



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

THINALI SOUSA DANTAS

**ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A IMUNO-EXPRESSÃO DE TNF- α ,
NF- κ B, COX-2, e Ki67 COM FATORES PROGNÓSTICOS EM CARCINOMA DE
CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS**

FORTALEZA

2017

THINALI SOUSA DANTAS

ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A IMUNO-EXPRESSÃO DE TNF- α , NF- κ B, COX-2, e Ki67 COM FATORES PROGNÓSTICOS EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Fabrício Bitu Sousa

FORTALEZA

2017

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)

- D216e Dantas, Thinali.
ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A IMUNO-EXPRESSIONÃO DE TNF- α , NF- κ B, COX-2, e Ki67 COM FATORES PROGNÓSTICOS EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS / Thinali Dantas. – 2017.
72 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2017.
Orientação: Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa.

1. Carcinoma de Células Escamosas. 2. Inflamação. 3. Prognóstico. 4. Fator de Necrose Tumoral alfa. 5. Sobrevida. I. Título.

CDD 617.6

THINALI SOUSA DANTA

ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A IMUNO-EXPRESSÃO DE TNF- α , NF- κ B, COX-2, e Ki67 COM FATORES PROGNÓSTICOS EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Fabrício Bitu Sousa

Aprovada em: ___/___/_____

BANCA EXAMINADORA:

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

Prof. Dra. Karusa Maria Alves Pereira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Tácio Pinheiro Bezerra
Centro Universitário Christus (Unichristos)

A Deus,
Aos meus pais, Auciani e Alcivan,
Aos meus Mestres.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiro a Deus que em sua soberania me guiou e me deu a oportunidade de cursar e finalizar um mestrado.

A minha família, em especial aos meus pais, **Maria Auciani** e **Alcivan**, pela educação, amor, calma e tranquilidade em todos os momentos que precisei de sua acolhida, pelo apoio financeiro e psicológico que me fizeram ter a oportunidade de terminar mais essa etapa da minha vida. Por orarem por mim nos momentos difíceis e pelo apoio e torcida na realização desse sonho.

Ao meu namorado **Davyd Vieira**, pois sempre estive ao meu lado de maneira plena, me apoiando, ajudando nos momentos difíceis, deixando meus dias conturbados mais tranquilos, sendo além de companheiro um amigo em quem pude confiar e confidenciar todos os desejos e problemas durante esses dois anos.

Agradeço também ao meu orientador **Fabrcio Bitu Sousa** por me aceitar como sua orientanda e mostrar o melhor caminho não apenas nestes dois anos, mas também durante a graduação, por me dá a oportunidade de participar de perto de pesquisas e orientação da iniciação-científica e projetos de extensão que me fizeram crescer e que certamente nortearão toda a minha vida profissional. Agradeço pelos conselhos, pela palavra amiga quando precisei e por representar um exemplo. Aos professores e também orientadores **Ana Paula** e **Mário Rogério**, por toda orientação, pela paciência, apoio e por terem acreditado e confiado em mim.

A todos que compõe o time da estômato-patologia, professores, alunos e pós-graduandos, pelo aprendizado, paciência, dedicação, compromisso e principalmente pela amizade construída durante anos. Certamente as experiências vividas mudaram minha vida, minha maneira de ver a odontologia e me fizeram amadurecer. Especialmente ao doutor **Paulo Goberlânio de Barros e Silva (Paulinho)** pela participação no presente trabalho, amizade e força durante os períodos de construção do mesmo, pela orientação, pela paciência e dedicação às minhas dúvidas.

A meus amigos e companheiros de profissão, **Ernando, Ronildo, Carol, Karine, Isabelly** e **Elisa** por terem confiado em mim nos momentos de dúvida, por ter me apoiado, nos momentos de necessidade, por estarem sempre ao meu lado durante os atendimentos clínicos e no laboratório de patologia, por terem sido verdadeiros amigos compartilhando as tristezas e alegrias durante todo esse período.

RESUMO

O câncer representa uma doença de grande preocupação devido à sua alta incidência e elevada mortalidade, sendo, atualmente, considerado como a segunda maior causa de morte no mundo. Na cavidade oral, o carcinoma de células escamosas é a neoplasia maligna de maior prevalência. O tratamento desse tumor está diretamente relacionado ao seu estadiamento, porém, a cada dia, as pesquisas focam na descoberta de biomarcadores que possam auxiliar na determinação do prognóstico para essa neoplasia. Portanto, este estudo propõe avaliar a imuno-expressão de importantes marcadores inflamatórios, assim como a proteína de transcrição nuclear e marcador de proliferação celular, correlacionando-os com fatores prognósticos nos carcinomas de boca. Para isso, foi realizado um estudo retrospectivo com pacientes com Carcinomas de Células Escamosas em boca, no período de 2011 a 2016, no qual foram avaliados os prontuários para coleta de dados sociodemográficos e clínico-patológicos, além da utilização das peças cirúrgicas dos mesmos para realização de imuno-histoquímica, por meio de TMA para marcadores inflamatórios (TNF- α e COX-2), de transcrição (NF- κ B) e proliferação celular (Ki67). A imuno-marcação foi avaliada de maneira qualitativa e quantitativa através do software ImageJ, e os dados foram correlacionados com os fatores prognósticos e sobrevida dos pacientes, obtida através da diferença entre a data de óbito e a data do início do tratamento realizado, expressa em meses. Observou-se que a imuno-expressão negativa e fraca de TNF- α em tumor primário influenciou, melhorando a sobrevida dos pacientes e que este marcador está associado positivamente de maneira significativa, à expressão moderada e intensa dos outros marcadores estudados tanto em tumor primário como em tecido perilesional e metástase linfonodal. Apesar de COX-2, NF- κ B e Ki67 não apresentarem, separadamente, relação com a melhora ou piora da sobrevida.

Palavras-chave: Carcinoma de Células Escamosas, Inflamação, Prognóstico, Fator de Necrose Tumoral alfa, Sobrevida.

ABSTRACT

Cancer is a disease of great concern due to its high incidence and high mortality rates and it is currently considered the second largest cause of death in the world. In the oral cavity, Squamous Cell Carcinoma is the most prevalent malignant neoplasm. The treatment of this tumor is directly related to its staging, nevertheless, at the present time, research focuses on the discovery of biomarkers that may help in the determination of the prognosis for this neoplasia. Therefore, this study aims to evaluate the immunoexpression of important inflammatory markers, as well as the nuclear transcription factor and the cell proliferation marker, correlating them with prognostic factors in oral carcinomas. For this, a retrospective study was carried out with patients with Oral Squamous Cell Carcinomas, from 2011 to 2016, in which medical records were evaluated for the collection of sociodemographic and clinical-pathological data, in addition to the use of surgical pieces of the patients for Immunohistochemistry, using TMA for inflammatory (TNF- α and COX-2), transcription (NF- κ B) and cell proliferation (Ki67) markers. Immuno-tagging was assessed qualitatively and quantitatively using ImageJ software, and data were correlated with prognostic factors and patient survival rates, which were obtained by analyzing the difference between the date of death and the date of initiation of the treatment, expressed in Months. It was observed that the negative and weak TNF- α immunoexpression in a primary tumor had an influence, improving the survival of patients, and that this marker is positively associated with a moderate and intense expression of the other markers studied in both primary tumor and in perilesional tissue and lymph node metastasis. However, COX-2, NF- κ B and Ki67 do not show, separately, any relationship with the improvement or worsening of survival.

Key Words: Inflammation, Squamous Cell Carcinoma, Tumor Necrosis Factor-alpha, Survivorship.

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação do bloco receptor de TMA	23
Figura 2 – Curva de sobrevida com influência da imuno-expressão de TNF- α em tumor primário (long-rank Mantel–Cox)	65
Figura 3 – Associação entre o percentual e intensidade de imuno-expressão de marcadores inflamatórios, de transcrição e proliferação celular em lesão, perilesão e metástase linfonodal de CEC.....	65
Figura 4 – Painel Histopatológico.	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Estadiamento dos Tumores de Cabeça e Pescoço.....	21
Tabela 2 –	Anticorpos utilizados para imuno-histoquímica	23
Tabela 3 –	Perfil sociodemográfico, clínico-patológico e sobrevida em cinco anos de acompanhamento dos pacientes diagnosticados com câncer de boca, no Hospital Haroldo Juaçaba (2011-2016)	46
Tabela 4 –	Perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca.....	48
Tabela 5 –	Relação entre o perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca e a gradação histológica do tumor primário.....	49
Tabela 6 –	Relação entre o perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca e o tamanho do tumor primário.....	51
Tabela 7 –	Relação entre o perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca com a presença de metástase linfonodal.....	52
Tabela 8 –	Relação entre o perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca e o estadiamento do tumor primário.....	53
Tabela 9 –	Relação entre o perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca e os hábitos deletérios dos pacientes.....	54

Tabela 10 –	Relação entre o perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca e o tratamento realizado	56
Tabela 11 –	Relação entre a sobrevida média e o perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca.....	57
Tabela 12 –	Inter-avaliação entre o histoscore de imuno-expressão de TNF- α em tumor primário com marcadores inflamatórios, de transcrição e proliferação celular em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC	59
Tabela 13 –	Inter-avaliação entre o histoscore de imuno-expressão de COX-2 em tumor primário com marcadores inflamatórios, de transcrição e proliferação celular em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC	60
Tabela 14 –	Inter-avaliação entre o histoscore de imuno-expressão de NF- κ B nuclear em tumor primário com marcadores inflamatórios, de transcrição e proliferação celular em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC.....	61
Tabela 15 –	Inter-avaliação entre o histoscore de imuno-expressão de NF- κ B citoplasmático em tumor primário com marcadores inflamatórios, de transcrição e proliferação celular em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Proteína de Ativação-1
Bcl-2	Gene Humano Bcl-2
Bcl-xl	Gene Humano Bcl-xl
CEC	Carcinoma de Células Escamosas
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CID-0	Classificação Internacional das Doenças para Oncologia
COX	Ciclo-oxigenase
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
DAB	3,3'-Diamino-benzidina
G0	Fase de Repouso do ciclo celular
G1	Fase de Intérfase do ciclo celular
G2	Fase de Intérfase do ciclo celular
HE	Hematoxilina e Eosina
IARC	International Agency for Research on Cancer
IL	Interleucina
ILR-1	Receptor de Interleucina-1
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ki67	Proteína Nuclear de Proliferação
M	Metástase a Distância
MyD88	Fator de Diferenciação Mieloide 88
N	Metástase Linfonodal
NF-κB	Fator Nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial de Saúde
P50	Fator de Transcrição P50
P52	Fator de Transcrição P52
Rel-A	Gene Humano Real-A
S	Fase de Intérfase do ciclo celular
SPSS	Statistical Package for the Social-Sciences
SUS	Sistema Único de Saúde
T	Tamanho do Tumor

TLR	Receptor Toll-like
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNFR	Receptor do Fator de Necrose Tumoral
TNF-R1	Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral
TNF-R2	Receptor 2 do Fator de Necrose Tumoral
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TNM	Classificação dos Tumores Malignos
TRADD	Proteína Adaptadores de Domínio de Morte associada ao TNF
TRAF	Fator Associado ao Receptor de TNF
VEGF	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Câncer de boca	1
1.2 Inflamação e comportamento tumoral	2
2 OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo Geral:	6
2.2 Objetivos Específicos:	6
3. MATERIAIS E MÉTODOS	7
3.1. Delineamento do Estudo	7
3.2. Cálculo amostral	7
3.3. Amostra e Dados Analisados	7
3.4 Técnica do <i>Tissue Microarray</i> (TMA) e processamento imuno-histoquímico	9
3.5. Análise Imuno-histoquímica	11
3.6. Análise estatística	12
3.7. Preceitos Éticos	13
4 RESULTADOS	14
5 DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO	27
REFERÊNCIAS	28
APÊNDICE 1:	34
ANEXO 1	54
.....	56

INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de boca

O câncer é uma doença de grande preocupação devido à sua alta incidência e elevada mortalidade, sendo, atualmente, considerado como a segunda maior causa de morte no mundo, estando atrás apenas das doenças coronarianas, apresentando grande relevância em pesquisas científicas, por isso, tem sido alvo de estudos e investigações (SCULLY, 2005).

Com base no documento World Cancer Report 2014, da International Agency for Research on Cancer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), é inquestionável que essa doença seja um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde é esperado que, nas próximas décadas, o impacto na população corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025, e o câncer de boca destaca-se dentre essas neoplasias (BRASIL, 2016).

Estimam-se, para o Brasil, no ano de 2016, 11.140 casos novos de câncer na cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,27 casos novos a cada 100 mil homens e 4,21 a cada 100 mil mulheres (BRASIL, 2016).

O tipo histológico mais prevalente é o Carcinoma de Células Escamosas (CEC), que representa aproximadamente 95% das neoplasias malignas dessa região e cerca de 38% dos tumores malignos de cabeça e pescoço, sendo o subtipo histológico moderadamente diferenciado o mais frequente (BRASIL, 2016).

O risco de desenvolvimento aumenta com a idade, e a maioria dos casos ocorre em indivíduos acima de 50 anos, sendo lábio, língua e assoalho bucal as localizações mais comuns (DURAZZO et al., 2005).

Os principais fatores de risco são o tabagismo e o consumo de álcool, que, quando associados, podem aumentar o efeito carcinogênico (DURAZZO, et al., 2005). Porém, a etiologia do câncer de boca ainda não é bem definida, vários agentes têm sido implicados no seu desenvolvimento, e a combinação de fatores extrínsecos e intrínsecos parece ampliar o seu potencial de estimulação na divisão celular, a qual, de maneira desgovernada, dá origem ao tumor (BASCONES et al., 2011).

São fatores etiológicos que podem ser associados a essa neoplasia: o tabaco, o álcool, a susceptibilidade genética, os agentes infecciosos, radiação, lesões potencialmente malignas, nutrição, dentre outros (DURAZZO et al. 2005).

O CEC evolui a partir de um complexo processo resultante da exposição a agentes carcinogênicos e inclui várias etapas constituídas por mudanças genéticas, epigenéticas e metabólicas. Exposição crônica a esses agentes levam a instabilidade em genes nas células epiteliais, ocasionando o desenvolvimento de lesões potencialmente malignas e, posteriormente, o carcinoma invasivo. Muitos estudos têm revelado o importante papel desempenhado por proto-oncogenes e genes supressores tumorais, durante o curso de evolução do câncer oral (JADOTTE, 2012).

Anormalidades afetando proteínas sinalizadoras relacionadas à proliferação celular, angiogênese e metástase também têm sido estudadas e relacionadas com o prognóstico do tumor (BRINKMAN e WONG, et al., 2006; JADOTTE, 2012).

O tratamento é orientado pelo estadiamento do tumor, classificado a partir do TNM (BRASIL, 2004). No entanto, essa classificação fornece informações limitadas sobre a resposta do tratamento e a agressividade biológica (HEO et al., 2012). Muitas vezes, requer alto custo e, geralmente, restringe-se a três modalidades principais: cirurgia, radioterapia e quimioterapia. E traz consigo situações mutiladoras e debilitantes ao paciente, o que afeta significativamente sua qualidade de vida (AMAR, 2002), principalmente, se for considerado que o Carcinoma de Células Escamosas é um tipo histológico com grande agressividade e fácil invasão local, geralmente diagnosticado em estágios avançados, o que leva a uma piora no prognóstico e à baixa sobrevida (RAZAK, et al., 2010).

