismo (14).

O processo inflamatório é vital para os mamíferos, atuando como protetor contra agentes infecciosos, lesões traumáticas e desenvolvimento de câncer. O reconhecimento de lesões por microrganismos, trauma ou crescimento desordenado de tecidos leva à produção de muitos mediadores inflamatórios, como as citocinas (5). No entanto, em processos crônicos, cria-se um microambiente patologicamente favorável, promovendo o desenvolvimento de uma série de doenças e contribuindo para a progressão tumoral (14-15).

Além de fatores clínico-epidemiológicos, mostramos o perfil da imunoexpressão de citocinas inflamatórias no tumor, perilesões e metástases no linfonodo e observamos que, em geral, a imunoexpressão dessas citocinas é maior no tumor primário ou nas metástases linfonodais do que na margem de ressecção cirúrgica. Resultado semelhante tem sido demonstrado na literatura, embora o papel dessas citocinas ainda não tenham sido completamente elucidados (16).

Em nosso estudo, não observamos alteração no perfil de imunoexpressão das citocinas inflamatórias do tumor primário para a metástase linfonodal, mostrando que, após a malignização, a imunoexpressão de mediadores inflamatórios aumenta em relação à sítios peritumorais e permanece em nível semelhante quando há metástase para o nódulo linfático. Estudos mostraram que citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6 e TNF- α , produzidas

pelas próprias células malignas, estão associadas ao aumento da motilidade dos queratinócitos e, conseqüentemente, à metástase nodal (4).

A IL-10, uma citocina anti-inflamatória, tem sido correlacionada com a atividade antitumoral em alguns estudos (6), não apenas no carcinoma de células escamosas oral, mas também em outros tumores, como os carcinomas de mama e ovário (17). Em nosso estudo, a IL-10 não foi associada a um melhor prognóstico, embora sua imunoexpressão seja prevalente no tecido tumoral e metástase no linfonodo, como descrito anteriormente (18).

Além da caracterização de citocinas, a infiltração de células imunológicas tem sido utilizada para avaliar o prognóstico de malignidades (19). Nosso estudo mostra células CD68-positivas, um marcador que tem sido usado como um marcador pan-macrófago (20), mais presente em tumores primários e metástases em linfonodos do que em margem de ressecção cirúrgica, como descrito anteriormente (21). Embora isso não esteja associado a melhor ou pior prognóstico, um resultado semelhante foi encontrado no estudo de Fang et al. (19). Talvez a diferenciação fenotípica de macrófagos, M1 ou M2, seja necessária para melhor avaliar o papel das citocinas na progressão do carcinoma de células escamosas.

Mostramos que o perfil de algumas citocinas pró-inflamatórias da resposta imune inata está aumentado na metástase tumoral ou linfonodal, quando comparado ao epitélio escamoso da margem de ressecção cirúrgica, o que também foi demonstrado (4). Apesar do papel desses mediadores não estar claro, o aumento da expressão de marcadores inflamatórios tem sido demonstrado na literatura (16). Em 2001, Balkwill (4) demonstrou que células inflamatórias e citocinas no estroma peritumoral contribuem mais para a progressão e desenvolvimento do tumor do que para a resposta imune do hospedeiro e que a ativação de macrófagos pode levar a mais dano ao DNA, supressão gênica antineoplásica, angiogênese e destruição local (4). Em apoio a esses dados, em nosso estudo, os pacientes com alto TNF- α demonstraram menor sobrevida. O TNF- α está envolvido tanto na carcinogênese quanto na progressão tumoral, auxiliando na angiogênese e invasão tumoral (6).

Esse microambiente inflamatório leva à migração de macrófagos e produção de espécies reativas de oxigênio, levando à metástase em linfonodos (25). A ativação autócrina do TNF- α está associada ao crescimento tumoral (6) por meio de mecanismos como o aumento da proliferação celular dependente da ativação do NF- κ B (26); redução de genes supressores de tumor de apoptose e inativação (10); aumento da síntese de metaloproteinases de matriz, que está intimamente relacionada com a invasão local e a distância das células malignas (27); indução de metástase e angiogênese (28); e expressão aumentada em células endoteliais de proteínas que medeiam a adesão de VCAM-1 (moléculas de adesão de célula vascular-1) (29). Esse crescimento tumoral resulta em um maior estadiamento do tumor que está ligado a pior prognóstico e maior mortalidade (14).

Um estudo anterior realizado pelo presente grupo de pesquisadores (8) também observou que a escolaridade influencia diretamente a sobrevida do paciente. Observou-se, também, em concordância ao dados apresentados, que pacientes com baixa escolaridade e alta imunoexpressão para TNF- α apresentaram pior sobrevida, além de maior estadiamento e uso de cirurgia associada à radioterapia e quimioterapia como tratamento de escolha (24 30). Em estudos anteriores, pacientes com tumores de estágio III e IV expressaram mais TNF- α ; no país dos pesquisadores, pacientes com estágio avançado da doença são pacientes com baixa escolaridade (7).

Em termos das limitações deste trabalho, não podemos demonstrar por quais mecanismos o TNF- α atua sobre a progressão do tumor e o consequente aumento na mortalidade desses pacientes.

Em conclusão, este trabalho mostra que há uma imunoexpressão aumentada de citocinas e macrófagos inflamatórios no tumor primário em relação à margem de ressecção cirúrgica, mas sem maiores alterações nas metástases para os linfonodos. Também demonstramos que o TNF- α , como citocina inflamatória que influencia diretamente na sobrevida de pacientes com câncer de boca, deve ser considerado para estudos futuros, possivelmente se mostrando um preditor de prognóstico do carcinoma de células escamosas. Este estudo, juntamente com outros, também pode verificar o perfil social por trás do

pior prognóstico dessa neoplasia. Portanto, levando em consideração que pacientes com baixa escolaridade apresentam menor sobrevida, mostramos que existe uma necessidade fundamental de intervenção em políticas públicas de saúde em populações com esse perfil.

