



CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS
CURSO DE ODONTOLOGIA

ANDRÉ ALVES CRISPIM

**INFLUÊNCIA DO MICROAMBIENTE TUMORAL NO PROGNÓSTICO DE
PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE**

FORTALEZA

2022

ANDRÉ ALVES CRISPIM

**INFLUÊNCIA DO MICROAMBIENTE TUMORAL NO PROGNÓSTICO DE
PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao curso de Odontologia do Centro
Universitário Christus, como requisito parcial
para obtenção do título de bacharel em
Odontologia.

Orientador: Prof. Dra. Thinali Sousa Dantas

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de
Barros Silva

FORTALEZA

2022

ANDRÉ ALVES CRISPIM

**INFLUÊNCIA DO MICROAMBIENTE TUMORAL NO PROGNÓSTICO DE
PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE**

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC)
apresentado ao curso de Odontologia do Centro
Universitário Christus, como requisito parcial
para obtenção do título de bacharel em
Odontologia.

Orientador: Prof. Dra. Thinali Sousa Dantas

Co-Orientador: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de
Barros Silva

Aprovado em: _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Thinali Sousa Dantas
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Prof. M.a. Dayrine Silveira de Paula
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Centro Universitário Christus - Unichristus

Gerada automaticamente pelo Sistema de Elaboração de Ficha Catalográfica do
Centro Universitário Christus - Unichristus, com dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C932i

Crispim, André Alves.

Influência do microambiente tumoral no prognóstico de pacientes com Carcinoma de Células Escamosas de Orofaringe: Estudo observacional, quantitativo, de caráter retrospectivo e de corte transversal. / André Alves Crispim. - 2022.

44 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Centro Universitário Christus - Unichristus, Curso de Odontologia, Fortaleza, 2022.

Orientação: Profa. Dra. Thinali Sousa Dantas.

Coorientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva.

1. Microambiente Tumoral. 2. Sobrevida. 3. Carcinoma de Células Escamosas. 4. Câncer de Orofaringe. I. Título.

CDD 617.6

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as oportunidades e bençãos.

A minha mãe Aldênia só cheguei aqui por sua causa e dedico este trabalho para a senhora.

Ao meu pai Ednaldo apesar de já ter falecido foi uma figura importante durante a minha formação, no pouco tempo que esteve vivo me mostrou como devemos tratar as pessoas, ter caráter e ética. Dedico também aos meus colegas e amigos, especialmente: Larissa Machado, Reverton, Cassia, Marcela, Vitória, Anna Clara, Livia Caetano, Jamille Torres e ao meu primo Renato por todo apoio e ajuda, também ao meu trio composto por Natália e Daniele que sem o apoio e parceria delas não teria chegado até aqui. Ao Dedé que ajudou ativamente em certos momentos da pesquisa.

Agradeço, também ao professor Paulo Goberlânio por cada suporte e ajuda em todos os momentos, graças ao senhor eu sei que tipo de profissional eu quero ser e que caminhos eu quero seguir na minha carreira.

Agradeço também a minha orientadora Thinali Dantas por toda oportunidade, por ceder o seu tempo para me ajudar e me guiar para o caminho até este momento.