Estudos recentes evidenciam novos achados sobre câncer de cabeça e pescoço, conduzindo a uma melhor compreensão das características biológicas desses tumores bem como fornecendo mais opções de tratamento, como novos agentes terapêuticos dirigidos contra múltiplos alvos moleculares (HADDAD, 2008).

Portanto, novos marcadores moleculares que buscam prever prognóstico e agressividade tumoral devem ser estudados de forma individualizada na busca do tratamento ou como indicativo de prognóstico.

1.2 Inflamação e comportamento tumoral

O câncer é uma desordem que apresenta diversas características biológicas importantes, como autossuficiência de crescimento, insensibilidade a anticrescimento,

potencial replicativo ilimitado, capacidade de evadir apoptose, angiogênese sustentada, capacidade de invasão tecidual e metástase. Essa doença possui, ainda, a capacidade de driblar o sistema imune, mantendo um microambiente com inflamação crônica que passa a contribuir com a proliferação tumoral (CAVALLO et al., 2011).

O processo inflamatório é vital para animais superiores, configurando-se como uma resposta benéfica para restaurar tecidos cuja destruição pode ser decorrente de lesões e agentes patogênicos, desencadeado pelo seu reconhecimento, por meio de células e mediadores, tais como citocinas (HUSSAIN, 2007; LANDSKRON et al., 2014). Porém, observa-se que esse mesmo processo, quando atua de maneira crônica e não regulamentada gerando um microambiente patologicamente favorável, pode contribuir com a progressão de processos malignos (ALLEN, 2007).

Desde 1863, Virchow já percebeu as células inflamatórias no microambiente tumoral. Inicialmente, pensava-se que a resposta inflamatória era apenas relacionada com o combate ao tumor, porém, sabe-se que os mediadores químicos, as vias de sinalização e os fatores de transcrição contribuem direta ou indiretamente para alterações genéticas e teciduais que nortearão a geração de células transformadas (LOPES, 2013).

As citocinas são peptídeos reguladores-chave do processo inflamatório, exercendo funções pró e anti-inflamatórias. São produzidas como uma resposta do hospedeiro ao estresse celular causado tanto por agentes endógenos ou exógenos para controlar e minimizar os danos celulares (LIN, 2007). Esses mediadores são associados a um risco aumentado no desenvolvimento do câncer. Apesar de a maioria desses mediadores serem produzidos com a função de ativar o sistema imune contra o tumor, eles podem, também, estimular o crescimento deste. Uma descontrolada e sustentada produção de citocinas pode conduzir o crescimento celular alterado, diferenciação celular e evasão da apoptose (HUSSAIN, 2007).

Estudos demonstram que mediadores como o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α), as interleucinas (IL) e a ciclo-oxigenase-2 (COX-2) podem estar relacionadas com a progressão de tumores malignos e com o processo metastático, apresentando uma elevada expressão em pacientes com a doença e aumentando a expressão de proteínas de proliferação celular como o Ki67 (BARLKIWI, 2001; LIN, 2007; EIRÓ; 2012; LADSKRON, et al., 2014).

A ciclo-oxigenase (COX) é uma enzima responsável pela formação de importantes mediadores biológicos chamados prostanoídes, que incluem prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. De suas isoformas, a COX-2 é uma enzima indutível, estando a

sua expressão aumentada em processos inflamatórios (KLIPPEL et al., 2001; SOLOMON et al., 2002; COSTA, 2010).

Essa enzima é produzida por macrófagos e, também, pelas próprias células tumorais. Geralmente, é induzida em resposta a fatores pró-inflamatórios. É expressa em diversos tumores malignos como, por exemplo, tumores renais e do trato gastrointestinal, assim como em neoplasias orais. Os principais eventos relacionados à COX-2 no microambiente tumoral envolvem mitogênese e angiogênese, resistência à apoptose, aumento do potencial invasivo e mediação de imunossupressão (BOAS, et al. 2010; ATULA, et al., 2006; KONO et al., 2013; KEKATPURE et al., 2015).

O fator de necrose tumoral (TNF), também chamado de TNF- α , é uma importante citocina mediadora da resposta inflamatória aguda a bactérias gram-negativas. Seu nome deriva de sua identificação original como substância presente no soro que causava a necrose de tumores (ABBAS, 2015).

As respostas biológicas relacionadas ao TNF- α ocorrem por meio de ligação altamente específica a receptores presentes na membrana de vários tipos celulares. Esses receptores diferem nas suas afinidades de ligação bem como nas vias de sinalização intracelular, levando à apoptose, à ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B) e à produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (POPA et al., 2007).

TNF- α possui ações dúbias no comportamento biológico de um tumor maligno. Por exemplo, concentrações elevadas de TNF- α podem levar à morte celular (LAM-UBOL et al., 2010). Porém, estudos em animais mostram que essas citocinas, em baixos níveis, aumentam o crescimento tumoral e induzem a angiogênese, além de contribuírem como indutoras em tumores de pele e linfomas (HUSSAIN, 2007; LANDSKRON et al., 2014).

A fonte de TNF- α nos tumores pode ser derivada a partir de células tumorais, por meio de uma ativação autócrina, podendo estimular o crescimento tumoral e a angiogênese (LANDSKRON et a., 2014). Em humanos, observa-se uma quantidade significativa dessa citocina em Carcinoma de Células Escamosas, sugerindo que esta contribui para a progressão tumoral (PIVA et al., 2013).

O fator de transcrição nuclear (NF- κ B) é o coordenador-chave da imunidade inata e da inflamação, e tem emergido como um importante promotor endógeno de carcinogênese (LIN et al., 2009). Esse fator de transcrição opera tanto em células malignas ou com potencial de malignidade quanto em células inflamatórias, envolvido na ativação da célula T, contribuindo para a transcrição da interleucina 2 (IL-2) e na resposta de muitos tipos celulares às citocinas pró-inflamatórias tais como o TNF, IL-1 e lipoproteínas bacterianas (LPS)

(ABBAS, 2015), por intermédio da via de sinalização do receptor Toll-like (TLR)-MyD88. Além disso, em células tumorais, o NF- κ B pode ser ativado como resultado de alterações genéticas (amplificação, mutação ou deleção) (COURTOIS E GILMORE, 2006), tem atividade na codificação para proteínas que promovem a proliferação celular e inibem a apoptose (ALLEN, 2007), além de apresentar papel na metástase (EIRÓ, 2012).

O NF- κ B conduz, ainda, à expressão de citocinas inflamatórias, moléculas de adesão, fatores angiogênicos e enzimas como a COX-2. Em células tumorais e epiteliais expostas a carcinogênicos, esse mediador promove a sobrevivência e a proliferação celular através da ativação de genes que codificam proteínas importantes do ciclo celular e da via anti-apoptótica, invasão, metástase e angiogênese (COSTA, 2010).

Essa proteína atua no citoplasma e no núcleo, regulando a sobrevivência celular por meio da indução de pelo menos três genes, com destaques para: gene P52, que inibe a apoptose; gene P50, que estimula os linfócitos B a sintetizar imunoglobulinas que atuam no controle da imunidade; e gene Rel A, que estimula a divisão celular por vias de sinalização estimuladas por receptores transmembrana, como receptor para interleucina-1 (ILR-1) e receptor para TNF (TNFR). Uma superestimulação, seja por quantidades elevadas de indutores ou até mesmo mutações na própria proteína NF- κ B, causa a desregulação da divisão celular, bloqueio de apoptose e aumento da produção de imunoglobulinas (ABBAS, 2012).

Visto que a sobrevivência de pacientes com câncer de boca é dependente do crescimento tumoral, e que mediadores químicos inflamatórios podem influenciar direta ou indiretamente na sua progressão (WONG et al., 2006), é necessária a realização de estudos que possam ajudar a entender e apontar marcadores biológicos influenciadores no prognóstico de pacientes com essa doença.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a imuno-expressão de TNF- α , COX-2, NF- κ B e KI67, sua associação com fatores prognósticos, colocar o nome, nos carcinomas de boca.

2.2 Objetivos Específicos:

- a) Determinar, em biópsias excisionais de carcinomas de boca, através de imuno-histoquímica em *Tissue Microarray* (TMA), a expressão de marcadores inflamatórios (anticorpos anti-TNF- α , anti-COX-2), de transcrição nuclear (anticorpo anti-NF κ B) e de proliferação celular (anticorpo anti-ki67);
- b) Correlacionar a imuno-expressão dos marcadores entre si;
- c) Comparar a imuno-expressão dos marcadores entre tumor, tecido perilesional e metástase linfonodal;
- d) Correlacionar os dados coletados nas análises imuno-histoquímicas com fatores prognósticos, incluindo sobrevida.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento do Estudo

Estudo observacional, quantitativo, de caráter retrospectivo e de corte transversal.

3.2. Cálculo amostral

Com base no estudo de Piva et al. (2013), 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%), estima-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, totalizando 76 casos de CEC.

3.3. Amostra e Dados Analisados

Foram selecionados 76 pacientes com Carcinoma de Células Escamosas em cavidade oral, de acordo com cálculo amostral apresentado, diagnosticados e operados no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará), no período de 1º de janeiro de 2011 a 1º de setembro de 2016.

Como critério de inclusão para seleção da amostra, determinou-se: pacientes com CEC em cavidade oral, diagnosticados e tratados entre os anos de 2011 a 2016, que tivessem os prontuários totalmente preenchidos, que apresentassem lâminas histológicas e blocos parafinados com quantidade de material suficiente e em bom estado.

Foram levantados os dados sociodemográficos, como idade, sexo, grau de instrução, raça/cor, tipo de entrada no hospital (convênio/particular ou SUS), além de dados clínico-patológicos, como variante histológica do tumor, localização primária, TNM, estadiamento tumoral e tratamento realizado, dados estes fornecidos por meio dos prontuários dos pacientes.

A localização do tumor primário foi classificada conforme recomendado pela OMS, pela classificação internacional das doenças CID-0, em lábio, gengiva, terço anterior de língua, palato duro, assoalho de boca e outras partes, e partes não identificadas na boca (área retromolar) (BRASIL, 2005).

O TNM do tumor foi definido conforme proposição do Instituto Nacional do Câncer, INCA, que determina TNM, sendo T referente ao tamanho do tumor, N a acometimento linfonodal e M relacionado a metástases a distância (BRASIL, 2004).

3.3.1 Tamanho do tumor

- a) TX: o tumor primário não pode ser avaliado;
- b) T0: não há evidência de tumor primário;
- c) Tis: carcinoma *in situ*;
- d) T1: tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão;
- e) T2: tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão;
- f) T3: tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão;
- g) T4a: (*lábio*) tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, ou pele da face (queixo ou nariz);
- h) T4a: (*cavidade oral*) tumor que invade estruturas adjacentes da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face;
- i) T4b: (*lábio e cavidade oral*): tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigoides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna.

3.3.2 Linfonodos:

- a) NX: os linfonodos regionais não podem ser avaliados;
- b) N0: ausência de metástase em linfonodos regionais;
- c) N1: metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão;
- d) N2: metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos

bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão;

- e) N2a: metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão;
- f) N2b: metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão;
- g) N2c: metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão;
- h) N3: metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão.

3.3.3 Metástase:

- a) MX: a presença de metástase a distância não pode ser avaliada;
- b) M0: ausência de metástase a distância;
- c) M1: metástase a distância.

3.3.4 Estadiamento clínico

O estadiamento foi definido através do TNM, considerando estágio I, estágio II, estágio III, e estágio IV que engloba os estádios: IVA, IVB e IVC (Tabela 1) (BRASIL, 2004).

Também foi calculada a sobrevida, obtida por meio da diferença entre a data do início do tratamento (dia, mês e ano) e a data do óbito (dia, mês e ano) utilizando, para fins de análise estatística, a quantidade de meses entre essas datas, assim como descrito por Dantas et al. (2016).

Após a seleção da amostra, foram resgatadas as lâminas histológicas das peças cirúrgicas para revisão e reclassificação da gradação tumoral por um patologista experiente. Essa gradação foi feita, de acordo com a OMS (2005), em Carcinoma de Células Escamosas bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pobremente diferenciado, e foram excluídas amostras com lâminas com qualidade ou material considerados insuficientes.

3.4 Técnica do *Tissue Microarray* (TMA) e processamento imuno-histoquímico

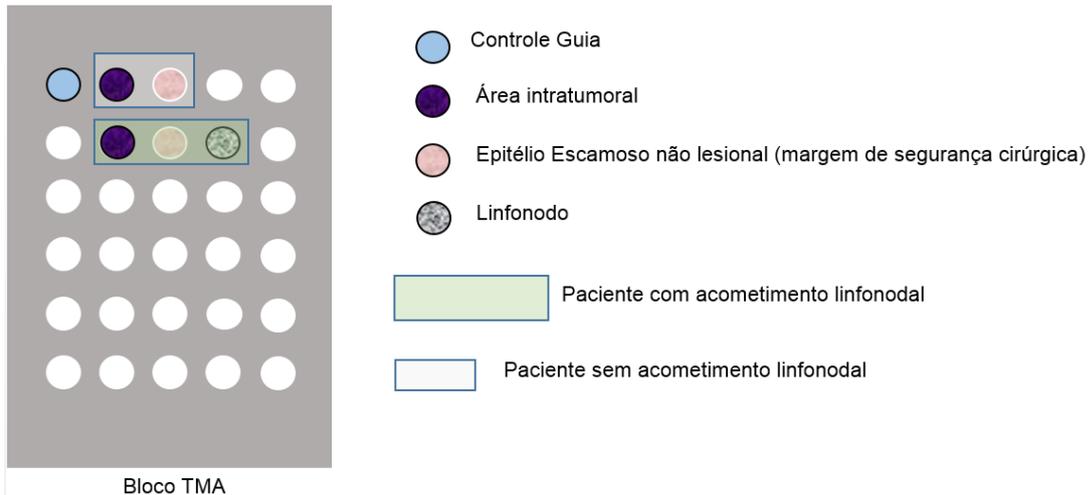
Após a revisão de todas as lâminas histológicas, foram selecionadas as que representassem: uma área da peça cirúrgica com microambiente tumoral adequado, que representasse de maneira satisfatória todo o tumor; epitélio escamoso não lesional, localizado além da margem de cancerização, assim como feito por Liu et al. (2016); e, para pacientes que apresentassem acometimento linfonodal, também foi selecionada uma lâmina que representasse essa metástase.

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 microarrayer*” (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.

Assim, cada bloco de TMA foi composto por 36 fragmentos de tecidos, correspondentes ao fragmento guia (vazio) e aos fragmentos do tumor, ao fragmento de epitélio escamoso controle e à metástase linfonodal, como representado na figura 1.

Figura 1 – Representação do bloco receptor de TMA.



Fonte: Própria.