5. REFERÊNCIAS

1. Scully C. Oral cancer: evidence for sexual transmission. *BDJ*. 2005; 199: 203-207.
2. Brasil, Câncer IN, Silva JAG. Estimativa 2014, Incidência de câncer no Brasil. *Rev Bras Canc*. 2016; 60-63.
3. Durazzo, MD, Araujo CEN, Brandão Neto JS, Potenza AS, Costa P, Takeda F, et al. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: increasing incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastases. *Clinics*. 2005; 60:293-298.
4. Balkwill F., Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *The lancet*. 2001; 9255: 539-545.
5. Lin WW., Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *J Clin Invest*. 2007; 117: 1175-1183.
6. Eiró N, González L, González LO, Fernandez-Garcia B, Lamelas ML, Marín L, et al. Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. *PLoS Curr*. 2012; 11: e49047.
7. Dantas TS, de Barros Silva PG, Sousa EF, da Cunha M do P, de Aguiar AS, Costa FW, et al. Influence of Educational Level, Stage, and Histological Type on Survival of Oral Cancer in a Brazilian Population: A Retrospective Study of 10 Years Observation. *Medicine*. 2006; 3:2314.
8. Piva MR, DE Souza LB, Martins-Filho PR, Nonaka CF, DE Santana Santos T, DE Souza Andrade ES, et al. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part II): CD8, FOXP3, TNF- α , TGF- β and NF- κ B expression. *Oncol Lett*. 2013; 6:1909-1914.
9. Liu F, He Y, Cao Q, Liu N, Zhang W. TBL1XR1 Is Highly Expressed in Gastric Cancer and Predicts Poor Prognosis. *Dis Markers*. 2016.
10. Zhang J, Muller JF, Mcdonald A.J. Mu opioid receptor localization in the basolateral amygdala: an ultrastructural analysis. *Neuroscience*. 2015; 303: 352–363.

11. Heo K, Kim YH, Sung HJ, Li HY, Yoo CW, Kim JY, et al. Hypoxia-induced up-regulation of apelin is associated with a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol.* 2012; 6: 500-506.
12. Odveig GR, Bjerkli IH, Uhlin-Hansen L, Hadler-Olsen E, Steigen SE. Clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma in Northern Norway: a retrospective study. *BMC Oral Health.* 2014; 103: 2-9.
13. Satochi S, Sawai NY, Kishino M, Ishihama K, Minami M, Okura M. Risk Factors for Distant Metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 71:1291-1297.
14. Iamaroon A, Pattanaporn K, Pongsiriwet S, Wanachantararak S, Prapayasatok S, Jittidecharaks S, et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33: 84-88.
15. Sales MPU, De Figueiredo, MRF De Oliveira MI, De Castro HN. Ambulatório de apoio ao tabagista no Ceará: perfil dos pacientes e fatores associados ao sucesso terapêutico. *J Bra Pneumol.* 2006; 32: 410-417.
16. Allen CT, Ricker JL, Chen Z, Van Waes C. Role of activated nuclear factor-kappaB in the pathogenesis and therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck.* 2007; 10: 959-971.
17. Ranelletti FO, Almadori G, Rocca B, Ferrandina G, Ciabattini G, Habib A, et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2001; 95: 343-349
18. Arantes DAC, Costa NL, Mendonça EF, Silva TA, Batista AC. Overexpression of immunosuppressive cytokines is associated with poorer clinical stage of oral squamous cell carcinoma. *Arch Oral Biolog.* 2016; 61: 28-35.
19. Fang J, Li X, Ma D, Liu X, Chen Y, Wang Y, et al. Prognostic significance of tumor infiltrating immune cells in oral squamous cell carcinoma. *BMC Cance.*, 2017; 17: 375-384. Arun P, Brown MS, Ehsanian R, Chen Z, Van Waes C. Nuclear NF- κ B p65 phosphorylation at Serine 276 by protein kinase A contributes to the malignant phenotype of head and neck cancer. *Clinic Cancer Res.* 2009;19: 5974–5984.

20. Arun P, Brown MS, Ehsanian R, Chen Z, Van Waes C. Nuclear NF- κ B p65 phosphorylation at Serine 276 by protein kinase A contributes to the malignant phenotype of head and neck cancer. *Clinic Cancer Res.* 2009;19: 5974–5984.
21. Medrek C, Pontén F, Jirström K, Leandersson K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *Bmc Cancer.* 2012; 12:306.
22. Ni Y, Ding L, Huang X, Dong Y, Hu Q, Hou Y. Microlocalization of CD68+ tumor-associated macrophages in tumor stroma correlated with poor clinical outcomes in oral squamous cell carcinoma patients. *Tumor Biol.* 2015; 7:5291-5298.
23. Chan LP1, Chou TH, Ding HY, Chen PR, Chiang FY, Kuo PL, et al. Apigenin induces apoptosis via tumor necrosis factor receptor- and Bcl-2-mediated pathway and enhances susceptibility of head and neck squamous cell carcinoma to 5-fluorouracil and cisplatin. *Biochim et Biophys Acta.* 2012; 1820:1081–1091.
24. Popa C, Netea MG, van Riel PL, Van Der Meer JW, Stalenhoef AF. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *J Lipid Res.* 2007; 48: 751-762.
25. León X, Bothe C, García J, Parreño M, Alcolea S, Quer M, Vila L, et al. Expression of IL-1 α correlates with distant metastasis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget.* 2015; 35:37398-409.
26. Lind MH, Rozell B, Wallin RPA, Hogerlinden MV, Ljunggren H, Toftgard R. Tumor necrosis factor receptor 1-mediated signaling is required for skin cancer development induced by NF- κ B inhibition. *Proc Natl Acad Sci.* 2004; 14:4972-4977.
27. Tang D, Tao D, Fang Y, Deng C, Xu Q, Zhou J. TNF-Alpha Promotes Invasion and Metastasis via NF-Kappa B Pathway in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Med Sci Monit Basic Res.* 2017; 23:141-149.
28. Sundelin K, Roberg K, Grenman R, Hakansson L. Effects of cytokines on matrix metalloproteinase expression in oral squamous cell carcinoma in vitro. *Acta Otolaryngol.* 2005; 7: 765-773.