RESUMO

O Carcinoma de Células Escamosas (CEC) representa cerca 95% das neoplasias malignas de boca e orofaringe, apresentando alta incidência e elevada mortalidade sendo uma preocupação de saúde pública. Um cofator cada vez mais reconhecido em muitos tipos de cânceres é o estroma adjacente, também chamado de microambiente tumoral (MAT). O papel do microambiente tumoral na carcinogênese é uma área relativamente recente, mas crescente da pesquisa em biologia do câncer. Porém, pouco se sabe sobre todo o seu papel durante a carcinogênese, que tipo de resposta celular as suas células irão desempenhar e que impactos podem ocasionar na sobrevida dos pacientes. Portanto, este estudo propõe através de um estudo retrospectivo, correlacionar imunoexpressão de marcadores com a sobrevida dos pacientes em carcinomas de orofaringe. Para isso, foi realizado um levantamento de pacientes com CEC em orofaringe (CECOF), diagnosticados no Hospital Haroldo Juaçaba, onde serão avaliados os prontuários e serão utilizadas as biópsias excisionais para realização de imuno-histoquímica através de *Tissue Microarray* (TMA) para receptores dos marcadores CD3, CD8, CD20, CD68 e FoxP3. A imunomarcação será avaliada através do software ImageJ com fotomicrografia e 10 campos no aumento de 400x, de maneira quantitativa (contagem células e não marcadas). Foram correlacionados também dados sóciodemográficos (idade, sexo, histórico de fumo e de câncer na família, consumo de álcool), além de dados clínico-patológicos (tipo histológico do tumor, localização primária, estadiamento cTNM). Foram obtidos um total de 25 amostras de tecido perilesional (MRC), 29 amostras de TP (Tumor primário) p16-, 21 amostras de tumor p16+, 16 amostras de ML (Metástase Linfonodal) p16- e 9 amostras de ML p16+. O número de células CD20+ foi significativamente maior em região peritumorais/subepiteliais apenas nas metástases linfonodais p16- e p16+ ($p=0,013$), mas na região intratumorais/intraepiteliais houve aumento na quantidade de células CD20+ em tumores p16+ e nas metástases linfonodais ($p<0,001$), o histórico de fumo também aumentou o número de todas as células estudadas intra e peritumorais ($p<0.05$) exceto CD68 ($p=0.194$ e $p=0.501$, respectivamente). Na análise de sobrevida, nenhuma característica clínica influenciou significativamente as curvas de sobrevida global, mas os tumores p16+ com mais células CD3+ ($p=0.004$) e CD68+ ($p=0.003$) peritumorais e CD8+ intratumorais ($p=0.026$) apresentaram melhor prognóstico. A tendência no aumento do número de todas as células estudadas intra e peritumorais correlacionando com histórico de fumo pode sugerir um desenvolvimento significativo na piora do quadro clínico destes pacientes. Em conclusão,

nossos dados indicam que altas densidades de T CD3⁺ CD68⁺ ao redor e CD8⁺ no centro do tumor e margens invasivas associam-se significativamente à melhora da sobrevida global em pacientes com CECOF primário.

Palavras-Chave: Microambiente Tumoral; Sobrevida; Carcinoma de Células Escamosas; Câncer de Orofaringe.

ABSTRACT

Squamous Cell Carcinoma (SCC) represents about 95% of malignant neoplasms of the mouth and oropharynx, with high incidence and high mortality, being a public health concern. An increasingly recognized cofactor in many types of cancer is the adjacent stroma, also called the tumor microenvironment (MAT). The role of the tumor microenvironment in carcinogenesis is a relatively recent but growing area of research in cancer biology, but little is known about its entire role during carcinogenesis and what type of cellular response its cells will play and what impacts they may have in patient survival. Therefore, this study proposes, through a retrospective study, to correlate this immunoexpression of markers with the survival of patients with oropharyngeal carcinomas. For this, a survey of a patient with SCC in the oropharynx (CECOF) will be carried out, diagnosed at the Haroldo Juaçaba Hospital, where the medical records will be evaluated and excisional biopsies will be used to perform immunohistochemistry through Tissue Microarray (TMA) for receptors of the markers CD3, CD8, CD20, CD68 and FoxP3. Immunomarking will be evaluated using ImageJ software with photomicrography and 10 fields at 400x magnification, quantitatively (cell count and unlabeled). Sociodemographic data (age, sex, smoking and cancer history in the family, alcohol consumption) were also correlated, as well as clinicopathological data (tumor histological type, primary location, cTNM staging). A total of 25 perilesional tissue samples, 29 p16-TP samples, 21 p16+ tumor samples, 16 p16-ML samples and 9 p16+ ML samples were obtained. The number of CD20+ cells was significantly higher in the peritumoral/subepithelial region only in p16- and p16+ lymph node metastases ($p=0.013$), but in the intratumoral/intraepithelial region there was an increase in the amount of CD20+ cells in p16+ tumors and in lymph node metastases ($p<0.001$), smoking history also increased the number of all intra and peritumoral cells studied ($p<0.05$) except CD68 ($p=0.194$ and $p=0.501$, respectively). In the survival analysis, no clinical feature significantly influenced the survival curves overall, but p16+ tumors with more peritumoral CD3+ ($p=0.004$) and CD68+ ($p=0.003$) and intratumoral CD8+ cells ($p=0.026$) had a better prognosis. smoking history may suggest a significant development in the worsening of the clinical condition of these patients. In conclusion, our data indicate that high densities of CD3 + CD68+ T at and CD8+ in the center of the tumor and invasive margins are significantly associated with improved overall survival in patients with primary CECOF.