Em uma mesma sessão, o bloco receptor foi, então, submetido a cortes sequenciais de 3 µm de espessura, que foram depositados em lâminas silanizadas de vidro, para realização de coloração convencional por hematoxilina-eosina e para reações de imunohistoquímica.

A reação de imunohistoquímica ocorreu através da técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Após desparafinização e reidratação, foi realizada recuperação antigênica por meio de sistema Ptlink® (Dako®) a 97°C durante 20 minutos, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio, lavagem com solução tampão de fosfato (PBS) e incubação *overnight* com os anticorpos primários, de acordo com as diluições determinadas na literatura ou por reações em estudo piloto.

Após incubação com o anticorpo primário, as lâminas foram lavadas (PBS) e incubadas com anticorpo biotilado por 20 minutos e, após lavagem, incubadas com conjugado de peroxidase avidina-biotina por 20 minutos.

A revelação foi realizada por meio de incubação com 3,3'-Diamino-benzidina (DAB) (Abcam®), e a contracoloração, com Hematoxilina de Harris (10^{''}). Após coloração e contracoloração, as lâminas foram montadas para avaliação.

Ainda foram feitos controles positivos da reação de imunohistoquímica por cortes histológicos convencionais, de acordo com a tabela 2. E, para controle negativo, lâminas de TMA, utilizando a mesma técnica de imunohistoquímica descrita anteriormente, porém omitindo a etapa de incubação com o anticorpo primário.

3.5. 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 qualitativa categórica como quantitativa, como feito por Zhang et al. (2015).

Na avaliação qualitativa, 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.

Foi também determinada a localização da marcação em nível intracelular para o marcador NF- κ B, se esta foi nuclear ou citoplasmática.

Para fins estatísticos, foram determinados histoscores 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. O único marcador avaliado apenas por porcentagem foi o Ki67.

3.6. Análise estatística

Os dados quantitativos (percentual de imuno-marcação e histoscores) foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, expressos em forma de média e desvio-padrão e analisados por meio dos testes Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis/Dunn. A intensidade e o percentual de imuno-expressão para os marcadores supracitados também foram analisados dicotomicamente através do teste do qui-quadrado. Para análise de sobrevida, foram utilizados os testes do qui-quadrado (avaliação de percentual de pacientes vivos) bem como o teste de Long-Rank Mantel-Cox (comparação das curvas de sobrevida de Kaplan-Meier).

Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 17.0, adotando uma confiança de 95%.

3.7. Preceitos Éticos

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal do Ceará e foi aceito com número de parecer 1.552.674 (ANEXO 1).

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da amostra

Dentre as 76 lesões de CEC em cavidade oral que foram levantadas no centro de referência estudado, 50 (65,8%) ocorreram no sexo masculino e 26 (34,2%) no sexo feminino. A distribuição etária mostrou apenas leve prevalência em pacientes com idade até 60 anos (43, 56.6%). Houve maior prevalência de lesões em pacientes de raça parda (61, 80.3%) em relação a não pardos (15, 19.7%) ($p<0.001$). E maior quantidade de pacientes foi proveniente do interior do estado (51, 67.1%) ($p=0.032$) (Tabela 3).

Com relação ao grau de instrução, 39 (51.3%) pacientes se diziam analfabetos ou com o ensino fundamental incompleto e 37 (48.7%) tinham o ensino fundamental completo, ensino médio ou nível superior de ensino. O Sistema Único de Saúde (73, 96.1%) foi o principal convênio pelo qual os pacientes deram entrada no hospital. A maioria possui vínculo matrimonial (5, 72.4%) (Tabela 3).

Em relação aos dados clínico-patológicos, os dois principais sítios de acometimento foram o assoalho de boca (35, 46.1%) e a língua (15, 19.7%), e o principal hábito descrito foi o tabagismo (30, 39.5%). Os Carcinomas de Células Escamosas bem diferenciados ou moderadamente diferenciados (71, 93.4%) ($p<0.001$) foram as gradações histológicas majoritariamente levantadas. Clinicamente, a maioria dos tumores foram diagnosticados em tamanho T3 ou T4 (47, 61.8%), sem nenhum ou um linfonodo (N0 ou N1) acometido (50, 65.8%) ($p=0.0049$), e sem metástases (M0) identificadas (74, 97.4%) ($p<0.001$). Os estádios de maior prevalência foram os estádios III e IV com 60 (78.9%) ($p<0.001$). Cirurgias associadas a radioterapia e/ou a quimioterapia (32, 43.2%) ($p=0.017$) foram as condutas terapêuticas mais adotadas (Tabela 3).

4.2 Relação entre as características clínicas e sociodemográficas e a sobrevida média em cinco anos de pacientes com CEC de boca

Em até cinco anos a sobrevida média dos 76 pacientes estudados foi de 49 ± 3 meses (Tabela 3).

Pacientes do sexo feminino (39 ± 3 meses) ($p=0.140$) apresentaram uma menor sobrevida, assim como aqueles que eram pardos (42 ± 3 meses) ($p=0.680$), que moravam no interior do estado (43 ± 3 meses) ($p=0.752$) e que tinham vínculo matrimonial (45 ± 3 meses)

($p=0.470$). Pacientes com idade superior a 60 anos de idade mostraram uma maior sobrevida (111 ± 10) (Tabela 3).

Pacientes analfabetos ou com o ensino fundamental incompleto demonstraram uma menor sobrevida com 44 ± 4 meses ($p=0.062$) e, de maneira significativa, 76.9% ($p=0.015$) dos pacientes vivos em comparação com pacientes que apresentaram ensino fundamental completo, ensino médio e nível superior que, somados, apresentaram 124 ± 5 meses de sobrevida com 97.1% de pacientes vivos (Tabela 3).

Em relação à localização primária do tumor, aqueles com neoplasia em assoalho de boca demonstraram uma menor sobrevida, com 80% dos pacientes vivos e média de 35 ± 3 meses ($p=0.291$), quando comparados com neoplasia em língua (49 ± 5 meses). Observou-se, também, que em CECs pobremente diferenciados os pacientes viveram menos, com apenas 23 ± 1 meses ($p=0.614$) de sobrevida, quando comparados com as outras gradações histológicas que, somadas, demonstraram uma sobrevida de 50 ± 3 meses (Tabela 3).

Em tumores de tamanho T1 e T2, houve uma sobrevida significativamente superior, com 100% dos pacientes vivos com 59 ± 1 meses, enquanto em T3 e T4, apenas 45 ± 4 meses de sobrevida ($p=0.032$). Porém, não se observou diferença estatística de sobrevida em relação ao acometimento linfonodal ou à metástase a distância, assim como aos diferentes estádios, apesar de estádios I e II demonstrarem 100% dos pacientes vivos (Tabela 3).

Hábitos deletérios não mostraram associação com o número de pacientes vivos ($p=0.280$) ou tempo médio de sobrevida ($p=0.483$). Assim como aqueles que eram atendidos no hospital pelo SUS (48 ± 3 meses) ($p=0.331$), apesar de apenas três pacientes da amostra terem atendimento particular ou por plano de saúde. Observou-se, também, que aqueles que tiveram a modalidade de tratamento cirurgia apresentaram, de maneira significativa, 100% ($p=0.037$) dos pacientes vivos, em relação às outras modalidades de tratamento (Tabela 3).

4.3 Perfil de imuno-marcação de marcadores inflamatórios, de transcrição e proliferação celular em lesão, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca

Foi considerado imuno-marcação positiva quando havia a coloração marrom-acastanhada em células tumorais, em tumor primário e metástase linfonodal ou em células epiteliais, em tecido perilesional. A figura 4 demonstra o perfil de imuno-marcação de Ki67, COX-2, TNF- α e NF- κ B, em perilesão, tumor primário e metástase linfonodal, respectivamente.

Em relação ao percentual de imuno-positividade do Ki67, observou-se, de maneira significativa, um maior percentual de células marcadas em tecido tumoral tanto em tumor primário ($34.50 \pm 19.31\%$) como em metástase linfonodal ($35.19 \pm 26.76\%$), em relação ao tecido perilesional ($17.13 \pm 8,20\%$) ($p < 0.001$).

A marcação COX-2 não mostrou diferença estatisticamente significativa no percentual de células marcadas nas três categorias ($p = 0.710$) (Tabela 4).

A porcentagem de células com imuno-positividade de NF- κ B em citoplasma celular mostrou-se aumentada de maneira significativa em tumor primário ($81.20 \pm 28.37\%$) e em metástase linfonodal ($79.20 \pm 29.2\%$) ($p < 0.001$) quando comparadas com tecido perilesional ($37.00 \pm 32.53\%$). Porém, com relação à marcação nuclear, apenas o tumor ($92.07 \pm 15.07\%$) mostrou imuno-expressão significativamente mais alta que o tecido perilesional ($87.93 \pm 29.03\%$) e que a metástase linfonodal ($81.87 \pm 26.88\%$) ($p = 0.005$) (Tabela 4).

O TNF- α mostrou um aumento de maneira significativa em tumor primário ($74.33 \pm 41.88\%$) quando comparado com tecido perilesional ($48.60 \pm 48.05\%$) e com metástase linfonodal ($60.53 \pm 44.06\%$) ($p < 0.001$) (Tabela 4).

Quando comparados os histoscores obtidos, observa-se que há diferença estatística significativa tanto em COX-2, com aumento de quantidade e de intensidade de marcação em tumor primário (4.85 ± 3.63) e em metástase linfonodal (3.90 ± 3.66) em relação ao tecido perilesional (1.82 ± 2.28) ($p = 0.003$), como em TNF- α , tumor primário com 9.07 ± 3.84 , metástase linfonodal com 7.60 ± 3.33 em relação ao tecido perilesional com 4.93 ± 2.46 ($p < 0.001$) (Tabela 4).

Esse resultado se repete tanto na marcação citoplasmática quanto nuclear do NF- κ B. Observa-se que NF- κ B em núcleo apresenta 8.40 ± 4.27 em tumor primário, 7.60 ± 3.72 em metástase linfonodal e 4.80 ± 2.51 em tecido perilesional ($p < 0.001$). E que NF- κ B em citoplasma apresenta 8.07 ± 4.83 em tumor primário, 4.00 ± 3.55 em metástase linfonodal e 3.87 ± 4.22 em tecido perilesional ($p < 0.001$) (Tabela 4).

4.4 Relação entre o perfil de imuno-marcação de marcadores inflamatórios, de transcrição e proliferação celular em lesão, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca e as demais variáveis clínico-patológicas

O perfil de imuno-marcação também foi avaliado de acordo com as diferentes variáveis clínico-patológicas estudadas.

Não foi observada associação estatisticamente significativa em relação às diferentes porcentagens de imuno-marcação e histoscore dos marcadores estudados nas gradações dos Carcinomas de Células Escamosas, apesar de se observar, de maneira prevalente, em tumor primário e metástase linfonodal um aumento da porcentagem de marcação e de histoscore (Tabela 5).

Em relação ao tamanho dos tumores primários, observa-se que, em tumores de T3 e T4, há uma associação significativa do aumento da porcentagem de imuno-positividade de NF-κB citoplasmático em metástase linfonodal ($89.90 \pm 22.26\%$), quando comparado com tumores de tamanhos T1 e T2 ($67.25 \pm 22.80\%$) ($p=0.005$). Resultado este que se repete com o NF-κB nuclear, no qual se observa que, em tumores com maior tamanho, há uma maior imuno-expressão em metástase linfonodal ($89.85 \pm 22.67\%$) do que em tumores de menores tamanhos ($73.25 \pm 23.94\%$) ($p=0.017$). Em relação ao TNF-α, apresentou uma associação entre a imuno-expressão desse marcador em metástase linfonodal de tumores com tamanho T3 e T4 ($82.67 \pm 36.40\%$; $p=0.043$). O mesmo estudo feito com os histoscores não demonstrou associação de maneira significativa (Tabela 6).

A porcentagem de imuno-marcação de TNF-α mostrou-se significativamente mais expressa em metástase linfonodal dos pacientes que haviam acometimento de N2 ou N3 ($82.00 \pm 35.86\%$) em relação a pacientes com N1 ($39.27 \pm 42.79\%$) ($p=0.009$), o que não foi observado nos outros marcadores estudados. Em relação aos histoscores determinados, observou-se que a imuno-expressão de NF-κB nuclear, em tumor primário, está associada, de maneira significativa, a pacientes sem acometimento linfonodal ou com N1 ($9.44 \pm 3.41\%$; $p=0.027$) (Tabela 7), o que também ocorreu em tumores com estádios 1 e 2 ($95.88 \pm 7.81\%$; $p=0.015$) (Tabela 8).

Ao se associar a imuno-marcação com fatores etiopatogênicos do CEC, observou-se um menor percentual de células marcadas de Ki67 em tecido perilesional de pacientes que fumavam e bebiam ($10.11 \pm 4.91\%$), comparado com aqueles que só fumavam ($17.32 \pm 7.50\%$) ou que não mostraram hábitos ($12.40 \pm 4.16\%$) ($p=0.014$). De maneira contrária, um maior percentual de células marcadas com NF-κB nuclear em tecido perilesional de pacientes que fumavam e bebiam ($99.25 \pm 2.73\%$) quando comparados com os que apenas fumavam ($81.29 \pm 32.31\%$) ($p=0.030$).

Em relação ao TNF-α, também foi observado que, em tecido perilesional, houve um maior percentual de células marcadas em pacientes com os dois hábitos (70.85 ± 42.79), em relação aos que apenas fumavam (43.13 ± 43.11) ($p=0.035$) e, quando avaliado o

histoscore, pacientes que fumavam e bebiam (4.52 ± 4.14) e pacientes que só fumavam (2.03 ± 2.54) ($p=0.030$) (Tabela 9).

Em relação ao tratamento a que os pacientes foram submetidos, o percentual de imuno-marcação de NF-kB nuclear, em tumor primário, mostrou uma diminuição estatisticamente significativa em pacientes que tiveram como modalidade de tratamento a cirurgia associada a radioterapia e a quimioterapia ($84.78 \pm 21.00\%$) em comparação àqueles que se submeteram apenas a cirurgia ($95.20 \pm 9.84\%$) ou a cirurgia associada a radioterapia ($88.55 \pm 20.60\%$) ($p=0.049$), o que também foi demonstrado nos outros marcadores (Tabela 10).

Os histoscores obtidos mostraram uma associação inversa em relação à imuno-expressão de COX-2 em tumor primário, apresentando um maior histoscore em pacientes submetidos a cirurgia associada a radioterapia e quimioterapia (5.47 ± 3.72), em relação àqueles submetidos a cirurgia (2.20 ± 2.62) e associada a radioterapia (3.56 ± 3.82) ($p=0.022$), o que não foi observada associação significativa com os outros marcadores estudados (Tabela 10).

4.5 Relação entre a sobrevida média e o perfil de imuno-marcação de marcadores inflamatórios, de transcrição e proliferação celular em lesão, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca

Observa-se que, em tecido perilesional, há prevalência de imuno-marcação inferior a 30% nas amostras estudadas (31, 93.9%; $p<0.001$). De maneira inversa, em tumor primário, mostrou-se prevalentemente acima de 30% (25, 52.1%). Porém, não se observou diferença estatisticamente significativa na quantidade de pacientes vivos ($p=1.000$), ou na sobrevida ($p=0.730$) dos pacientes em relação à imuno-marcação de Ki67, em tumor primário (Tabela 11).