29. Yang Y, Ge J, Zhou Z. Effects of thalidomide on DMBA-induced oral carcinogenesis in hamster with respect to angiogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2009; 5:455-462.
30. Viac J, Schmitt D, Claudy A. Expression of adhesion receptors in epidermal tumors: correlation with TNF alpha expressing cells. *Anticancer Re.,* 1994; 2: 551-555.

Conflitos de interesse: nenhum a declarar.

ANEXOS

Figuras:

Figura 1: Painel Histopatológico

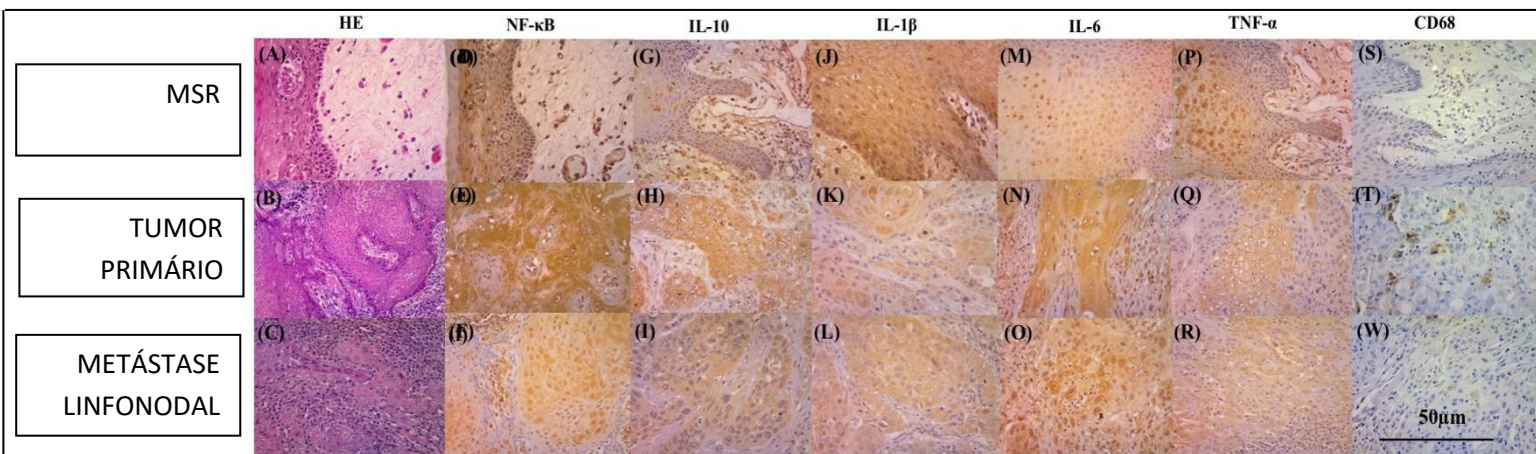


Figura 2: Perfil da imunopressão de marcadores inflamatórios em tumores primários. MSR e metástase em linfonodos de CEC de pacientes tratados no Hospital Haroldo Juaçaba (Ceará Cancer Institute).