Keywords: Tumor Microenvironment; Survival; Squamous Cell Carcinoma; Oropharyngeal Neoplasms.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. OBJETIVO.....	15
3. METODOLOGIA.....	15
4. RESULTADOS.....	18
5.DISSCUSSÃO.....	21
6.CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS.....	24
7.TABELAS.....	27
8. FIGURAS.....	38
9.ANEXOS.....	40

1. INTRODUÇÃO

1.1.Câncer Orofaringe: Epidemiologia

O câncer de cabeça e pescoço é a 5º neoplasia mais frequente no mundo, apresentando mais de 500.000 novos casos anualmente (GALBIATTI et al., 2013). O carcinoma espinocelular é o tipo histológico mais prevalente dentre os tumores desta região, essa patologia tem uma alta mortalidade, sendo a sexta maior causa de morte por câncer no Brasil (INCA, 2021) e em países de baixo nível socioeconômico, sendo mais incidente em homens que em mulheres entre a quarta e quinta décadas de vida (LYDIATT et al., 2017).

Um dos tumores que fazem parte desta classificação é o câncer de orofaringe que está localizada entre o palato duro e osso hióide, incluindo as tonsilas palatinas, a base da língua (limitada pelo sulco glossopalatino), palato mole e região posterior da faringe (MEHANNA et al., 2020). O câncer de orofaringe possui etiologia delineada sendo o fumo de tabaco associado a álcool o mais importante fator de risco para o desenvolvimento, porém, já é bem definida a sua relação de causalidade com o papiloma vírus humano (HPV) (LYDIATT et al., 2017). Práticas de sexo desprotegido e aumento da idade elevam também a sua incidência (NGUYEN et al., 2014). Além disso a idade e sexo atuam como importantes predisponentes onde dados demonstram que pessoas acima de 50 anos, homens e brancos são os mais acometidos, porém o índice de mulheres acometidas por esta neoplasia vem aumentando ao longo dos anos, por elas estarem se expondo mais ao tabaco e ao álcool (MEHANNA et al., 2020).

Podemos compreender que o CEC de orofaringe (CECOF) evolui a partir de um complexo processo resultante da exposição a agentes carcinogênicos que inclui várias etapas constituídas de mudanças genéticas, epigenéticas e metabólicas. A exposição crônica a esses agentes levam a instabilidade genética nas células epiteliais, com desenvolvimento de lesões potencialmente malignas e, posteriormente, ao carcinoma invasivo (GOU et al., 2018)

A taxa de sobrevida em 5 anos é aproximadamente 50%, isso se deve ao fato de que a maioria dos tumores serem identificados tardiamente, comprometendo o tratamento, o prognóstico e a sobrevida dos pacientes (CRAIG et al., 2019). Além disso, estudos demonstram que os tumores de orofaringe estão fortemente associados à metástase cervicais, com incidência em 50% a 70% devido à sua maior disseminação tumoral, além de estarem localizados em regiões de difícil visualização e diagnóstico, contribuindo negativamente na sobrevida (KWON et al., 2015).

Outro fator importante avaliado é sua associação com vírus HPV, de acordo com o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), 72% dos tipos de câncer de orofaringe estão relacionados ao HPV e o prognóstico destes tumores mostram-se significativamente melhores que os casos não associados ao vírus (LYDIATT et al., 2017).

Por isso, sugere-se que tumores HPV positivos sejam estadiados de maneira diferente dos tumores HPV negativos para melhorar o manejo clínico e os resultados desses tumores (CRAIG et al., 2019).

Muitos estudos têm revelado que os marcadores biológicos são uma importante fonte de informação sobre a biologia tumoral. Os biomarcadores fornecem informações sobre o estado e progressão do câncer permitindo e ajudado até na escolha da terapia a ser seguida. Tratando de orofaringe a proteína p16 exerce importante marcador com papel preditor no prognóstico do câncer tornando-se um importante marcador tumoral (LYDIATT et al., 2017).

1.1. Microambiente Tumoral

Os cânceres se desenvolvem em ambientes complexos dentro dos tecidos, dos quais dependem para crescimento sustentado, invasão e metástase. Um cofator cada vez mais reconhecido em muitos tipos de cânceres é o estroma adjacente, também chamado de microambiente tumoral (MAT). O estroma é um tecido de suporte no qual residem as células epiteliais e é composto por tecido conjuntivo, vasculatura e vários tipos de células (WU; DAI, 2017). O papel do microambiente tumoral na carcinogênese é uma área relativamente recente, mas crescente da pesquisa em biologia do câncer. Estudos já demonstraram que a comunicação entre células epiteliais e o MAT afetam processos que vão desde o início do tumor, sua progressão até metástase e resposta terapêutica (ARNETH, 2019).