Em relação ao histoscore de COX-2 tanto em tumor primário (46, 62.2%; $p=0.136$) como em metástase linfonodal (26, 66.7%; $p=0.133$) e tecido perilesional (71, 95.9%; $p<0.001$), houve a prevalência de uma marcação negativa ou fraca e, também, essa imuno-marcação não influenciou na quantidade de pacientes vivos ou na sobrevida ($p=0.352$) (Tabela 11).

De maneira inversa, ocorreu com a imuno-marcação de TNF- α , que influenciou na sobrevida dos pacientes. Em casos com imuno-marcação negativa e fraca, em tumor primário, houve uma maior quantidade de pacientes vivos (31, 96.9%; $p=0.036$), assim como

maior sobrevida (52 ± 1 meses; $p=0,020$). Em tecido perilesional, a maioria dos pacientes (57, 77.0%; $p=0.001$) apresentaram imuno-marcação negativa ou fraca, de maneira significativa, e se observou uma maior quantidade de pacientes vivos (50, 87.7%) e com menor sobrevida (42 ± 3 meses) ($p=0.909$). Em relação à metástase linfonodal, percebeu-se o mesmo perfil de imuno-marcação, com diferença estatística significativa entre a quantidade de pacientes com negativa e fraca (28, 73.7%) em comparação com moderada e intensa (10, 26.3%; $p=0.034$). Essa diferença também foi demonstrada na quantidade de pacientes vivos (25, 89.3%; $p=0.040$), que foi significativamente maior nesse perfil de imuno-marcação, porém não influenciando na sobrevida ($p=0.054$) (Tabela 11) (Figura 3).

A imuno-marcação de NF- κ B tanto nuclear quanto citoplasmática, nas diferentes amostras, não mostrou influência na quantidade de pacientes vivos ou na sua sobrevida. Porém, foi possível observar que NF- κ B nuclear mostrou-se mais significativamente expresso de maneira moderada e intensa (57, 77.0%; $p=0.001$), em tumor primário, negativo e fraco, em tecido perilesional (52, 70.3%; $p=0.012$). E NF- κ B citoplasmático seguiu o mesmo perfil de imuno-marcação. Com maioria significativa em marcação moderada e intensa (56, 75.7%; $p=0.001$), em tumor primário e, em tecido perilesional, negativo e fraca (53, 71.6%; $p=0.007$) (Tabela 11).

4.6 Inter-avaliação entre o percentual e intensidade (histoscore) de imuno-expressão para marcadores inflamatórios, de transcrição e proliferação celular em lesão, perilesão e metástase linfonodal de CEC

Em teste de associação, observa-se que há uma relação direta entre a imuno-marcação moderada e intensa de TNF- α , em tumor primário, com o mesmo perfil de imuno-marcação de COX-2 (24 = 55.8%) ($p<0.001$) e com NF- κ B nuclear (37, 86.0%; $p=0.044$), assim como com marcação acima de 30% de Ki67. Essa mesma associação ocorre com NF- κ B citoplasmático, em tecido perilesional (17, 39.5; $p=0.045$) (Tabela 12) (Figura 4).

O mesmo resultado se repete em COX-2, que mostra associação direta com a imuno-marcação moderada e intensa de NF- κ B nuclear, em tumor primário (27, 93.1%; $p=0.012$) e tecido perilesional (15, 51.7%; $p=0.003$), assim como com NF- κ B citoplasmático, também em tumor primário (27, 93.1%; $p=0.011$) e tecido perilesional (15, 51.7%; $p=0.02$) (Tabela 13) (Figura 4).

Ao ser analisada a marcação negativa ou fraca de NF- κ B nuclear, houve uma relação entre este perfil com a marcação moderada e intensa de TNF- α (6, 50.0%; $p=0.043$) e

COX-2 (7, 58.3%; $p=0.032$), em metástase linfonodal. Ainda em relação ao NF- κ B nuclear, este associa-se com a marcação moderada e intensa de sua variante citoplasmática, em tumor primário (57, 96.6%; $p<0.001$) (Tabela 19). E esta associa-se com marcação moderada e intensa de NF- κ B, em perilesão (22, 37.9%; $p=0.008$) (Tabela 14) (Figura 4).

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, avanços significativos foram feitos na identificação e compreensão dos biomarcadores prognósticos envolvidos na previsão da agressividade do CEC de boca (OLIVEIRA, 2011), apesar de ainda não terem sido achados aqueles mais associados especificamente a essa neoplasia (JONHANNES, 2013). O sistema de classificação TNM não pode prever as características biológicas do microambiente tumoral, sendo incapaz de individualizar o prognóstico. No entanto, é por esse meio que os oncologistas ainda determinam o tratamento mais adequado (OLIVEIRA, 2011; JOHANNES, 2013).

A principal vantagem da identificação de biomarcadores preditivos de prognósticos em CEC de boca com o uso da imuno-histoquímica é o estabelecimento de uma associação entre a morfologia e a expressão desses biomarcadores, que podem ajudar na determinação da sua relevância funcional, além de estabelecer um padrão de expressão. A técnica pode também ser utilizada em espécimes embebidos em parafina e fixados em formol, que podem ser armazenados por um longo tempo, permitindo estudos retrospectivos de grandes populações (DE VICENTE, 2007).

Neste estudo, foi avaliada a imuno-expressão de marcadores inflamatórios, COX-2 e TNF- α , proteínas de transcrição NF- κ B e um marcador de proliferação celular, o KI67. Esses marcadores foram estudados em busca de encontrar uma relação deles com dados clínico-patológicos e com os fatores prognósticos dos pacientes estudados, além de se demonstrar uma correlação de imuno-positividade entre os próprios marcadores.

Em relação aos dados sociodemográficos, neste trabalho, foi observada a prevalência de pacientes do sexo masculino, pardos, analfabetos ou com ensino fundamental incompleto e que entraram no hospital pelo SUS, o que corrobora com outros trabalhos nacionais vistos na literatura (GERVASIO et al., 2001, DANTAS et al., 2016). No entanto, neste estudo, houve prevalência de pacientes com idade inferior aos 60 anos, o que não é comum dentro dos estudos epidemiológicos (ODVEIG, 2014; SATOCHI, 2013; DANTAS et al., 2016; MORAN, 2013), apesar de AYAZ et al. (2011), no Paquistão, terem observado uma maior prevalência de CEC em pacientes com idade inferior a 40 e 65 anos, respectivamente, sendo essa doença mais associada a pacientes mais velhos.

Os dois principais sítios de acometimento foram o assoalho de boca e língua, que são as principais regiões de acometimento de tumor primário (GERVASIO et al., 2001; IAMAROON, 2004; RIVERA et al., 2014; SANTOS, 2010; LOPEZ, 2015), e o principal hábito descrito foi o tabagismo, um hábito ainda muito encontrado em nosso estado e que é o

principal fator etiológico do CEC oral (SALES et al., 2006; DE CONDE, 2012). Os CECs bem diferenciados ou moderadamente diferenciados foram as gradações histológicas majoritariamente levantadas, assim como em outros estudos (DE CONDE, 2012; LOPEZ, 2015; SATOCHI, 2013).

Essa neoplasia maligna ainda tem sido diagnosticada em estádios avançados, em nosso país (WUNSCH FILHO, 2002), e se observa, na literatura, que países em desenvolvimento ainda têm uma deficiência em diagnosticar o CEC oral no início da doença (IAMAROON et al., 2004; DURAZZO et al., 2005; IYPE et al., 2001; OJI, 2007 RIVERA et al., 2014). No presente trabalho, esse resultado mostra concordância, com tumores diagnosticados com tamanho T3 e T4 e estádios III e IV como prevalentes, tratados com cirurgia associada a radioterapia e/ou a quimioterapia, que foram as condutas terapêuticas mais adotadas.

A média de sobrevida de cinco anos apresentada pelos pacientes com Carcinoma de Células Escamosas foi de 49 ± 3 meses. Comparada a outros estudos, é considerada dentro do esperado, por exemplo, se comparada com o estudo de Alvarez (2013), que avaliou tumores em tamanhos menores (T1 e T2) com sobrevida de 80 a 90 meses. No entanto, sabe-se que há uma grande variação na média de sobrevida, dependendo do local do estudo, do tempo de acompanhamento e de fatores socioeconômicos e culturais (CHANDU, 2005; ANTUNES et al., 2001; RAZAK et al., 2010).

Os tamanhos de tumores que influenciaram positivamente na sobrevida dos pacientes foram os T1 e T2, e a cirurgia como modalidade de tratamento. Ambos podem estar correlacionados entre si, visto que um dos norteadores do tratamento do CEC é o TNM (JOHANNES, 2013) e que tumores menores são tratados com cirurgia (DE CONDE, 2012; ALVAREZ, 2013; QUAN LI, 2013). Já é bem descrito na literatura que tumores maiores diminuem a sobrevida dos pacientes com CEC de maneira significativa (DANTAS et al., 2016; ODVEIG, 2014; MORAN, 2013).

Em relação aos marcadores estudados neste trabalho, a expressão da proteína Ki-67 humana é estritamente ligada à proliferação celular. O fato de a proteína Ki-67 não ser expressa em células em repouso (fase G0), e sim durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), torna-a um excelente biomarcador para determinar a fração de células que estão se proliferando em um determinado tumor (OLIVEIRA, 2011).

Alguns trabalhos na literatura têm tentado utilizar o Ki67 como um preditor prognóstico nos CECs em boca, porém ainda é difícil utilizá-lo devido à variedade de resultados que são encontrados (JOHANNES et al., 2013; SILVA et al., 2009). Por exemplo, neste estudo, o Ki67 apresentou-se aumentado, de maneira significativa, em tumores

primários, CECs de língua e em outras localizações que não o assoalho bucal e metástases linfonodais, porém sem associação com os outros fatores clínico-patológicos avaliados e sem influência na sobrevida dos pacientes. Enquanto em uma análise de 113 pacientes com CEC de boca, Myoung et al. (2006) correlacionaram a maior expressão de Ki-67 com a sobrevida acumulada, confirmando que esse biomarcador fornece informações úteis predizendo um pior prognóstico para CEC, conclusão confirmada nos trabalhos de Silva et al. (2008) e Silva et al. (2009).

Lee et al. (2009) mostraram, em seu trabalho, que apesar de existir uma maior imunomarcação de Ki67 em tecido tumoral, observa-se uma associação independente da expressão desse marcador com a sobrevida dos pacientes. Adicionalmente, Johannes et al. (2013) mostram, em seu estudo, que o Ki67, apesar de ser um marcador eficaz no prognóstico de câncer de mama (WEIGEL, 2010), não mostra relação com o curso da progressão de CEC nos pacientes estudados nem impacto no prognóstico.

Quanto à marcação de COX-2, observou-se que a porcentagem de imunomarcação foi significativamente maior em tumor primário e em metástase linfonodal, além de o histoscore negativo e fraco ter sido mais associado a tecido perilesional, porém esse marcador não foi associado a nenhum dado clínico-patológico estudado e também não influenciou na sobrevida dos pacientes do estudo. Resultado similar foi encontrado no estudo realizado por Atula et al. (2006), no qual não foi encontrada nenhuma correlação entre a imunomarcação de COX-2 tanto com os dados clínico-patológicos dos pacientes com câncer como com a sobrevida global. A literatura mostra-se controversa em relação à atividade dessa enzima associada à melhora ou à piora da sobrevida global dos pacientes.

Ranelletti et al. (2001), em análise imuno-histoquímica de 61 casos de CECs de laringe, observaram que a coloração com COX-2 foi associada a uma melhor sobrevida global e a um risco reduzido de recorrência tumoral. Já nos estudos de Gallo et al. (2002) e de Itoh et al. (2003), a análise imuno-histoquímica de CEC em cavidade oral, orofaringe e laringe mostrou que uma coloração intensa de COX-2 estava associada a uma redução da sobrevida global e significativamente mais intensa em tumor primário e em metástase linfonodal, assim como neste trabalho.

Esses resultados podem se mostrar controversos devido às diferentes metodologias utilizadas, localizações de tumor primário diferentes, dentre outros fatores (RANELLETTI et al., 2001; GALLO et al., 2002; ITOH., et al., 2003; BOAS et al., 2010).

Outro marcador fundamental no entendimento da tumorigênese e progressão tumoral é o NF- κ B, uma importante proteína que atua na regulação de mais de 150 genes. Esse fator de

transcrição está associado a genes que se relacionam a diversas funções celulares, como progressão do ciclo celular, regulação da apoptose, inflamação e angiogênese, além de ser implicado em processos malignos com funções como invasão tecidual e metástases a distância (ALLEN, 2007).

Nesta pesquisa, NF- κ B citoplasmático mostrou uma distribuição significativa em tumor primário tanto em relação à porcentagem de marcação quanto a uma marcação moderada e intensa, e em metástase linfonodal, assim como foi associado em tumores com tamanhos T3 e T4. A sua variante nuclear mostrou uma porcentagem de marcação mais significativa em tumor primário, além de ter sido associada a uma maior expressão em tecido perilesional de tumores de tamanhos T3 e T4 e em pacientes que apresentavam linfonodos positivos em N2 e N3.

Assim como neste estudo, Arun et al. (2009) demonstraram que esse marcador está mais expresso em tecido tumoral quando comparado a tecido perilesional e com displasia. Além disso, esses autores mostraram que a ativação nuclear se associa com o aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas, proliferativas e angiogênicas, tais como Bcl-2, Bcl-xl, Cyclina-D1 e VEGF, que promovem o crescimento tumoral.

Ao ser associado a fatores prognósticos, no presente estudo, esse marcador foi mais prevalente em tumores com maiores tamanhos e em pacientes com metástase linfonodal, que são tratados com cirurgia aliada a radioterapia e a quimioterapia. Balermipas (2013) observou que, em pacientes com intensa imuno-expressão de NF- κ B nuclear, houve um menor sucesso da quimioterapia e que este é um importante marcador prognóstico e de sobrevida, assim como Zhang et al. (2005), que relataram que o NF- κ B, em forma nuclear, foi associado a tumores mais agressivos com a redução da sobrevida em 45 pacientes com Carcinoma de Células Escamosas da amígdala.

TNF- α foi mais prevalente em tumores primários e em metástase linfonodal tanto em porcentagem como em histoscore. Sua marcação foi associada diretamente com tumores T3 e T4, N2 e N3 e em tecido perilesional a pacientes que fumavam e bebiam.

Em relação ao histoscore, foi observado que marcações negativas e fracas estavam mais prevalentes tanto em tecido perilesional, metástase linfonodal como em tumor primário, além da fraca marcação associada a sobrevida dos pacientes, com uma maior quantidade de pacientes vivos.

Assim como neste estudo, Biberstein et al. (1995) já haviam demonstrado que essa citocina está em níveis mais elevados em tecido tumoral quando comparado com epitélio

escamoso, assim como seus receptores. Porém, em seu estudo, eles não observaram associação com outras variáveis clínico-patológicas.