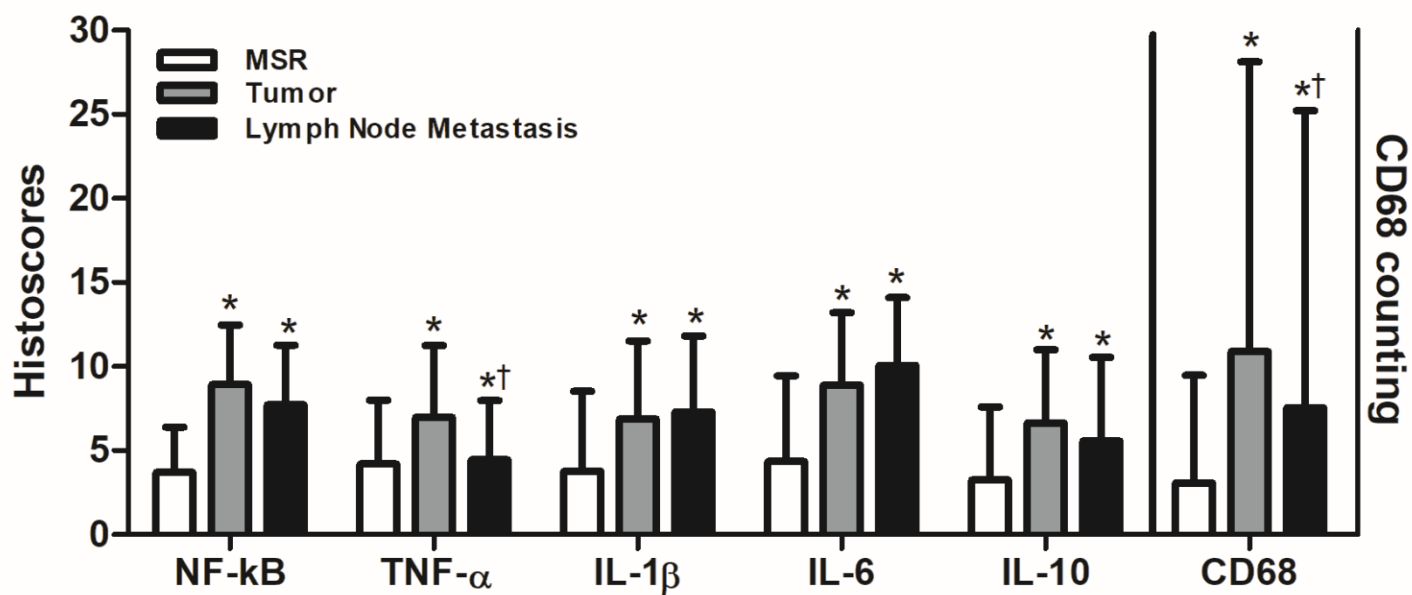
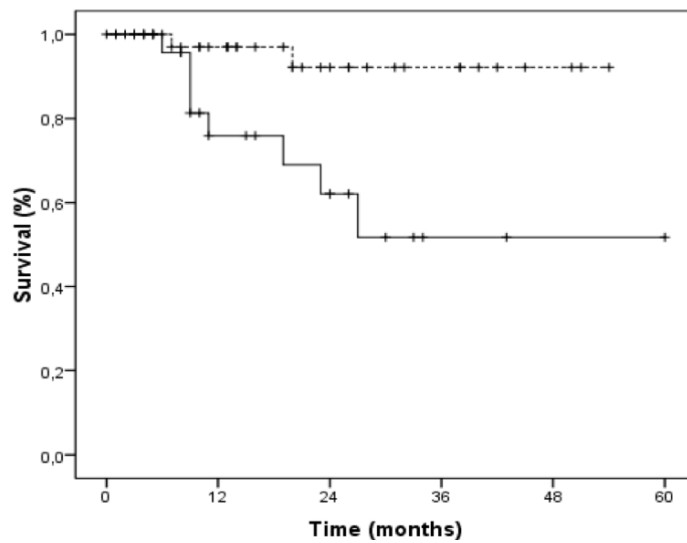
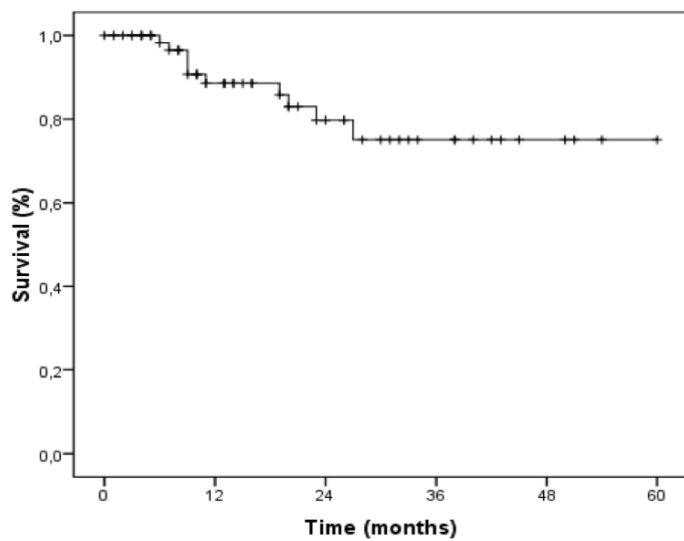


Figura 3: Curva de sobrevivência dos pacientes com CEC tratados no Hospital Haroldo Juaçaba (Ceará Cancer Institute).



Legendas de figuras:

Legenda figura 1: Aspectos microscópicos da MSR (A), tumor primário (B) e metástase linfonodal (C) de pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba, e perfil histoquímico para NF- κ B (D, E e F), IL-10 (G, H e I), IL-1 (J, K e L), IL-6 (M, N e O), TNF- α (P, Q e R) e CD68 (S, T e W).

Legenda figura 2: * $p < 0,05$ versus MSR. † $p < 0,05$ versus tumor; Teste de Kruskal-Wallis / Wilcoxon (média \pm DP).

Legenda figura 3: Pacientes com histocorse de TNF- α em tumor superior a 6 e com baixo grau de escolaridade (Full line), além de outros grupos (linha tracejada) ($p = 0,003$, teste Qui-quadrado; $p = 0,005$ teste de Mantel-Cox).

Tabelas:**Tabela 1:** Perfil sociodemográfico, clínico-patológico e sobrevida em 5 anos dos pacientes com diagnóstico de câncer de boca no Hospital Haroldo Juaçaba (2011-2016).

	Amostra		5-anos de sobrevida		p-valor ^a	Tempo de sobrevida (meses)	p-valor ^b
	N	%	N	%			
STATUS DE SOBREVIDA	66	86.8	-	-	-	49.11±25.13	-
PERFIL CLÍNICO E PATOLÓGICO							
Sexo							
Masculino	50	65.8	41	82.0%	0.150	39.45±21.37	0.140
Feminino	26	34.2	25	96.2%		55.89±19.76	
Idade							
Até 60 anos	43	56.6	36	83.7%	0.499	42.28±25.33	0.356
Mais de 60 anos	33	43.4	30	90.9%		52.28±23.53	
Localização							
Assoalho da boca	35	46.1	28	80.0%	0.182	35.36±18.54	0.291
Língua	26	34.2	25	96.2%		49.00±23.60	
Outros	15	19.7	13	86.7%		52.35±18.80	
T							
T1/2	29	38.2	29	100.0%	0.011	55.00±10.77	0.032