Os fibroblastos são um dos componentes celulares importantes do estroma e sua associação ao câncer (CAFs) tornaram-se o foco principal da pesquisa MAT por apresentares atuações significativas na comunicação entre estroma e epitélio (SCUTTI et al, 2016). Pesquisas realizadas em 2010 demonstraram evidências de que os CAFs associado ao aumento da expressão de fator de crescimento fibroblástico (FGF) e seus receptores podem facilitar a carcinogênese através de uma variedade de mecanismos que envolvem a interferência estroma-epitelial, estimulando uma maior invasividade das células epiteliais, e essa ação está também diretamente vinculada a atuação mediada por fatores promotores pró-oncogênicos, por exemplo, HPV que curiosamente é prevalente no câncer de orofaringe, por esse motivo tem sido estudado também a sua ação dentro do MAT (KRISHNAMURTHY et al., 2010; ARNETH, 2019).

Células do Sistema Imunológico tem sido objeto de estudo quanto às interações entre estas com as células malignas. Como exemplo, observa-se na literatura que células T regulatórias (Tregs) têm uma frequência aumentada em amostras de sangue periférico coletadas de pacientes com câncer, por exemplo, o câncer de orofaringe (GENTLES et al., 2020). As células T que também expressam FOXP3, anteriormente considerado um marcador Treg substituto, foram associadas a uma resposta clínica melhorada (WU; DAI,

2017). Estudos subsequentes descobriram que o acúmulo de células e Tregs em pacientes submetidos à imunoterapia contra o câncer está relacionado ao acúmulo de células CD4⁺ FOXP3⁺ CD20⁺ marcadores estes que estavam ligados à supressão imunológica antitumoral e ao mau prognóstico clínico. Observando estes dados é possível compreender que a investigação de marcadores biológicos no microambiente tumoral deverá ser feita avaliando idealmente não apenas um marcador biológico visto que os resultados são variáveis devido as suas interações com outros marcadores em determinadas regiões, as vezes trazendo prognósticos positivos e outrora prognósticos negativos mediante também a sua interação com o MAT (GENTLES et al., 2020).

No estudo de Zhou et al (2018), demonstrou-se que a função imune desregulada está intrinsicamente envolvida na iniciação e progressão do tumor. Em particular, diversos tipos de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) produziram efeitos diferentes no crescimento tumoral, recorrência e disseminação metastática. Evidências acumuladas mostraram que a presença de TILs está significativamente correlacionada com o prognóstico de vários tumores sólidos, como CECOF. Atualmente, os marcadores mais comuns para TILs são CD3 e CD8 que marcam células T pan-T e citotóxicas, estas evidências estabelecem que os números e tipos de marcadores inflamatório juntamente com o seu papel na carcinogênese é variado e influenciado pelo local que esteja presente, por exemplo, no MAT na região intratumoral ou ao redor na região extratumoral (ZHOU et al., 2018).

Os macrófagos são células que demonstram uma adaptabilidade que podem ser exploradas pelo tumor para desencadear funções distintas em diferentes estágios de progressão (ALVES; DIEL; LAMERS, 2018). Dependendo do estímulo, os macrófagos podem polarizar-se no perfil M1 ou M2, onde M1 atua como pró-inflamatório e antitumoral, e M2 como anti-inflamatório e pró-tumoral (CAMPOS, 2020). Células tumorais e macrófagos também utilizam fibras colágenas como facilitadores para percorrer rapidamente o estroma. Desta forma, a utilização do marcador CD68⁺ (principal marcador de análise de macrófagos) para estudos que analisam a sobrevida e prognóstico do paciente poderá ser uma boa escolha devido ao seu papel na cadeia inflamatória (ALVES; DIEL; LAMERS, 2018).