O TNF- α é um mediador inflamatório que tem sido implicado tanto na carcinogênese como no processo de progressão tumoral, auxiliando em processos de angiogênese e invasão tumoral (LIN, 2007; LANDSKRON et al., 2014). Porém, sua atividade em relação à progressão tumoral ainda é controversa (LANDSKRON et al., 2014).

Lam-ubol et al. (2010) mostraram, em um trabalho com cultura de células de CEC, que altas concentrações de TNF- α diminuíam a viabilidade celular e, por consequência, a sobrevivência dessas células. Chan et al. (2012) mostraram que novos quimioterápicos causam a morte de células malignas de CEC através da ativação de receptores de TNF- α , independente de mediadores como Bcl-2 e caspase.

Nesta pesquisa, observou-se que, dentro do microambiente tumoral, há uma associação direta entre a imuno-marcação de TNF- α com o mesmo perfil de marcação de COX-2 e NF- κ B nuclear e Ki67.

Essa citocina é reconhecida por dois receptores: α , com maior afinidade, expressa de forma ubíqua, e TNF-R2, expressa principalmente em células imunes. Os receptores de TNF fazem parte de uma grande família de receptores, com domínios extracelulares ricos em cisteína, conservados como trímeros e mecanismos de sinalização intracelular compartilhada, que podem induzir a apoptose e estimular a expressão gênica e inflamação (ABBAS, 2015).

A ligação da citocina com seu receptor leva a, pelo menos, quatro vias de sinalizações (LANDSKRON et al., 2014), porém as duas mais importantes são relacionadas ao receptor TNF-R1. A primeira sinalização é relacionada a aumento da atividade pró-inflamatória e estimulação de fatores de transcrição e, ao se ligar ao receptor, ocorre o recrutamento de proteínas, chamadas de fatores associados ao receptor de TNF (TRAFs), os TRAFs, por sua vez, ativam fatores de transcrição como o NF- κ B e a proteína de ativação 1 (AP-1) que, além de atividade pró-inflamatória, levam a uma atividade anti-apoptótica (CHEN, 2012). A outra sinalização, que ocorre por meio do recrutamento de proteínas adaptadoras, como a de domínio de morte associado ao receptor de TNF (TRADD), leva à ativação de caspase-8, causando a apoptose (SZLOSAREK, 2006). O que pode estar relacionado com a associação encontrada no presente trabalho, em que uma maior quantidade de TNF- α estimula a produção e ativação de NF- κ B, que, por sua vez, aumentará a produção e ativação de proteínas pró-inflamatórias como COX-2, além de contribuir com uma maior proliferação celular.

Ou seja, observamos que a medida que o TNF se expressa via NF- κ B ocorre aumento do tumor. Além disso, essas duas citocinas estão envolvidas na transição da perilesão para lesão. Foi observado também, neste estudo, que o fumo e o álcool estiveram diretamente associados a aumento do Ki-67, TNF e NF- κ B na perilesão, e todos os marcadores aumentaram comparados à lesão. A partir do momento em que a lesão se estabelece, os níveis de TNF, COX-2 e NF- κ B param de interferir, mas os níveis de Ki-67 se mantêm elevados. Quando ocorre metástase linfonodal, os níveis de mediadores pró-inflamatórios decrescem e o ki-67 se mantêm constante, sugerindo que o tumor sofre mudança de comportamento no linfonodo.

O estudo de biomarcadores é relevante, já que podem orientar para a utilização de drogas bloqueadoras, como por exemplo, o infliximab, anticorpo monoclonal inibidor de TNF- α , utilizado em doenças autoimunes (DUARTE, 2010), porém, o aprofundamento dos resultados obtidos a partir de reações de imuno-histoquímica devem ser confirmados através da utilização de metodologias de biologia molecular para se poder determinar o mecanismo pelo qual essa citocina está influenciando na sobrevida dos pacientes e contribuir ainda mais para o estudo do microambiente tumoral do CEC oral

6. CONCLUSÃO

No presente estudo, a mostra foi representada em sua maioria, por pacientes do sexo masculino, pardos, que utilizam o SUS, do interior do estado, fumantes, que apresentam neoplasias em estádios avançados e em região de língua e assoalho bucal. A sobrevida desses pacientes está inversamente associada ao seu grau de escolaridade e ao tamanho do tumor, mostrando a influência de fatores socioeconômicos sobre o prognóstico dos casos de câncer oral.

Dos marcadores avaliados, o TNF- α destacou-se por influenciar a sobrevida dos pacientes, além de estar associado a uma imuno-marcação moderada e intensa de NF- κ B e COX-2, e a uma maior expressão de Ki67.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.
- ALLEN, C.T. et al. Role of activated nuclear factor-kappaB in the pathogenesis and therapy of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck, Marylande*, v. 29, n.10, p. 959-971, 2007.
- ALVAREZ, J. et al. Sentinel node biopsy in relation to survival in floor of the mouth. *Head and Neck Oncology*. v.43, p.269-273, 2014.
- AMAR, L. et al. Qualidade de vida e prognóstico nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. v.68, n. 3, p. 400-403, 2002.
- ANTUNES, J.L.F. et al. Trends and spatial distribution of oral cancer mortality in São Paulo, Brazil 1980 - 1998. **Oral Oncology**. v.37, p.345-350, 2001.
- ARUN, P. et al. Nuclear NF- κ B p65 phosphorylation at Serine 276 by protein kinase A contributes to the malignant phenotype of head and neck cancer. *Clinical Cancer Research*. v.15, n.19, p. 5974–5984, 2009.
- ATULA, T. et al. Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity and pharynx: Association to p53 and clinical outcome. *Oncology Reports*. v.16, p.485-490, 2006.
- AYAZ, B. et al. A clinico-pathological study of oral cancers. *Biomedica*. v.27, p.29-32, 2011.
- BALERMSPAS, P. et al. Nuclear NF-kB Expression Correlates With Outcome Among Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Treated With Primary Chemoradiation Therapy. **International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics**, v.86, n. 4, p. 785-790, 2013.
- BALKIWILL, F; MANTOVANI A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n. 9255, p. 539-345, 2001.
- BASCONES A.B. et al. Epidemiological study of oral cancer patients in Alava province, Spain. **Experimental and Therapeutic Medicine**. Spain, v.2, n. 5 p.937-940, 2011.
- BIBERSTEIN, S.E. et al. Enhanced Tumor Cell Expression of Tumor Necrosis Factor Receptors in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **The American Journal Of Surgery**. v.170, p. 417-422, 1995.
- BOAS, D.S. et al., Immunohistochemical detection of Ki-67 is not associated with tumor-infiltrating macrophages and cyclooxygenase-2 in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine**. v.39, p. 565-570, 2010.

BRASIL, Câncer, IN, Silva, JAG. Estimativa 2014, Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Inca, 2014 118p, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde; Instituto Nacional de câncer (INCA). TNM: Classificação de tumores malignos. 6ª ed, Rio de Janeiro, Inca, 2004 250p.

BRASIL. CID-0: Classificação Internacional de Doenças para Oncologia, 3ª ed, São Paulo, Edusp, 2005 247p.

BRINKMAN, B.M., WONG, D.T. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. **Current Opinion in Oncology**, v.18, p. 228-233, 2006.

CHAN, L.P. 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. *Biochimica et Biophysica Acta*. v.1820, p.1081–1091, 2012.

CHANDU, A.; ADAMS, G.; SMITH, A.C.H. Factors affecting survival in patients with oral cancer: an Australian perspective. **International Journal Oral Maxillofacial Surgery**. v.34, p.514–520, 2005.

CHEN, C.; FAROOQUI, M.; GUPTA, K. Morphine stimulates vascular endothelial growth factor-like signaling in mouse retinal endothelial cells. **Current Neurovascular Research**. v. 3, p.171-80,2006.

CHEN, M.F. et al. Role of interleukin 1 beta in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Molecular Medicine, Taiwan*, v. 90, n.1, p. 89-100, 2012.

COSTA, D.L. Papel da inflamação no desenvolvimento tumoral: potencial terapêutico dos inibidores da cox-2. 63f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade De Medicina da Universidade de Coimbra, Março, 2010.

COURTOIS, G.E GILMORE, T. D. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*. v.25, n.51, p. 6831-6843, 2006.

DANTAS, T.S. 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**. v.95, n.3, p. 2314, 2016.

DE CONDE, A. et al. Squamous cell carcinoma of buccal mucosa: a 40-year review. *American Journal of Otolaryngology–Head and Neck Medicine and Surgery*. v.33, p.673–677, 2012.

DE VICENTE, J.C; et al. Expression of MMP-7 and MT1-MMP in oral squamous cell carcinoma as predictive indicator for tumor invasion and prognosis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**. v.36, p. 415–24, 2007.

DUARTE, A.T.; CHERIN, F.B. Psoríase moderada a grave tratada com infliximabe em 53 pacientes: perfil dos pacientes, eficácia e efeitos adversos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 2010.

- DURAZZO, M.D. 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**, v.60, p.293-298, 2005.
- EIRÓ, N. et al. Relationship between the inflammatory molecular profile of breast carcinomas and distant metastasis development. **Public Library of Science**. Spain, v. 7, n.11, p. e49047, 2012.
- GALLO, O. et al. Prognostic Significance of Cyclooxygenase-2 Pathway and Angiogenesis in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Human Pathology**. v.33, n.7, p. 708-714, 2002.
- GERVASIO, O.L.A.S. et al. Oral Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Study of 740 Cases in a Brazilian Population. **Brazilian Dental Journal**. v.12, p.57-61, 2001.
- GOZZANI, J.L. Opioides e antagonistas. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 44, p.65-73, 1994.
- HADDAD, R. I.; SHIN, D. M. Recent advances in head and neck cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 11, p. 1143-54, Sep 11 2008.
- HEO, K. et al. Hypoxia-induced up-regulation of apelin is associated with a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. **Oral Oncology**, v. 48, n. 6, p. 500-6, Jun 2012.
- HUSSAIN, S.P.; HARRIS, C.C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. **International Journal of Cancer**, Inglaterra, v. 121, n. 11, p. 2373-2380, 2007.
- IAMAROON, A. et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. **International Journal of Maxillofacial Surgery**. v.33, p.84-88, 2004.
- ITOH, S. et al. Immunohistochemical study on overexpression of cyclooxygenase-2 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: its importance as a prognostic predictor. **Oral Oncology**. v.39, p.829-835, 2003.
- IYPE, E.M. et al. Oral cancer among patients under the age of 35 years. **Journal of Postgraduate Medicine**. v.47, p.171-176, 2001.
- JADOTTE Y.T., SCHWARTZ, R.A. Solar cheilosis: An ominous precursor: Part I. Diagnostic insights. **Journal American of Academy of Dermatology**, v.66, p.173-84, 2012.
- JOHANNES, D. et al. Prognostic Markers in Stage I Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. **The American Laryngological, Rhinological and Otological Society, Inc.** v.123, p. 2435-2441, 2013.
- KEKATPURE, V.D. et al. Factors predicting outcome after salvage treatment for stage IV oral squamous cell carcinoma: Evidence of the potential importance of the cyclooxygenase-2–prostaglandin E2 pathway. **Wiley Online Library**. Agosto, 2015.
- KLIPPEL, J.H., WEYAND, C.M., WORTAMANN, R.L. Primer in the rheumatic diseases. **Ed Arthritis Foudation**. p.583-91, Georgia, 2001.

- KONO, M. et al. Cyclo-Oxygenase–2 Expression Is Associated With Vascular Endothelial Growth Factor C Expression and Lymph Node Metastasis in Oral Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.71, p.1694-1702, 2013.
- LAM-UBOL A. et al. Squamous Carcinoma Cells Influence Monocyte Phenotype and Suppress Lipopolysaccharide-Induced TNF-alpha in Monocytes. *Inflammation*, v.33, n.4, p. 207-223, 2010.
- LANDSKRON, G. et al. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *Journal of Immunology Research, Chile*, v. 2014, p. 1-5, 2014.
- LEE, J.I. et al. Prognostic significance of CXCR-4 expression in oral squamous cell carcinoma. **Oral and Maxillofacial Pathology**. v.107, n. 5, p. 678-684, 2009.
- LIN, W.W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of Clinical Investigation*, v.117, n.5, p. 1175-1183, 2007.
- LIU, F. et al. TBL1XR1 Is Highly Expressed in Gastric Cancer and Predicts Poor Prognosis. **Dis Markers**, 2016.
- LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYEYASU, HIROFUME. *Oncologia para Graduação*. 3ª ed, Lemar, 2013.
- LÓPEZ, J.L.; LLANO, J.A. A 22 years survival and prognostic factors analysis in a homogeneous series of 64 patients with advanced cancer of the tongue and the floor of the mouth. *Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery*. v.43, p. 376-381, 2015.
- MYOUNG, H. et al. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. **International Journal Oral and Maxillofacial Surgery**. v.35, p. 1005–1010, 2006.
- MORAN, A. et al. Improvement in Survival of Patients With Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: An International Collaborative Study. **American Cancer Society**. v.119, p.4242-4248, 2013.
- NIU, L.X. et al. Prognostic Factors of Squamous Cell Carcinoma of the Buccal Mucosa: A Retrospective Study of 168 Cases in North China. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.72, p.2344-2350, 2014.
- ODDVEIG, G.R. et al. Clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma in Northern Norway: a retrospective study. **BMC Oral Health**. v.14, n.103, p. 2-9, 2014.
- OJI, C.; CHUKWUNEKE, F.N. Oral cancer in Enugu, Nigeria, 1998–2003. **Brazilian Journal Oral Maxillofacial Surgery**. v.45 p.298-301, 2007.
- OLIVEIRA, L.R.; SILVA, A.R. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.40, p. 298-307, 2011.

- PIVA, M.R. et al. Role of inflammation in oral carcinogenesis (Part II): CD8, FOXP3, TNF- α , TGF- β and NF- κ B expression. *Oncology Letters*, Brazil, v. 5, n.6, p. 1909-1914, 2013.
- POPA, C, et al. The role of TNF- α in chronic inflammatory conditions, intermediary metabolism, and cardiovascular risk. *The Journal of Lipid Research*, v. 48, p. 751-762, 2007.
- QUAN LI, M.D. et al. Survival impact of cervical metastasis in squamous cell carcinoma of hard palate. *Oral and Maxillofacial Surgery*. v.116, n.1, p. 23-27, 2013.
- RANELLETTI, et al. Prognostic significance of cyclooxygenase-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**. v.95, p. 343-349, 2001.
- RAZAK A.A. et al. Oral Cancer Survival among Malay Patients in Hospital Universiti Sains Malaysia, Kelantan. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**,v.11, p.187-191, 2010.
- RIVERA, C. et al. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in Chilean population. **Int J Clin Exp Pathol**, v.7, n.9, p.5968-5977, 2014.
- SALES. M.P.U. et al. Ambulatório de apoio ao tabagista no Ceará: perfil dos pacientes e fatores associados ao sucesso terapêutico. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**. v.32, p.410-417, 2006.
- SANTOS, L.C.O.; BATISTA, O.M.; CANGUSSU, M.T. Characterization of oral cancer diagnostic delay in the state of Alagoas. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**. v.76, p.416-422, 2010.
- SATOCHI S. et al. Risk Factors for Distant Metastasis in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. v.71, p. 1291-1297, 2013.
- SCULLY, C. Oral cancer; evidence for sexual transmission. **British Dental Journal**, v.199, n.4, p.203-207, Aug. 2005.
- SIDRANSKY D. (Eds.): World Health. Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and. Neck Tumours. IARC Press: Lyon 2005.
- SILVA, P.G.B. et al. Immune cellular profile of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. **Oral Disease**. v. 22, n. 7, p.649-657, 2016.
- SILVA, S.D. et al. Clinicopathological significance of ubiquitin-specific protease 2a (USP2a), fatty acid synthase (FASN), and ErbB2 expression in oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncology**. v.45, p.134-139, 2009.
- SILVA, S.D. et al. ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: Correlation with clinical outcomes. **Oral Oncology**. v.44, p.484-490, 2008.
- SOLOMON, D. H. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and acute myocardial infarction. **Archives of Internal Medicine**. v.162, n.10, p. 1099-1104, 2002.
- SZLOSAREK, P. et al. Tumour necrosis factor- α as a tumour promoter. *European Journal of Cancer*. v.42, p. 745-750, 2006.