T3/4	47	61.8	37	78.7%		44.94±27.47	
N							
N0/1	50	65.8	46	92.0%	0.065	52.49±25.39	0.151
N2/3	26	34.2	20	76.9%		37.60±21.11	
M							
M0	74	97.4	65	87.8%	0.247	49.60±27.00	0.297
M1	2	2.6	1	50.0%		23.50±14.50	
Estádio							
Estádio 1 e 2	16	21.1	16	100.0%	0.080	52.49±14.37	0.125
Estádio 3 e 4	60	78.9	50	83.3%		46.92±27.85	
Gradação Histológica							
Moderadamente diferenciado	71	93.4	62	87.3%	0.516	49.67±26.27	0.641
Pobrememente diferenciado	5	6.6	4	80.0%		23.00±10.00	
Tratamento							
Cirurgia	10	13.5	10	100.0%	0.037	56.10±6.64	0.074
Cirurgia + RT	32	43.2	30	93.8%		55.38±17.66	
Cirurgia + RT + QT	32	43.2	24	75.0%		36.48±23.37	
FATORES SOCIODEMOGRÁFICOS							
Instrução							
Analfabeto/1º grau incompleto	39	51.3	30	76.9%	0.014	44.44±27.07	0.062

1º grau/ 2º grau/ Superior	37	48.7	36	97.3%		51.76±13.29	
Convênio							
Sistema público de saúde	73	96.1	63	86.3%	1.000	48.11±28.80	1.000
Sistema privado de saúde	3	3.9	3	100.0%		48.00±7.21	
Raça							
Pardo	61	80.3	53	86.9%	1.000	42.14±21.78	0.680
Não-pardo	15	19.7	13	86.7%		50.36±23.36	
Procedência							
Capital	25	32.9	21	84.0%	0.608	47.40±26.93	0.752
Interior	51	67.1	45	88.2%		43.40±20.15	
Estado civil							
Com vínculo matrimonial	55	72.4	49	89.1%	0.449	45.29±23.96	0.470
Sem vínculo matrimonial	21	27.6	17	81.0%		46.29±26.89	
Hábitos							
Fuma	30	39.5	28	93.3%	0.341	45.40±16.79	0.483
Fuma e bebe	21	27.6	18	85.7%		44.75±22.01	
Não fuma/bebe	25	32.9	20	80.0%		44.42±28.75	

Tabela 2: Influência do perfil de imunexpressão dos marcadores inflamatórios no tumor primário perilesão e metástase linfonodal na taxa de óbito em pacientes com CEC de boca tratados no Hospital Haroldo Juaçaba (Ceará Cancer Institute).

	Vivo	Óbito	p-Valor
Contagem de CD68			
MSR	3.26±6.81	1.88±3.23	0.642
Tumor	10.90±16.95	10.80±19.80	0.676
Metástase Linfonodal	4.90±12.22	15.43±28.45	0.346
Histoscores			
NF-kB			
MSR	3.81±2.82	2.88±1.36	0.731
Tumor	9.11±3.44	7.70±4.16	0.275
Metástase linfonodal	7.67±3.66	8.00±3.27	0.890
TNF-α			
MSR	4.21±3.93	4.10±3.14	0.801
Tumor	6.55±4.21	9.60±3.86*	0.032
Metástase linfonodal	3.78±3.19	9.00±2.00*	0.009
IL-1β			
MSR	3.76±4.72	3.78±5.14	0.948

Tumor	6.56±4.61	8.80±4.54	0.438
Metástase linfonodal	7.00±4.33	9.00±6.00	0.409

IL-6

MSR	4.23±5.20	5.00±4.55	0.691
Tumor	8.86±4.34	9.00±4.35	0.950
Metástase linfonodal	9.63±4.33	12.00±.00	0.235

IL-10

MSR	3.43±4.32	2.10±4.48	0.356
Tumor	6.74±4.45	5.90±3.93	0.628
Metástase linfonodal	5.86±4.91	3.50±5.69	0.281

*p<0.05. Teste Mann-Whitney (mean ± SD).

Tabela 3: Inter-relação entre as variáveis prognósticas de sobrevida e o estadiamento dos pacientes com CEC tratados no Hospital Haroldo Juaçaba (Ceará Cancer Institute).

Estádio	↓ TNF- α			↑ TNF- α		
	I/II	III/IV	p-Valor	I/II	III/IV	p-Valor
Instrução						
Analfabeto/1 ^o grau incompleto	2	13	1.000	3	21*	0.033
	40.0%	46.4%		27.3%	67.7%	
1 ^o grau/ 2 ^o grau	3	15		8*	10	
Superior	60.0%	53.6%		72.7%	32.3%	

*p<0.05. teste qui-quadrado ou Fischer; Dados expressos em frequência absoluta e porcentagem;

Tabela 4: Inter-relação entre as variáveis prognósticas de sobrevida e as variáveis clínicas patológicas e sociodemográficas dos pacientes com CEC tratados no Hospital Haroldo Juaçaba (Ceará Cancer Institute).

	↑ TNF- α e ↓ Instrução		Outros Grupos		p- Valor
VARIÁVEIS					
CLÍNICO PATOLÓGICAS					
Sexo					
Masculino	15	60.0%	35	68.6%	0.456
Feminino	10	40.0%	16	31.4%	
Idade					
Até 60 anos	11	44.0%	32	62.7%	0.121
Mais de 60 anos	14	56.0%	19	37.3%	
Localização					
Assoalho da boca	15	60.0%	20	39.2%	0.152
Língua	5	20.0%	21	41.2%	
Outros	5	20.0%	10	19.6%	
T					
T1/2	6	24.0%	23	45.1%	0.075
T3/4	19	76.0%	28	54.9%	
N					
N0/1	16	64.0%	34	66.7%	0.818
N2/3	9	36.0%	17	33.3%	

M

M0	24	96.0%	50	98.0%	1.000
M1	1	4.0%	1	2.0%	

Estádio

Estádio 1 e 2	3	12.0%	13	25.5%	0.237
Estádio 3 e 4	22	88.0%	38	74.5%	

Gradação Histológica

Moderadamente diferenciado	24	96.0%	47	92.2%	0.525
Pobremente diferenciado	1	4.0%	4	7.8%	