Estar ciente da existência de outros marcadores inflamatórios e os seus papéis no MAT é fator importante a ser avaliado. No estudo de Sato et al (2020) demonstrou que a baixa densidade de células CD20⁺ tem se mostrado um marcador prognóstico favorável no câncer tímico e durante o seu estudo foram avaliados outros tipos de cânceres como pulmão e colorretal, demonstrando resultados opostos ao câncer tímico indicando que a discrepância do impacto das células CD20⁺ na malignidade do timo é diferente em comparação com outros tipos de câncer e a densidade de CD20 (SATO et al., 2020). No marcador CD68 os achados de Troiano et al (2019) revelaram que, embora a análise IHC do marcador genérico de macrófagos CD68⁺ não tenha utilidade prognóstica em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, porém em outros estudos como o de Dai et al (2020) os macrófagos CD68⁺ foi positivamente correlacionado com o tamanho do tumor e o grau de

classificação de Knosp para invasividade do tumor, desta forma podemos observar que o seu papel dentro da carcinogênese e no MAT não é totalmente elucidada.

As células T reguladoras (Treg) caracterizadas pela expressão de FOXP3 e forte atividade imunossupressora desempenham um papel fundamental na regulação da homeostase na saúde e na doença. Vários estudos fizeram afirmações prognósticas com base na proporção de FoxP3⁺ Tregs para outros subconjuntos de linfócitos, e a proporção de células T CD8⁺/FoxP3⁺ foi comumente usada. Assim, a visão original de que FoxP3⁺ Tregs invariavelmente suprime a imunidade tumoral é simplificada demais. O efeito prognóstico discrepante de FoxP3⁺ Tregs pode surgir de diferentes propriedades biológicas de tipos específicos de tumores, e o impacto positivo pode estar relacionado aos seus efeitos anti-inflamatórios em vários tumores. Além disso, em muitos cânceres, o efeito prognóstico de FoxP3⁺ Treg está altamente correlacionado com o estágio do tumor ou subtipo molecular. Uma melhor compreensão dos subconjuntos FoxP3⁺ Treg em diferentes cânceres humanos provavelmente permitirá o desenvolvimento de imunoterapias mais precisas e eficazes (Shang et al., 2015).

Desta forma, podemos compreender que existem relatos conflitantes sobre os seus papéis desempenhados dentro do microambiente, como observados em achados que os apresentam como favoráveis ao prognóstico e outros atuando de forma adversa. Esses resultados ilustram a complexidade de processos como inflamação, que pode ter efeitos pró e antitumorais servindo de base para a vigilância imunológica dentro do ambiente cancerígeno (GENTLES et al., 2020).

O MAT muda continuamente ao longo da progressão do câncer em resposta à evolução das condições ambientais e dos sinais oncogênicos dos tumores em crescimento, desta forma, ressaltando que influência do MTA sobre o prognóstico cancerígeno é um processo dinâmico, porém não totalmente heterogêneo (GOULART et al., 2016). Ao contrário das células tumorais, os tipos de células estromais no MAT são geneticamente estáveis e, portanto, representam um alvo terapêutico atraente com risco reduzido de resistência e recorrência do tumor. Além disso, muitos estudos já demonstraram que o MAT é capaz de normalizar células tumorais, sugerindo que a reeducação das células estromais, em vez da ablação direcionada, podendo ser uma estratégia eficaz para o tratamento de câncer. No entanto, interromper especificamente o MAT pró-tumorigênico é uma tarefa desafiadora, pois o MAT possui diversas capacidades para induzir consequências benéficas e adversas para a tumorigênese (WU; DAI, 2017).

Portanto, percebe-se que o microambiente tumoral representa um meio complexo e dinâmico com componentes celulares e acelulares desempenhando atividade e função sinérgica na progressão do câncer, desta forma afetando o crescimento e o desenvolvimento do câncer. (DEL PRETE et al., 2017).

2. OBJETIVOS

2.1.OBJETIVO GERAL

Caracterizar a imunoexpressão de marcadores celulares do microambiente tumoral no Carcinomas de Células Escamosas de Orofaringe, correlacionando com fatores de prognósticos e sobrevida.

2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar em Carcinomas de Células de orofaringe a imunoexpressão de marcadores p16, CD3, CD8, CD20, CD68 e FoxP3.

Determinar em tecido perilesional através de imuno-histoquímica convencional a expressão de p16, CD3, CD8, CD20, CD68 e FoxP3.

Determinar em metástases linfonodais, através de imuno-histoquímica convencional a expressão p16, CD3, CD8, CD20, CD68 e FoxP3.

Comparar a Imunoexpressão dos receptores nos diferentes tecidos analisados.

Correlacionar os dados coletados nas análises imunohistoquímicas com fatores prognósticos, incluindo sobrevida.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1.DELINEAMENTO DO ESTUDO

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

3.1.1.Preceitos Éticos

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará com número do parecer: 3.212.746.