WEIGEL, M.T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocrine Related Cancer**. v.17, p.245-262, 2010.

WONG Y.K., et al. Socio-demographic factors in the prognosis of oral cancer patients. **Oral Oncology**, v.42, n.9, p.893-906, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Pathology & Genetics Head and Neck Tumours. 4^a ed, Geneva, International Agency for Research on Cancer, 2005 165p.

WUNSCH-FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. **Oral Oncology**. v.38, p.737-746, 2002.

ZHANG, J., MULLER, J.F., MCDONALD, A.J. mu opioid receptor localization in the basolateral amygdala: an ultrastructural analysis. **Neuroscience**, v.303, p. 352–363, 2015.

ZHANG, P.L. et al. Overexpression of phosphorylated nuclear factor-kappa B in tonsillar squamous cell carcinoma and high-grade dysplasia is associated with poor prognosis. **Modern Pathology**. v.18, p. 924–932, 2005.

APÊNDICE 1:**Tabela 1** – Estadiamento dos Tumores em Região de Cabeça e Pescoço

Estádio	T	N	M
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T1, T2, T3	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Estádio IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	
Estádio IVB	Qualquer T	N3	M0
	T4b	Qualquer N	
Estádio IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: BRASIL, 2004.

Tabela 2 – Anticorpos utilizados para imuno-histoquímica.

Anticorpo	Marca	Diluição	Controle positivo
TNF-α	Abcam®	1:100	Granuloma Piogênico
COX 2	Abcam®	1:200	Granuloma Piogênico
NFκB p65	Abcam®	1:100	Granuloma Piogênico
Ki-67	Dako®	Pronto para uso	Linfonodo humano

Tabela 3 – Perfil sociodemográfico, clínico-patológico e sobrevida em 5 anos de acompanhamento dos pacientes diagnosticados com câncer de boca no Hospital Haroldo Juaçaba (2011-2016).

	Amostra			Vivos			Sobrevida	
	n	%	p-valor ^a	n	%	p-valor ^a	Média±EPM	p-valor ^b
Geral	76	100.0%	-			-	49±3	-
Localizacão								
Assoalho de boca	35	46.1%	0.124	28	80.0%	0.217	35±3	0,291
Língua	26	34.2%		23	95.8%		49±5	
Outros	15	19.7%		13	86.7%		52±5	
Gradação histológica								
Bem/moderadamente diferenciado	71*	93.4%	* <0.001	60	87.0%	0.527	50±3	0,614
Pobrememente diferenciado	5	6.6%		4	80.0%		23±1	
Convenio								
SUS	73*	96.1%	* <0.001	61	85.9%	1.000	48±3	0,331
Plano de saúde/Privado	3	3.9%		3	100.0%		34±4	
T								
T1/2	29	38.2%	0.141	28*	100.0%	* 0.011	59±1*	* 0,032
T3/4	47	61.8%		36	78.3%		45±4	
N								
N0/1	50*	65.8%	* 0.049	44	91.7%	0.151	52±4	0,151
N2/3	26	34.2%		20	76.9%		38±4	
M								
M0	74*	97.4%	* <0.001	63	87.5%	0.254	50±3	0,297
M1	2	2.6%		1	50.0%		23±10	
Estádio								
Estádio 1 e 2	16	21.1%	* <0.001	15	100.0%	0.197	52±4	0,125
Estádio 3 e 4	60*	78.9%		49	83.1%		47±3	
Sexo								
Masculino	50*	65.8%	* 0.049	40	81.6%	0.149	39±3	0,140
Feminino	26	34.2%		24	96.0%		56±4	
Cor								

Pardo	61	80.3%	*<0.001	51	86.4%	1.000	42±3	0,680
Não Pardo	15	19.7%		13	86.7%		50±6	
Procedência								
Capital	25	32.9%	*0.032	21	84.0%	0.725	47±5	0,752
Interior	51	67.1%		43	87.8%		43±3	
Estado civil								
Com vínculo matrimonial	55	72.4%	*0.005	48	88.9%	0.444	45±3	0,470
Sem vínculo matrimonial	21	27.6%		16	80.0%		46±6	
Hábitos								
Fuma	30	39.5%	0.672	28	93.3%	0.280	45±3	0,483
Fuma e bebe	21	27.6%		18	85.7%		45±5	
Não fuma/bebe	25	32.9%		18	78.3%		44±6	
Idade								
Até 60 anos	43	56.6%	0.416	34	82.9%	0.496	42±4	0,356
Mais de 60 anos	33	43.4%		30	90.9%		52±4	
Instrução								
Analfabeto/1º Grau Incompleto	39	51.3%	0.871	30	76.9%	*0.015	44±4	0,062
1º Grau incompleto/2º Grau/Superior	37	48.7%		34*	97.1%		52±2	
Tratamento realizado								
Cirurgia	10	13.5%	*0.017	10*	100.0%	*0.037	24±8	0,074
Cirurgia + RT	32*	43.2%		30*	93.8%		55±3	
Cirurgia + RT + QT	32*	43.2%		24	75.0%		36±5	

*p<0.05. ^aTeste qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher; ^bTeste Long-Rank Mantel-Cox. (Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual).

Tabela 4 – Perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca.

	Média±DP	p-Valor
Percentual de células marcadas		
Ki67		
Perilesão	17.13±8.20	*<0.001
Tumor	34.50±19.31 ^a	
Metástase linfonodal	35.19±26.76 ^a	
COX-2		
Perilesão	39.20±41.07	0.710
Tumor	63.13±44.87	
Metástase linfonodal	77.33±32.64	
NF-κB citoplasma		
Perilesão	37.00±32.53	*<0.001
Tumor	81.20±28.37 ^a	
Metástase linfonodal	79.20±29.20 ^a	
NF-κB núcleo		
Perilesão	87.93±29.03	*0.005
Tumor	92.07±15.07 ^a	
Metástase linfonodal	81.87±26.88	
TNF-α		
Perilesão	48.60±48.05	*<0.001
Tumor	74.33±41.88 ^a	
Metástase linfonodal	60.53±44.06	
Histoscore		
COX-2		
Perilesão	1.82±2.28	*0.003
Tumor	4.85±3.63 ^a	
Metástase linfonodal	3.90±3.66 ^b	
TNF-α		
Perilesão	4.93±2.46	*<0.001
Tumor	9.07±3.84 ^a	
Metástase linfonodal	7.60±3.33 ^b	
NF-κB núcleo		
Perilesão	4.80±2.51	*<0.001
Tumor	8.40±4.27 ^a	
Metástase linfonodal	7.60±3.72 ^b	
NF-κB citoplasma		
nnPerilesão	3.87±4.22	*<0.001
Tumor	8.07±4.83 ^a	
Metástase linfonodal	4.00±3.55 ^b	

Dados expressos em forma de média e desvio-padrão

^ap<0.05 versus Perilesão. ^bp<0.05 versus Tumor; Teste de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney (média ± DP).

Tabela 5 – Relação entre o perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca e a gradação histológica do tumor primário.

	Gradação histológica		p-Valor
	Bem	Moderadamente	
Percentual de células marcadas			
Ki67			
Perilesão	14.77 \pm 7.15	12.00 \pm 8.49	0.545
Tumor	32.71 \pm 16.15	36.00 \pm 19.52	0.654
Metástase linfonodal	37.06 \pm 26.37	30.00 \pm 12.00	0.999
COX-2			
Perilesão	44.08 \pm 40.14	67.33 \pm 28.73	0.177
Tumor	53.56 \pm 43.66	74.40 \pm 43.32	0.264
Metástase linfonodal	81.30 \pm 28.78	100.00 \pm 0.00	0.220
NF-κB citoplasma			
Perilesão	51.42 \pm 32.39	40.33 \pm 38.63	0.521
Tumor	84.53 \pm 22.57	92.40 \pm 4.93	0.940
Metástase linfonodal	82.15 \pm 24.82	100.00 \pm 0.00	0.059
NF-κB núcleo			
Perilesão	89.29 \pm 26.64	100.00 \pm 0.00	0.321
Tumor	87.90 \pm 19.52	89.20 \pm 21.95	0.384
Metástase linfonodal	83.96 \pm 24.40	100.00 \pm 0.00	0.059
TNF-α			
Perilesão	59.90 \pm 44.37	75.25 \pm 46.23	0.399
Tumor	72.60 \pm 39.10	78.80 \pm 27.23	0.892
Metástase linfonodal	64.21 \pm 43.99	96.00 \pm 5.66	0.470
Histoscore			
COX-2			
Perilesão	2.04 \pm 2.16	1.20 \pm 1.79	0.301
Tumor	4.08 \pm 3.83	5.80 \pm 3.03	0.230
Metástase linfonodal	3.89 \pm 3.83	8.00 \pm 0.00	0.124
TNF-α			
Perilesão	3.68 \pm 3.92	2.60 \pm 1.95	0.880
Tumor	6.32 \pm 4.76	7.20 \pm 3.63	0.684
Metástase linfonodal	3.19 \pm 3.57	8.00 \pm 0.00	0.075
NF-κB núcleo			
Perilesão	4.45 \pm 2.95	4.00 \pm 4.00	0.764
Tumor	8.69 \pm 3.84	8.80 \pm 4.38	0.866
Metástase linfonodal	5.05 \pm 4.58	10.00 \pm 2.83	0.147
NF-κB citoplasma			
Perilesão	4.28 \pm 2.99	4.00 \pm 4.00	0.869
Tumor	8.49 \pm 3.97	9.60 \pm 3.58	0.554
Metástase linfonodal	5.00 \pm 4.74	10.00 \pm 2.83	0.153

Dados expressos em forma de média e desvio-padrão

* $p < 0.05$. Teste de Mann-Whitney (média \pm DP).

Tabela 6 – Relação entre o perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca e o tamanho do tumor primário.

	Tamanho do tumor		p-Valor
	T1/2	T3/4	
Percentual de células marcadas			
Ki67			
Perilesão	15.79 \pm 9.62	13.74 \pm 4.62	0.443
Tumor	37.20 \pm 18.54	29.86 \pm 13.76	0.187
Metástase linfonodal	39.56 \pm 28.42	34.56 \pm 25.61	0.757
COX-2			
Perilesão	44.21 \pm 37.18	45.82 \pm 42.14	0.916
Tumor	56.66 \pm 44.68	53.87 \pm 43.47	0.691
Metástase linfonodal	74.64 \pm 31.04	87.44 \pm 25.93	0.139
NF-κB citoplasma			
Perilesão	45.61 \pm 31.65	54.92 \pm 32.86	0.205
Tumor	84.86 \pm 22.21	85.17 \pm 21.98	0.720
Metástase linfonodal	67.25 \pm 22.80	89.90 \pm 22.26*	*0.005
NF-κB núcleo			
Perilesão	90.39 \pm 24.57	89.32 \pm 27.54	0.611
Tumor	92.18 \pm 12.88	85.49 \pm 22.34	0.173
Metástase linfonodal	73.25 \pm 23.94	89.85 \pm 22.67*	*0.048
TNF-α			
Perilesão	55.86 \pm 46.77	64.62 \pm 42.53	0.312
Tumor	66.45 \pm 42.14	77.15 \pm 35.55	0.321
Metástase linfonodal	35.33 \pm 43.39	79.62 \pm 36.58*	*0.017
Histoscore			
COX-2			
Perilesão	2.31 \pm 2.02	1.79 \pm 2.21	0.121
Tumor	4.21 \pm 3.64	4.19 \pm 3.93	0.878
Metástase linfonodal	4.42 \pm 3.34	3.96 \pm 4.08	0.552
TNF-α			
Perilesão	3.83 \pm 3.94	3.47 \pm 3.79	0.697
Tumor	5.69 \pm 4.49	6.81 \pm 4.79	0.281
Metástase linfonodal	1.73 \pm 2.49	4.11 \pm 3.83	0.084
NF-κB núcleo			
Perilesão	5.00 \pm 2.70	4.06 \pm 3.14	0.139
Tumor	8.66 \pm 3.25	8.72 \pm 4.20	0.590
Metástase linfonodal	3.92 \pm 4.60	5.89 \pm 4.57	0.231
NF-κB citoplasma			
Perilesão	4.66 \pm 2.77	4.02 \pm 3.19	0.364
Tumor	8.41 \pm 3.55	8.66 \pm 4.19	0.538
Metástase linfonodal	3.50 \pm 4.68	6.00 \pm 4.68	0.160

Dados expressos em forma de média e desvio-padrão

*p<0.05. Teste de Mann-Whitney (média \pm DP).

Tabela 7 – Relação entre o perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca com a presença de metástase linfonodal.