Tratamento

Cirurgia	5	19.2%	4	8.5%	0.026
Cirurgia + RT	6	23.1%	26*	55.3%	
Cirurgia + RT + QT	15*	57.7%	17	36.2%	

FATORES**SOCIODEMOGRÁFICOS****Instrução**

Analfabeto/1º grau incompleto	25	100.0%	48	94.1%	0.216
1º grau/ 2º grau/ Superior	0	0.0%	3	5.9%	

Convênio

Sistema Público de Saúde	19	76.0%	42	82.4%	0.513
Sistema Privado de Saúde	6	24.0%	9	17.6%	

Raça

Pardo	10	40.0%	15	29.4%	0.356
Não-pardo	15	60.0%	36	70.6%	

Procedência

Capital	16	64.0%	39	76.5%	0.253
Interior	9	36.0%	12	23.5%	

Estado civil

Com vínculo matrimonial	10	40.0%	20	39.2%	0.507
Sem vínculo matrimonial	5	20.0%	16	31.4%	

Hábitos

	10	40.0%	15	29.4%	
--	-----------	--------------	-----------	--------------	--

* $p < 0.05$. teste qui-quadrado ou Fischer; Dados expressos em frequência absoluta e porcentagem;

Material suplementar 1: Análise multivariada dos fatores que definem morte em pacientes com CEC para os pacientes atendidos no Hospital Haroldo Juaçaba (Ceará Cancer Institute).

	p- Valor	Ajustated HR	IC 95%
Localização (Língua/Assoalho de boca)	0.593	-	-
T (3 e 4)	0.997	-	-
N (2 e 3)	0.589	-	-
Estádio (3 e 4)	1.000	-	-
Sexo (Masculino)	0.074	-	-
Instrução (Analfabeto)	*0.041	15.64	1.13 - 217.24
Tretamento (Cirurgia)	0.400	-	-
TNF- α (Tumor) (>6)	*0.021	6.81	1.02 - 105.96
TNF- α (Metástase linfonodal) (>6)	1.000	-	-

*p<0.05. Regressão Logística Multinomial; HR = Risco de Perigo;

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIOIDES, VIAS INFLAMATÓRIAS E MARCADORES DE ANGIOGÊNESE NO CÂNCER DE BOCA E DE OROFARINGE

Pesquisador: Thinali Sousa Dantas

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51871315.4.3001.5528

Instituição Proponente: Departamento de Clínica Odontológica

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.618.057

Apresentação do Projeto:

O câncer de boca e orofaringe é uma neoplasia de elevada incidência sendo o carcinoma de células escamosas o tipo histológico mais frequente. Trata-se de um projeto de pesquisa envolvendo seres humanos com dois momentos: um de desenho retrospectivo com base em prontuários e em análises de amostras arquivadas em blocos de parafina, e um segundo momento, prospectivo para avaliar a sobrevida de participantes portadores de câncer de boca e orofaringe diagnosticados no hospital do câncer do Ceará e no serviço de odontologia do departamento de clínica odontológica da Ceará.

Objetivo da Pesquisa:

Primário -Avaliar de forma retrospectiva e prospectiva a expressão dos receptores opioides Mu (μ), Kappa (κ) e Delta (δ) correlacionando com fatores prognósticos, marcadores inflamatórios e de angiogênese nos carcinomas de boca e orofaringe de pacientes diagnosticados e operados no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará).

Secundários -Determinar em biópsias excisionais de carcinomas de boca e orofaringe, através de imunohistoquímica convencional e tissue microarray (TMA), a expressão de: 1. Receptores opioides Mu (μ), Kappa (κ) e Delta (δ) (Anticorpos anti-Mu, anti-Kappa, anti-Delta e anti-Mup) 2. Marcadores de angiogênese (anticorpos anti-CD31 e anti-VEGF) e inflamação (anticorpos anti-IL-

Endereço: PAPI JUNIOR
Bairro: RODOLFO TEÓFILO **CEP:** 60.441-700
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3288-4853 **Fax:** (85)3228-4853 **E-mail:** eco@hospcancer-ico.org.br

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 1.618.057

6, anti-IL-1, anti-IL-18, anti-NF-B, anti-TNF-); 3. Avaliação de morte e proliferação celular (TUNEL e anticorpo anti-ki67). Determina através de extração de DNA e PCR, das biópsias excisionais da primeira fase do estudo, a expressão de receptores opioides Mu (μ), Kappa (κ) e Delta (δ). Determina através de extração de RNA e qPCR, das biópsias excisionais da segunda fase do estudo, a expressão de receptores opioides Mu (μ), Kappa (κ) e Delta (δ); marcadores de angiogênese (CD31, VEGF); inflamação (IL6, IL-1, IL-18, NF-B, TNF-) e proliferação celular (ki67). Correlacionar os dados coletados nas análises imuno-histoquímicas e das técnicas moleculares com fatores prognósticos, incluindo sobrevida e qualidade de vida, através de questionários.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos - O primeiro momento da pesquisa (retrospectivo) tem como riscos aqueles associados com a análise e guarda de prontuários (sigilo da informação e coleta dos dados) e o possível desconforto/constrangimento para responder questionário sobre a doença. No segundo momento da pesquisa os riscos estão relacionados com o uso do material de arquivo (blocos de parafina) que podem ser perdidos/extraviados ou exauridos. Benefício - Como benefício o(a) pesquisador(a) aponta o conhecimento que pode advir do estudo dos receptores opioides em relação com o câncer de boca e orofaringe e marcadores inflamatórios.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é factível, já possui aprovação do CEP da UFC e obedece ao que está previsto na Resolução 466/12 do CNS.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados TCLE (corrigido) à pedido do CEP da UFC. Termos de Fiel depositário da amostra e termo de autorização do laboratório de patologia.