3.2. AMOSTRA E DADOS ANALISADOS.

3.2.1. Cálculo amostral

Baseado no estudo de Hladíková et al. (2019) que observou que a sobrevida em cinco anos de pacientes com câncer de orofaringe apresentando alta expressão para CD8 intratumoral é significativamente maior que pacientes com baixa expressão de CD8 intratumoral (90% vs. 64%) estima-se necessário avaliar 40 pacientes a fim de obter uma amostra que represente com 80% de poder e 95% de confiança essa coorte (método de de Fleiss). Tendo em vista a possibilidade de perda de amostra e de dados, acresceu-se 25% sobre esta, totalizando 50 pacientes com câncer de orofaringe.

3.2.2. Seleção das Amostras

Portanto, foram selecionados 50 pacientes com Carcinoma de Células Escamosas em orofaringe tratados e operados no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará) no ano de 2018 a 2019. Foram levantados os dados sócio-demográficos, como idade, sexo, histórico de fumo e de câncer na família, consumo de álcool, além de dados clínico-patológicos como tipo histológico do tumor, localização primária, cTNM dados estes fornecidos através dos prontuários e laudos histopatológicos dos pacientes.

Para classificação TNM, foi utilizado o estadiamento patológico (cTNM), todos os casos foram reavaliados e estadiados de acordo com o *American Joint Committee* descrito no Manual de Estadiamento do Câncer como descrito abaixo (LYDIATT et al., 2017) com realização de reação de imuno-histoquímica para a proteína p16, associada com a presença de afecção pelo vírus HPV. Portanto foram estadiados de maneira diferente os casos p16-positivos ou p16-negativos.

Também foi coletada a sobrevida (em meses), obtida através da diferença entre a data do início do tratamento (dia, mês e ano) a data do óbito ou data do último registro de seguimento (dia mês e ano) utilizando para fins de análise estatística a quantidade de semanas entre essas datas, assim como descrito por Dantas et al., (2016).

Após a seleção da amostra, foram avaliadas as lâminas histológicas das peças cirúrgicas para revisão por um patologista experiente e foram levantados os respectivos blocos para realização de técnica de imuno-histoquímica e confecção de blocos para técnica de *Tissue Microarray*. Foram excluídos os blocos ou material considerados insuficientes pelos patologistas.

3.2.3. Técnica do *Tissue Microarray* (TMA) e Processamento imuno-histoquímico

Após revisão de lâminas e blocos, a patologista do hospital foi indagada a marcar nas lâminas histológicas áreas que representassem: na peça cirúrgica, o *front* tumoral; 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 será selecionada uma lâmina que representasse essa metástase.

Após a seleção e marcação 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, punciona-se um fragmento de tecido com 2 mm de diâmetro, do fronte tumoral do bloco doador e transfere-se, de maneira ordenada, para o bloco receptor que apresentava um padrão de matriz precisamente espaçada.

Assim, cada bloco de TMA será composto por 36 fragmentos de tecidos, correspondentes ao fragmento guia (vazio) e aos fragmentos do tumor, ao fragmento de epitélio escamoso não lesional e à metástase linfonodal.

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

A reação de imuno-histoquímica ocorreu através da técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Após desparafinização e reidratação foi realizada recuperação antigênica por meio de sistema em banho maria a 97°C durante 45 minutos em solução de citrato em pH6, bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3%, lavagem com solução tampão de fosfato (PBS) e incubação com os anticorpos primários descritos na tabela abaixo.

Quadro 1: Anticorpos utilizados para imuno-histoquímica.

Anticorpo	Fabricante	Diluição	Marcador alvo	Controle Positivo
CD3	DAKO®	1:100 (Dako ab5690)	Linfócito TCD3	Mieloma (XIAO et al., 2016)
CD8	DAKO®	1:40 (Dako VP-C320)	Linfócito TCD8	CEC (WOLF et al., 2015)
CD20	DAKO ®	1:400 (Dako ab78237)	Linfócito B	Câncer de pâncreas (MIKSCH et al., 2019)
CD68	DAKO ®	1:100 (Dako M0814)	Macrofágos	CEC (WOLF et al., 2015)
FoxP3	DAKO®	1:200 (Dako Ab20034)	Expressão de células T	CEC (WOLF et al., 2015)
p16	DAKO®	1:500(Dako ab51243)	Protéina p16 e vírus HPV	Câncer de Colorretal (YANG et al., 2020)

* De acordo com o fabricante ou por estudo piloto anterior.