	Metástase Linfonodal		p-Valor
	N0/1	N2/3	
Percentual de células marcadas			
Ki67			
Perilesão	14.64 \pm 7.81	14.50 \pm 4.69	0.966
Tumor	34.31 \pm 17.82	29.15 \pm 10.10	0.702
Metástase linfonodal	38.53 \pm 28.70	29.67 \pm 6.81	0.953
COX-2 citoplasma			
Perilesão	48.86 \pm 39.49	38.17 \pm 40.37	0.230
Tumor	50.69 \pm 43.60	62.96 \pm 43.49	0.185
Metástase linfonodal	77.00 \pm 31.44	86.53 \pm 25.83	0.560
NF-κB citoplasma			
Perilesão	54.07 \pm 31.66	44.73 \pm 33.78	0.374
Tumor	85.63 \pm 20.86	83.96 \pm 24.18	0.933
Metástase linfonodal	76.10 \pm 26.18	87.50 \pm 22.99	0.578
NF-κB núcleo			
Perilesão	91.12 \pm 24.83	87.18 \pm 28.88	0.640
Tumor	90.59 \pm 16.13	83.08 \pm 24.31	0.344
Metástase linfonodal	75.60 \pm 23.37	90.39 \pm 23.06	0.116
TNF-α			
Perilesão	62.42 \pm 44.38	57.77 \pm 44.93	0.544
Tumor	70.51 \pm 39.25	77.73 \pm 36.77	0.630
Metástase linfonodal	39.27 \pm 42.79	82.00 \pm 35.86*	*0.009
COX-2			
Perilesão	2.10 \pm 1.91	1.77 \pm 2.55	0.172
Tumor	3.64 \pm 3.71	5.27 \pm 3.80	0.071
Metástase linfonodal	4.33 \pm 3.66	3.96 \pm 4.00	0.686
TNF-α			
Perilesão	3.90 \pm 4.05	3.04 \pm 3.36	0.461
Tumor	6.06 \pm 4.73	7.00 \pm 4.60	0.379
Metástase linfonodal	2.64 \pm 4.16	3.88 \pm 3.32	0.182
NF-κB núcleo			
Perilesão	4.80 \pm 3.10	3.69 \pm 2.71	0.121
Tumor	9.44 \pm 3.41*	7.27 \pm 4.28	*0.027
Metástase linfonodal	5.07 \pm 5.24	5.44 \pm 4.30	0.907
NF-κB citoplasma			
Perilesão	4.50 \pm 3.24	3.81 \pm 2.58	0.338
Tumor	9.12 \pm 3.84	7.50 \pm 3.96	0.068
Metástase linfonodal	4.93 \pm 5.60	5.44 \pm 4.30	0.815

Dados expressos em forma de média e desvio-padrão

*p<0.05. Teste de Mann-Whitney (média \pm DP).

Tabela 8 – Relação entre o perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca e o estadiamento do tumor primário.

	Estadiamento		p-Valor
	Estádio 1 e 2	Estádio 3 e 4	
Percentual de células marcadas			
Ki67			
Perilesão	17.90 \pm 9.98	13.17 \pm 5.08	0.107
Tumor	40.57 \pm 19.76	29.76 \pm 13.53	0.107
Metástase linfonodal	38.43 \pm 20.96	36.18 \pm 30.27	0.683
COX-2			
Perilesão	51.40 \pm 39.98	43.29 \pm 39.98	0.473
Tumor	54.13 \pm 43.86	55.17 \pm 43.99	0.915
Metástase linfonodal	-	82.59 \pm 28.15	-
NF-κB citoplasma			
Perilesão	61.33 \pm 24.10	47.78 \pm 34.13	0.233
Tumor	91.19 \pm 8.32	83.39 \pm 24.12	0.625
Metástase linfonodal	-	83.43 \pm 24.33	-
NF-κB núcleo			
Perilesão	98.27 \pm 4.59	87.24 \pm 29.25	0.228
Tumor	95.88 \pm 7.81*	85.85 \pm 21.19	*0.015
Metástase linfonodal	-	85.11 \pm 23.85	-
TNF-α			
Perilesão	78.80 \pm 35.07	55.46 \pm 45.61	0.079
Tumor	77.44 \pm 39.86	71.81 \pm 38.15	0.241
Metástase linfonodal	-	66.33 \pm 43.22	-
Histocore			
COX-2			
Perilesão	2.69 \pm 2.47	1.80 \pm 2.02	0.154
Tumor	4.25 \pm 3.87	4.18 \pm 3.81	0.927
Metástase linfonodal	-	4.10 \pm 3.84	-
TNF-α			
Perilesão	5.00 \pm 3.79	3.23 \pm 3.78	0.065
Tumor	7.44 \pm 4.26	6.10 \pm 4.78	0.351
Metástase linfonodal	-	3.44 \pm 3.64	-
NF-κB núcleo			
Perilesão	5.50 \pm 2.48	4.13 \pm 3.08	0.084
Tumor	9.38 \pm 2.99	8.52 \pm 4.04	0.604
Metástase linfonodal	-	5.30 \pm 4.61	-
NF-κB citoplasma			
Perilesão	5.44 \pm 2.53	3.95 \pm 3.09	0.063
Tumor	9.38 \pm 2.99	8.35 \pm 4.14	0.523
Metástase linfonodal	-	5.25 \pm 4.76	-

Dados expressos em forma de média e desvio-padrão

*p<0.05. Teste de Mann-Whitney (média \pm DP).

Tabela 9 – Relação entre o perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca e os hábitos deletérios dos pacientes.

	Hábitos			p-Valor
	Não fuma/bebe	Fuma	Fuma e bebe	
Percentual de células marcadas				
Ki67				
Perilesão	12.40 \pm 4.16	17.32 \pm 7.50	10.11 \pm 4.91 ^b	*0.014
Tumor	31.71 \pm 9.13	31.64 \pm 17.53	36.67 \pm 20.25	0.729
Metástase linfonodal	31.21 \pm 8.15	37.06 \pm 26.37	30.0 \pm 12.65	0.987
COX-2				
Perilesão	49.09 \pm 38.74	33.42 \pm 35.16	54.85 \pm 44.48	0.224
Tumor	59.96 \pm 44.70	50.72 \pm 42.32	54.81 \pm 45.74	0.623
Metástase linfonodal	81.09 \pm 33.97	75.75 \pm 29.51	89.70 \pm 20.13	0.504
NF-κB citoplasma				
Perilesão	53.43 \pm 35.97	43.00 \pm 29.83	57.75 \pm 31.11	0.366
Tumor	86.42 \pm 20.78	87.03 \pm 16.96	80.67 \pm 28.90	0.838
Metástase linfonodal	72.33 \pm 32.58	87.88 \pm 17.42	89.27 \pm 19.31	0.368
NF-κB núcleo				
Perilesão	90.48 \pm 28.23	81.29 \pm 32.31 ^a	99.25 \pm 2.73 ^b	*0.030
Tumor	87.71 \pm 22.00	91.07 \pm 11.01	83.90 \pm 25.44	0.925
Metástase linfonodal	73.00 \pm 35.49	92.63 \pm 13.16	89.55 \pm 14.43	0.355
TNF-α				
Perilesão	70.27 \pm 42.85	43.13 \pm 43.11 ^a	70.85 \pm 42.79 ^b	*0.035
Tumor	73.44 \pm 36.60	77.55 \pm 36.54	66.24 \pm 43.32	0.483
Metástase linfonodal	65.11 \pm 45.98	59.67 \pm 44.72	72.25 \pm 43.10	0.502
Histoscore				
COX-2				
Perilesão	2.16 \pm 1.89	1.63 \pm 2.33	2.29 \pm 2.17	0.247
Tumor	4.60 \pm 3.72	3.63 \pm 3.63	4.52 \pm 4.18	0.630
Metástase linfonodal	5.31 \pm 4.31	2.64 \pm 3.63	4.46 \pm 3.28	0.157
TNF-α				
Perilesão	4.72 \pm 4.31	2.03 \pm 2.54 ^a	4.52 \pm 4.14 ^b	*0.030
Tumor	7.44 \pm 5.20	6.00 \pm 4.17	5.67 \pm 4.70	0.363
Metástase linfonodal	4.08 \pm 4.44	2.07 \pm 2.43	4.31 \pm 3.75	0.307
NF-κB núcleo				
Perilesão	4.68 \pm 3.15	3.30 \pm 2.73	5.71 \pm 2.70	0.015
Tumor	8.80 \pm 4.37	8.93 \pm 3.44	8.24 \pm 3.87	0.731
Metástase linfonodal	4.15 \pm 4.79	5.00 \pm 4.76	6.77 \pm 4.23	0.296
NF-κB citoplasma				
Perilesão	4.28 \pm 3.26	3.43 \pm 2.66	5.43 \pm 2.99	0.080
Tumor	8.84 \pm 4.32	8.37 \pm 3.90	8.52 \pm 3.67	0.745
Metástase linfonodal	4.00 \pm 4.90	4.86 \pm 4.75	6.92 \pm 4.52	0.232

Dados expressos em forma de média e desvio-padrão

^ap<0.05 versus Não fumante/não etilista. ^bp<0.05 versus Fumante; Teste de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney (média ± DP).

Tabela 10 – Relação entre o perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca e o tratamento realizado.

	Tratamento realizado			p-Valor
	Cirurgia	Cirurgia + RT	Cirurgia + RT + QT	
Percentual de células marcadas				
Ki67				
Perilesão	19.63 \pm 7.54	13.09 \pm 4.95	12.93 \pm 7.40	0.027
Tumor	33.78 \pm 17.65	33.95 \pm 14.36	31.42 \pm 17.93	0.860
Metástase linfonodal	36.57 \pm 18.55	42.71 \pm 33.57	28.00 \pm 28.52	0.630
COX-2				
Perilesão	53.50 \pm 40.30	35.70 \pm 38.07	52.97 \pm 41.62	0.274
Tumor	36.30 \pm 41.00	48.29 \pm 46.27	67.53 \pm 38.84	0.058
Metástase linfonodal	-	83.83 \pm 25.87	80.56 \pm 31.02	0.614
NF-κB citoplasma				
Perilesão	47.88 \pm 14.43	51.38 \pm 37.13	49.34 \pm 32.10	0.909
Tumor	87.90 \pm 10.18	81.90 \pm 26.19	86.59 \pm 20.78	0.697
Metástase linfonodal	-	84.22 \pm 23.59	83.33 \pm 26.01	0.979
NF-κB núcleo				
Perilesão	96.75 \pm 6.04	88.00 \pm 28.35	88.76 \pm 28.39	0.734
Tumor	95.20 \pm 9.84	88.55 \pm 20.60 ^b	84.78 \pm 21.00 ^a	*0.049
Metástase linfonodal	-	87.44 \pm 17.17	84.00 \pm 27.57	0.835
TNF-α citoplasma				
Perilesão	77.75 \pm 36.15	48.77 \pm 46.62	64.34 \pm 43.30	0.178
Tumor	77.60 \pm 41.52	69.19 \pm 38.94	76.59 \pm 36.39	0.590
Metástase linfonodal	-	47.00 \pm 44.40	81.06 \pm 37.34	0.038
Histocore				
COX-2				
Perilesão	1.90 \pm 1.66	1.75 \pm 2.08	2.28 \pm 2.40	0.542
Tumor	2.20 \pm 2.62	3.56 \pm 3.82 ^b	5.47 \pm 3.72 ^a	*0.022
Metástase linfonodal	-	4.44 \pm 3.78	3.87 \pm 4.03	0.585
TNF-α				
Perilesão	3.40 \pm 2.99	3.09 \pm 4.14	3.78 \pm 3.54	0.367
Tumor	6.50 \pm 4.14	5.50 \pm 4.46	7.22 \pm 4.96	0.344
Metástase linfonodal	-	2.13 \pm 2.80	4.39 \pm 3.94	0.075
NF-κB núcleo				
Perilesão	3.60 \pm 2.27	4.44 \pm 3.17	4.44 \pm 3.03	0.750
Tumor	9.00 \pm 2.87	8.72 \pm 3.75	8.38 \pm 4.29	0.980
Metástase linfonodal	-	4.44 \pm 5.05	5.61 \pm 4.21	0.396
NF-κB citoplasma				
Perilesão	3.50 \pm 2.27	4.00 \pm 3.30	4.53 \pm 2.93	0.645
Tumor	9.00 \pm 2.87	8.22 \pm 4.26	8.56 \pm 3.99	0.954
Metástase linfonodal	-	4.38 \pm 5.07	5.57 \pm 4.47	0.436

Dados expressos em forma de média e desvio-padrão

^ap<0.05 versus Cirurgia. ^bp<0.05 versus Cirurgia + RT; Teste de Kruskal-Wallis/Mann-Whitney (média \pm DP).

Tabela 11 – Relação entre a sobrevida média e o perfil de imuno-marcação de TNF- α , COX-2, NF- κ B e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca

	Amostra			Vivos			Sobrevida	
	n	%	p-valor ^a	n	%	p-valor ^a	Média \pm EPM	p-valor ^b
Ki67 (cutpoint = 30%)								
Tumor								
Até 30%	23	47.9%	1.000	20	87.0%	1.000	46 \pm 4	0.730
Mais de 30%	25	52.1%		21	84.0%		36 \pm 4	
Perilesão								
Até 30%	31*	93.9%	* <0.001	28	90.3%	1.000	44 \pm 2	0,498
Mais de 30%	2	6.1%		2	100.0%		45 \pm 8	
Metástase linfonodal								
Até 30%	9	50.0%	1.000	9	100.0%	1.000	47 \pm 3	0,317
Mais de 30%	9	50.0%		8	88.9%		45 \pm 5	
COX2 (histoscore)								
Tumor								
Negativo/Fraco	46	62.2%	0.136	41	89.1%	0.498	46 \pm 3	0,832
Moderado/Intenso	28	37.8%		23	82.1%		44 \pm 4	
Perilesão								
Negativo/Fraco	71	95.9%	* <0.001	61	85.9%	1.000	48 \pm 3	0,352
Moderado/Intenso	3	4.1%		3	100.0%		52 \pm 4	
Metástase linfonodal								
Negativo/Fraco	26	66.7%	0.133	22	84.6%	0.666	34 \pm 3	0,889
Moderado/Intenso	13	33.3%		10	76.9%		35 \pm 4	
TNF (histoscore)								
Tumor								
Negativo/Fraco	32	43.2%	0.410	31*	96.9%	* 0.036	52 \pm 1	* 0.020
Moderado/Intenso	42	56.8%		33	78.6%		45 \pm 4	
Perilesão								
Negativo/Fraco	57	77.0%	* 0.001	50	87.7%	0.687	42 \pm 3	0,909
Moderado/Intenso	17	23.0%		14	82.4%		48 \pm 6	
Metástase linfonodal								

Negativo/Fraco	28	73.7%	*0.034	25*	89.3%	*0.040	38±3	0,054
Moderado/Intenso	10	26.3%		6	60.0%		21±3	
NF-κB núcleo (histoscore)								
Tumor								
Negativo/Fraco	17	23.0%	*0.001	13	76.5%	0.224	30±5	0.064
Moderado/Intenso	57	77.0%		51	89.5%		52±3	
Perilesão								
Negativo/Fraco	52	70.3%	*0.012	43	82.7%	0.264	45±4	0.098
Moderado/Intenso	22	29.7%		21	95.5%		51±2	
Metástase linfonodal								
Negativo/Fraco	19	48.7%	1.000	15	78.9%	0.695	23±3	0,145
Moderado/Intenso	20	51.3%		17	85.0%		37±3	
NF-κB citoplasma (histoscore)								
Tumor								
Negativo/Fraco	18	24.3%	*0.001	14	77.8%	0.244	30±4	0,068
Moderado/Intenso	56	75.7%		50	89.3%		52±3	
Perilesão								
Negativo/Fraco	53	71.6%	*0.007	44	83.0%	0.264	45±4	0,098
Moderado/Intenso	21	28.4%		20	95.2%		51±2	
Metástase linfonodal								
Negativo/Fraco	20	51.3%	1.000	16	80.0%	1.000	25±3	0,269
Moderado/Intenso	19	48.7%		16	84.2%		37±3	

*p<0.05. ^aTeste qui-quadrado de Pearson ou Exato de Fisher; ^bTeste Long-Rank Mantel-Cox. (Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual).

Tabela 12 – Inter-avaliação entre o histoscore de imuno-expressão de TNF- α em tumor primário com marcadores inflamatórios, de transcrição e proliferação celular em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC.