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não possui óbices éticos à sua realização.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto aprovado pelo CEP, sem quaisquer pendências, acompanhando o parecer relatado.

Endereço: PAPI JUNIOR
Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.441-700
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3288-4853 Fax: (85)3228-4853 E-mail: eco@hospcancer-icc.org.br

**INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC**



Continuação do Parecer: 1.818.057

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_631925.pdf	11/05/2016 21:01:35		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcorrigido.docx	11/05/2016 21:00:23	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	11/05/2016 21:00:11	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_631925.pdf	29/03/2016 15:49:49		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECORRIGIDO.pdf	29/03/2016 15:49:31	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaopatologiaicc.pdf	29/03/2016 15:12:21	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaocbepcicc.pdf	29/03/2016 15:12:01	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_631925.pdf	22/03/2016 21:20:14		Aceito
Cronograma	cronogramaatualizado.pdf	22/03/2016 21:19:28	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_631925.pdf	23/02/2016 18:59:06		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaocbiccc.pdf	23/02/2016 18:58:41	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	delaracaopatoicc.pdf	23/02/2016 18:48:41	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_631925.pdf	07/12/2015 19:56:21		Aceito
Outros	fieldepositarioo.jpg	07/12/2015 19:54:08	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Outros	fieldepositario.jpg	07/12/2015 19:53:25	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaioicc.jpg	07/12/2015 19:52:06	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Outros	cartaaocomite.pdf	02/12/2015 19:06:55	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaodeconcordancia.pdf	02/12/2015 19:06:25	Thinali Sousa Dantas	Aceito

Endereço: PAPI JUNIOR

Bairro: RODOLFO TEÓFILO

CEP: 60.441-700

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3288-4853

Fax: (85)3228-4853

E-mail: eco@hospcancer-icc.org.br

**INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC**



Continuação do Parecer: 1.618.057

Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	02/12/2015 19:02:25	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaopatologia.pdf	02/12/2015 19:01:39	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaonempi.pdf	02/12/2015 19:01:27	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Outros	lattes.pdf	27/11/2015 14:06:10	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	27/11/2015 13:58:43	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Orçamento	custo.pdf	27/11/2015 13:57:06	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	27/11/2015 13:56:15	Thinali Sousa Dantas	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	27/11/2015 13:55:34	Thinali Sousa Dantas	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 01 de Julho de 2016

**Assinado por:
Marcelo Gurgel Carlos da Silva
(Coordenador)**

Endereço: PAPI JUNIOR
Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.441-700
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3288-4853 Fax: (85)3228-4853 E-mail: eco@hospcancer-icc.org.br

Correlações éticas

Este estudo obedeceu a princípios éticos e foi aceito pelo comitê de ética da Universidade Federal do Ceará em 11 de maio de 2016 sob o protocolo 1.552.674

NORMAS PARA SUBMISSÃO REVISTA ORAL DISEASES

Formato

Idioma: Os autores devem escrever seus manuscritos em inglês britânico usando um estilo de fácil leitura. Os autores cuja língua nativa não é o inglês devem ter um falante nativo de inglês para ler e corrigir seu manuscrito. A ortografia e a fraseologia devem obedecer ao padrão de uso britânico e devem ser consistentes em todo o artigo. Uma lista de fornecedores independentes de serviços de edição pode ser encontrada em http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. Todos os serviços são pagos e organizados pelo autor, e o uso de um desses serviços não garante a aceitação ou preferência pela publicação.

Apresentação: Os autores devem prestar atenção especial à apresentação de suas descobertas, para que possam ser comunicadas com clareza. O histórico e as hipóteses subjacentes ao estudo, bem como suas principais conclusões, devem ser claramente explicados. Títulos e resumos, especialmente, devem ser escritos em linguagem que seja prontamente inteligível para qualquer cientista.

Jargão técnico: Deve ser evitado tanto quanto possível e claramente explicado onde seu uso é inevitável.

Abreviações: As Doenças Buciais aderem às convenções descritas em Unidades, Símbolos e Abreviaturas: Um Guia para Editores e Autores Médicos e Científicos. Abreviaturas não padrão devem ser usadas três ou mais vezes e escritas completamente no texto quando usadas pela primeira vez.

Estrutura: Todos os artigos submetidos a *Doenças Orais* devem incluir:

- Folha de rosto
- Resumo estruturado
- Texto principal
- Referências
- (Figuras)
- (Legendas das Figuras)
- (Tabelas)

Página de rosto: Deve fazer parte do manuscrito carregado para revisão e incluir:

- Um título com no máximo 100 caracteres, incluindo espaços
- Um título em execução de no máximo 50 caracteres
- 3-6 palavras-chave
- Nomes completos e instituições para cada autor
- Nome, endereço, endereço de e-mail e número de fax do autor correspondente
- Data de envio (e revisão / reenvio)

Resumo: Está limitado a 200 palavras e não deve conter abreviaturas. O resumo deve ser incluído no documento do manuscrito carregado para análise, bem como separadamente, quando especificado no processo de submissão. O

resumo deve transmitir o propósito essencial e a mensagem do artigo, de forma abreviada, sob:

- Objetivos),
- Assunto (s) (ou Materiais) e Métodos,
- Resultados,
- Conclusões (s).

O Texto Principal dos Artigos Originais de Pesquisa deve ser organizado da seguinte

Introdução: Deve ser focada, delineando as origens históricas ou lógicas do estudo e não resumir os resultados; revisões exaustivas da literatura são inadequadas. Deve fechar com a declaração explícita dos objetivos específicos da investigação.

Materiais e Métodos: Devem conter detalhes suficientes para que, em combinação com as referências citadas, todos os ensaios clínicos e experimentos relatados possam ser totalmente reproduzidos. Como condição de publicação, os autores são obrigados a disponibilizar materiais e métodos disponíveis gratuitamente aos pesquisadores acadêmicos para seu próprio uso. Isso inclui anticorpos e as construções usadas para fazer animais transgênicos, embora não os próprios animais. Outros conjuntos de dados de apoio devem ser disponibilizados na data de publicação diretamente dos autores.