Após incubação com o anticorpo primário por tempo determinado pelo fabricante, as lâminas foram lavadas (PBS) e incubadas com anticorpo biotinilado por 30 minutos e, após lavagem, incubadas com conjugado de peroxidase avidina-biotina ou sistema DAKO® por 30 min.

A revelação foi realizada por meio de incubação com 3,3'-Diamino-benzidina (DAB) (Abcam®) e a contra-coloração com Hematoxilina de Harris (10'') ou *blue solution* (10'') para os anticorpos p16, CD3,CD8,CD20,CD68, FoxP3. Após coloração e contra-coloração as lâminas foram montadas para avaliação.

Foram feitos controles positivos da reação de imuno-histoquímica por cortes histológicos convencionais, de acordo com o quadro 1. E para controle negativo, lâminas com cortes convencionais e de TMA, utilizando a mesma técnica de imuno-histoquímica descrita anteriormente, porém omitindo a etapa de incubação com o anticorpo primário.

3.2.4. Análise Imuno-histoquímica

A análise da imunomarcção foi realizada a partir da fotografia de 10 campos aleatórios por corte histológico em um aumento de 400x por meio de um microscópio com câmera acoplada (Leica DM 2000®). As fotos foram exportadas para o software Image J e através do comando *cell couter* foi feito a contagem de células.

Para expressão imuno-histoquímica de todos os marcadores inflamatórios (FoxP3, CD3, CD8, CD20 e CD68) baseado no método descrito por Santos et al (2016) e Know et al. (2015), onde foram selecionados 5 campos histológicos de maior imunorreatividade no parênquima e 5 campos no estroma, sendo realizada a contagem das células imunomarcadas com coloração acastanhada sob aumento de 400x.

A expressão de p16 será feita pela porcentagem de células tumorais marcadas, as amostras foram consideradas p16 positivas por p16 IHC (coloração imuno-histoquímica) quando a coloração nuclear e citoplasmática forte e difusa foi detectada em pelo menos 75% das células tumorais (DE OLIVEIRA FILHO et al., 2021; LYDIATT; O'SULLIVAN; PATEL, 2018).

3.3. Análise estatística

Os dados foram tabulados no Microsoft Excel e exportados para o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) no qual as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95%.

Foram calculadas as médias e desvio-padrão dos números de células nas regiões intraepiteliais/intratumorais e subepiteliais/peritumorais. Os dados foram comparados por meio dos testes de Mann-Whitney, Wilcoxon e Kruskal-Wallis/Dunn. Após categorização desses valores conforme a mediana de imunoexpressão, foram criadas curvas de Kaplan-

Meier para calcular o tempo médio e mediano de sobrevida global e taxas de sobrevida em 10 anos, as quais foram comparadas pelo teste Log-Rank Mantel-Cox.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da imunoexpressão de células do microambiente tumoral em CECOF

Um total de 25 amostras de tecido perilesional, 29 amostras de TP p16-, 21 amostras de tumor p16+, 16 amostras de ML p16- e 9 amostras de ML p16+. O número de células CD3+ peritumorais/subepiteliais não mostrou diferença entre os grupos ($p=0,191$), mas o número de células CD3+ intratumorais/intraepiteliais dos tumores p16- foi significativamente inferior a todos os demais subgrupos. O número de células CD8 peritumorais/subepiteliais também não diferiu significativamente entre os grupos ($p=0,208$), mas em região intratumorais/intraepiteliais os tumores p16- apresentaram menor quantidade de células CD8+ ($p=0,045$) (Tabela 1).

O número de células CD20+ foi significativamente maior em região peritumorais/subepiteliais apenas nas metástases linfonodais p16- e p16+ ($p=0,013$), mas na região intratumorais/intraepiteliais houve aumento na quantidade de células CD20+ em tumores p16+ e nas metástases linfonodais ($p<0,001$). Há o número de células CD68+ não diferiu significativamente na região peritumorais/subepiteliais ($p=0,539$), e na região intratumorais/intraepiteliais mostrou aumento significativo nos tumores p16+ e nas metástases nodais ($p=0,005$) (Tabela 1).

O número de células FoxP3+ mostrou aumento apenas nas metástases nodais dos tumores p16- e p16+ em comparação aos demais tecidos tanto em região peritumorais/subepiteliais como em região intratumorais/intraepiteliais ($p<0,001$) (Tabela 1).