	TNF tumor histoscore		p-Valor
	Negativa Fraco	Moderada Intensa	
ki67 (>30%)			
Tumor	12 70.6%	13* 41.9%	0.075
Perilesão	2 15.4%	0 0.0%	0.148
Metástase linfonodal	4 50.0%	5 50.0%	1.000
COX-2 (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	5 15.2%	24* 55.8%	*<0.001
Perilesão	0 0.0%	3 7%	0.253
Metástase linfonodal	7 35.0%	6 30.0%	1.000
TNF (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	-	-	-
Perilesão	4 12.1%	15* 34.9%	*0.032
Metástase linfonodal	5 26.3%	5 25.0%	1.000
NF-κB nucleio (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	22 67.7%	37* 86.0%	*0.044
Perilesão	7 21.2%	17 39.5%	0.089
Metástase linfonodal	9 45.0%	12 60%	0.527
NF-κB citoplasma (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	22 66.7%	36 86.7%	0.083
Perilesão	6 18.2%	17* 39.5%	*0.045
Metástase linfonodal	9 45.0%	11 55.0%	0.752

*p<0.05. teste qui-quadrado ou exato de Fisher. Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 13 – Inter-avaliação entre o histoscore de imuno-expressão de COX-2 em tumor primário com marcadores inflamatórios, de transcrição e proliferação celular em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC.

	COX-2 tumor histoscore		p-Valor
	Negativa Fraco	Moderada Intensa	
ki67 (>30%)			
Tumor	16 51.6%	9 52.9%	1.000
Perilesão	2 8.7%	0 .0%	1.000
Metástase linfonodal	8 47.1%	1 100.0%	1.000
COX-2 (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	- -	- -	-
Perilesão	0 .0%	3 10.3%	0.052
Metástase linfonodal	9 39.1%	4 23.5%	1.000
TNF (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	19 40.4%	24* 82.8%	*<0.001
Perilesão	8 17.0%	11* 37.9%	*0.041
Metástase linfonodal	8 36.4%	2 11.8%	0.140
NF-κB núcleo (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	32 68.1%	27* 93.1%	*0.012
Perilesão	9 19.1%	15* 51.7%	*0.003
Metástase linfonodal	12 52.2%	9 52.9%	1.000
NF-κB citoplasma (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	31 66.0%	27* 93.1%	*0.011
Perilesão	8 17.0%	15* 51.7%	*0.002
Metástase linfonodal	11 47.8%	9 52.9%	0.749

*p<0.05. teste qui-quadrado ou exato de Fisher. Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

Tabela 14 – Inter-avaliação entre o histoscore de imuno-expressão de NF-κB nuclear em tumor primário com marcadores inflamatórios, de transcrição e proliferação celular em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC.

	NF-κB nuclear tumor histoscore		p-Valor
	Negativa Fraco	Moderada Intensa	
ki67 (30%)			
Tumor	7 77.8%	18 46.2%	0.087
Perilesão	1 25.0%	1 3.4%	0.081
Metástase linfonodal	2 66.7%	7 46.7%	1.000
COX-2 (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	2 11.8%	27* 45.8%	*0.012
Perilesão	1 5.9%	2 3.4%	0.538
Metástase linfonodal	7* 58.3%	6 21.4%	*0.032
TNF (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	6 35.3%	37* 62.7%	*0.044
Perilesão	2 11.8%	17 28.8%	0.211
Metástase linfonodal	6* 50.0%	4 14.8%	*0.043
NF-κB núcleo (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	-	-	-
Perilesão	3 17.6%	21 35.6%	0.238
Metástase linfonodal	7 58.3%	14 50.0%	0.736
NF-κB citoplasma (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	1 5.9%	57* 96.6%	*<0.001
Perilesão	2 11.8%	21 35.6%	0.076
Metástase linfonodal	7 58.3%	13 46.4%	0.490

*p<0.05. teste qui-quadrado ou exato de Fisher. Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

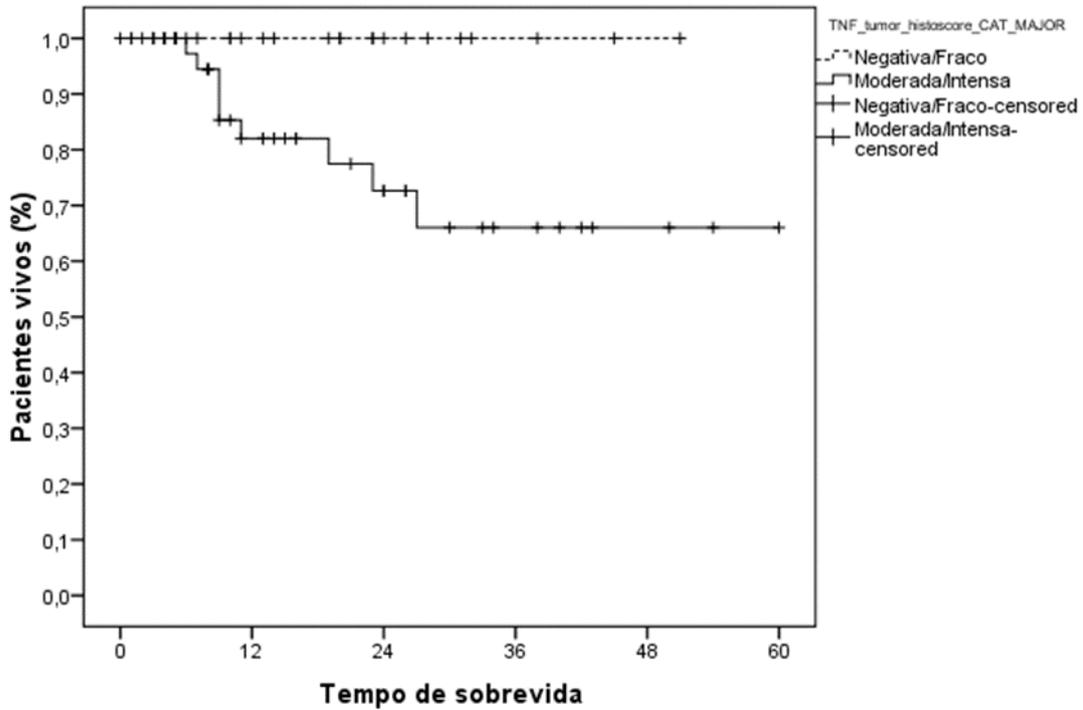
Tabela 15 – Inter-avaliação entre o histoscore de imuno-expressão de NF-κB citoplasmático em tumor primário com marcadores inflamatórios, de transcrição e proliferação celular em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC.

	NF-κB citoplasma tumor histoscore		p-Valor
	Negativa Fraco	Negativa Fraco	
ki67 (30%)			
Tumor	7 70.0%	18 47.4%	0.292
Perilesão	1 20.0%	1 3.6%	0.284
Metástase linfonodal	3 75.0%	6 42.9%	0.576
COX-2 (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	2 11.1%	27* 46.6%	*0.011
Perilesão	1 5.6%	2 3.4%	0.561
Metástase linfonodal	6 46.2%	7 25.9%	0.201
TNF (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	7 38.9%	36 62.1%	0.083
Perilesão	2 11.1%	17 29.3%	0.211
Metástase linfonodal	5 38.5%	5 19.2%	0.253
NF-κB núcleo (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	2 11.1%	57* 98.3%	*<0.001
Perilesão	2 11.1%	22* 37.9%	*0.042
Metástase linfonodal	7 53.8%	14 51.9%	0.906
NF-κB citoplasma (histoscore moderado/Intenso)			
Tumor	- -	- -	-
Perilesão	1 5.6%	22* 37.9%	*0.008
Metástase linfonodal	7 53.8%	13 48.1%	0.736

*p<0.05. teste qui-quadrado ou exato de Fisher. Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual

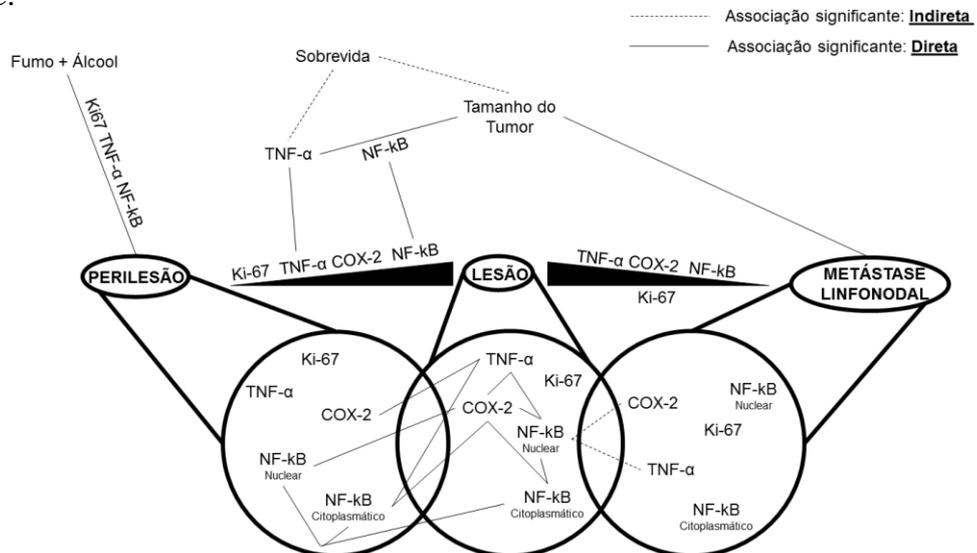
APÊNDICE 2

Figura 2 – Curva de sobrevida com influência da imuno-expressão de TNF- α em tumor primário (long-rank Mantel–Cox).



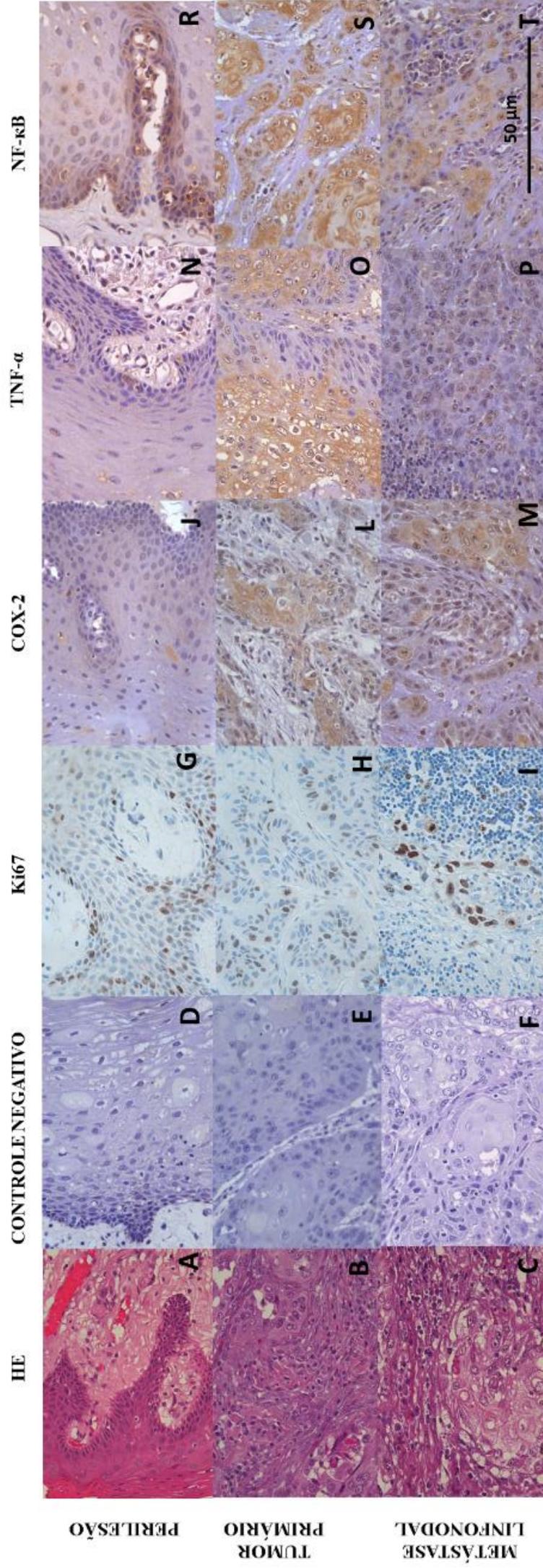
Fonte: Programa de Pós-graduação em Odontologia

Figura 3 – Associação entre o percentual e intensidade de imuno-expressão de marcadores inflamatórios, de transcrição e proliferação celular em lesão, perilesão e metástase linfonodal de CEC.



Fonte: Programa de Pós-graduação em Odontologia

Figura 4 – Painel Histopatológico



Legenda: Aspectos microscópicos de perilesão (A) tumor primário (B) e metástase linfonodal (C), de pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba, e perfil imunohistoquímico para Ki67 (G, H e I), COX-2 (J, L e M), TNF- α (N, O e P) e NF- κ B (R, S e T).

Fonte: Programa de Pós-graduação em Odontologia.

ANEXO 1

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 sobrevivência 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 μ (μ), κ (κ) e δ (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 μ (μ), κ (κ) e δ (δ) (Anticorpos anti- μ , anti- κ , anti- δ e anti-M μ) 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)3288-4653

Fax: (85)3228-4653

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

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 opióides 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)3288-4653

Fax: (85)3228-4653

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

INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 1.618.057

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_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_BASICAS_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_BASICAS_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_BASICAS_DO_PROJETO_631925.pdf	23/02/2016 18:59:06		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaocbicc.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_BASICAS_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	declaracaoicc.jpg	07/12/2015 19:52:06	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Outros	cartaacomite.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)3288-4653

Fax: (85)3228-4653

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

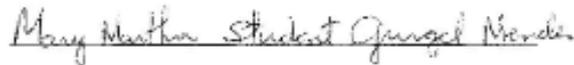
Assinado por:
Marcelo Gurgel Carlos da Silva
(Coordenador)

Endereço: PAPI JUNIOR
Bairro: RODOLFO TEÓFILO **CEP:** 60.441-700
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3288-4653 **Fax:** (85)3228-4653 **E-mail:** eco@hospcancer-icc.org.br

ANEXO 2**DECLARAÇÃO**

Eu, Mary Martha Studart Gurgel Mendes, RG 2009009001349, CPF 261390143-87, graduada em Pedagogia pela Universidade de Fortaleza-Unifor, diploma n.º 15458 e Letras pela Faculdade de Macapá, diploma n.º 3472, pós-graduada em Supervisão Escolar pela Universidade Salgado Oliveira, diploma n.º 972112, declaro, para os devidos fins e para comprovar junto ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, que realizei a revisão de português da **PARTE TEXTUAL** da dissertação intitulada **ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A IMUNO-EXPRESSÃO DE TNF- α , NF- κ B, COX-2, e Ki67 COM FATORES PROGNÓSTICOS EM CARCINOMAS ORAIS**, de Thinali Sousa Dantas, consistindo em correção gramatical, adequação do vocabulário e inteligibilidade do texto.

Fortaleza, 23 de janeiro de 2017



Mary Martha Studart Gurgel Mendes