(i) Ensaios clínicos: Como mencionado acima, eles devem ser relatados usando as diretrizes do CONSORT disponíveis em www.consort-statement.org. Uma lista de verificação CONSORT também deve ser incluída no material de envio. Os ensaios clínicos podem ser registrados em qualquer um dos seguintes registros públicos gratuitos de ensaios clínicos: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials.ifpma.org/clinicaltrials/>, <http://isrctn.org/>. Como indicado em um editorial publicado em *Oral Diseases* (12: 217-218), 2006), todos os manuscritos relatando os resultados de um ensaio clínico devem indicar que o estudo foi totalmente registrado em um site de fácil acesso. O número de registro do ensaio clínico e o nome do registro do ensaio serão publicados com o artigo.

(ii) Assuntos experimentais: Como mencionado acima, a experimentação envolvendo seres humanos só será publicada se tal pesquisa tiver sido conduzida em total conformidade com os princípios éticos, incluindo a Declaração da Associação Médica Mundial de Helsinque (versão 2002) e os requisitos adicionais, se houver, do país onde a pesquisa foi realizada. Os manuscritos devem ser acompanhados por uma declaração de que os experimentos foram realizados com o consentimento escrito e compreensivo de cada sujeito e de acordo com os princípios acima mencionados. Uma declaração sobre o fato de que o estudo tenha sido revisado e aprovado de forma independente por um comitê de ética também deve ser incluído. Os editores reservam o direito de rejeitar trabalhos se houver dúvidas sobre se procedimentos apropriados foram usados. Quando animais experimentais são

usados, a seção de métodos deve indicar claramente que medidas adequadas foram tomadas para minimizar a dor ou o desconforto.

(iii) Fornecedores: Os fornecedores de materiais devem ser nomeados e sua localização (cidade, estado / município, país) incluída.

Resultados: deve apresentar as observações com referência mínima à literatura anterior ou a possíveis interpretações.

Discussão: Geralmente pode começar com um breve resumo das principais conclusões, mas a repetição de partes do resumo ou das seções de resultados deve ser evitada. A seção deve terminar com uma breve conclusão e um comentário sobre a relevância clínica potencial dos resultados. As declarações e interpretação dos dados devem ser apropriadamente apoiadas por referências originais.

Agradecimentos: Devem ser usados para fornecer informações sobre fontes de financiamento para a pesquisa, qualquer potencial conflito de interesse e para reconhecer os contribuintes do estudo que não se qualificam como autores. Todas as fontes de apoio financeiro institucional, privado e corporativo para o trabalho dentro do manuscrito devem ser plenamente reconhecidas, e quaisquer potenciais titulares de subsídios devem ser listados. Os agradecimentos devem ser breves e não devem ser incluídos graças aos árbitros e editores anônimos. Onde as pessoas são reconhecidas, uma carta de apresentação que demonstre seu consentimento deve ser fornecida.

Referências: As referências devem ser preparadas de acordo com o Manual de Publicação da American Psychological Association (6ª edição). Devendo ser organizadas em ordem em alfabética e enumeradas no corpo do texto.

Uma amostra das entradas mais comuns nas listas de referência aparece abaixo. Por favor, note que um DOI deve ser fornecido para todas as referências, quando disponíveis. Para mais informações sobre o estilo de referência da APA, consulte o site da APA . Observe que, para artigos de periódicos, os números de edições não são incluídos, a menos que cada edição do volume comece com a página um.

Tabelas, Figuras e Lendas de Figuras

Figuras: Todas as figuras e ilustrações devem ser fornecidas em formato eletrônico. Por favor, salve gráficos vetoriais (por exemplo, arte de linha) em formato encapsulado PostScript (EPS) e arquivos de bitmap (por exemplo, meios-tons) ou fotos clínicas ou in vitro em Tagged Image Format (TIFF).

Informações detalhadas sobre nossos padrões de ilustração digital podem ser encontradas em <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp> .

Verifique sua arte eletrônica antes de enviá-la: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/eachecklist.asp> .

Figuras desnecessárias e partes (painéis) de figuras devem ser evitadas: dados apresentados em pequenas tabelas ou histogramas, por exemplo, geralmente podem ser declarados brevemente no texto. As figuras não devem conter mais de um painel, a menos que as partes estejam conectadas logicamente.

Figuras divididas em partes devem ser rotuladas com letra minúscula, negrito, letra romana, a, b e assim por diante, no mesmo tipo de tamanho usado em qualquer outro lugar na figura. As letras nas figuras devem ser em letras

minúsculas, com a primeira letra maiúscula. As unidades devem ter um único espaço entre o número e a unidade e seguir a nomenclatura SI comum a um determinado campo. Unidades e abreviaturas incomuns devem ser soletradas por completo ou definidas na legenda. Barras de escala devem ser usadas em vez de fatores de ampliação, com o comprimento da barra definido na legenda, e não na própria barra. Em geral, sugestões visuais (nas próprias figuras) são preferidas para explicações verbais na legenda (por exemplo, linha quebrada, triângulos vermelhos abertos, etc.).

Figuras coloridas: As figuras coloridas podem ser publicadas on-line gratuitamente; no entanto, a revista cobra pela publicação de figuras em cores impressas. Se o autor fornecer figuras coloridas na publicação Early View, elas serão convidadas a concluir um contrato de cobrança em cores no RightsLink for Author Services. O autor terá a opção de pagar imediatamente com um cartão de crédito ou débito, ou pode solicitar uma fatura. Se o autor optar por não comprar impressão colorida, os números serão convertidos para preto e branco para a edição impressa da revista.