4.2. Influência de características clínicas na imunoexpressão de células do microambiente tumoral em CECOF

Nos tumores p16- o sexo, a história prévia de fumo e de consumo de álcool não influenciaram significativamente na quantidade de células do microambiente tumoral peritumorais ou intratumorais. Os pacientes com idade >60 anos apresentaram maior quantidade de células CD3+ peritumorais ($p=0,041$), os pacientes com história familiar de câncer ($p=0,009$), com tumores T3/T4 ($p=0,048$) e N+ ($p=0,044$) apresentaram mais células CD8+ intratumorais. Os tumores N+ também apresentaram mais células CD20+ ($p=0,028$) e FoxP3+ ($p=0,028$) intratumorais e FoxP3+ peritumorais ($p=0,035$) (Tabela 2).

Nos tumores p16+ as mulheres apresentaram maior quantidade de células FoxP3+ intratumorais ($p=0.036$) e peritumorais ($p=0.014$). Os pacientes com idade ≤ 60 anos apresentaram mais células CD20+ intratumorais ($p=0.037$). Apesar do histórico familiar de câncer e de consumo de álcool e a incidência de metástases nodais não ter mostrado associação significativa com o microambiente tumoral, o histórico de fumo aumentou o número de todas as células estudadas intra e peritumorais ($p<0.05$) exceto CD68 ($p=0.194$ e $p=0.501$, respectivamente). Os tumores T3/T4 também apresentaram maior número de células CD8+ intratumorais ($p=0.034$) e FoxP3 peritumorais ($p=0.010$) (Tabela 3).

4.3. Influência de da imunoexpressão de células do microambiente tumoral no prognóstico do CECOF

Na análise de sobrevida, nenhuma característica clínica influenciou significativamente as curvas de sobrevida global, mas os tumores p16+ com mais células CD3+ ($p=0.004$) e CD68+ ($p=0.003$) peritumorais e CD8+ intratumorais ($p=0.026$) apresentaram melhor prognóstico (Tabela 4). Em análise multivariada CD3+ ($p=0.023$) e CD68+ intratumorais ($p=0.030$) influenciaram significativamente na sobrevida global de pacientes com tumores p16+ (Tabela 5).

5. DISCUSSÃO

A imunidade anticâncer é amplamente mediada por linfócitos infiltrantes de tumor (LIT), especialmente por linfócitos T CD8. Nos estudos de Young et al. (2020) e El Achkar (2018). Segundo os autores, a baixa citotoxicidade na carcinogênese pode ser interpretada como parte das primeiras mudanças no microambiente tumoral no CEC de orofaringe (YOUNG et al., 2020; El Achkar, 2018). Ao avaliarmos os linfócitos CD3+ e CD8+ dentro do presente estudo foi observado que nos tumores p16- há menos infiltração destas células, estes resultados podem justificar o motivo do comportamento mais agressivo destes tumores, abrindo a janela para a hipótese do impedimento do tumor a penetração de células citotóxicas demonstre um agravamento no seu prognóstico e, conseqüentemente, comportamentos mais agressivos em tumores p16- (MEHANNA et al., 2020).

O CD20 é um antígeno do linfócito B para sua expressão na superfície das células B, mas não de outras linhagens celulares, e se apresenta a partir de células pró-B tardias para células de memória, exceto células pró-B iniciais e células plasmáticas. O CD3 é reconhecido como o marcador de células T, indispensável constituinte do complexo TCR (Receptor de Células T) (FRANCHINA; HE; BRENNER, 2018). Tradicionalmente, CD20 possui uma importante função de opsonização de outras células como no caso podemos destacar a sua ligação tumoral e o recrutamento do linfócito CD8 que possui ação diretamente no ambiente tumoral desempenhando um efeito citotóxico nas células (YASUNAGA, 2020).

No estudo de Lacet (2020), foi correlacionado o CD20 nas células neoplásicas com o microambiente pelo teste de Pearson, observando uma correlação positiva entre ele e os marcadores CD3, CD4, CD8, CD21 e PD-1, evidenciando que quanto maior a positividade do CD20 maior a chance destes marcadores estarem positivos também. Analisando estes dados, o CD20 pode desempenhar uma função crucial no microambiente tumoral devido a sua interação dentro dos tumores p16+, como por exemplo, no recrutamento de células inflamatórias como linfócito CD8, CD3 e macrófagos (CD68) por opsonização, desta forma, como dito anteriormente contribuindo com a citotoxicidade mediada por anticorpos (LACET, 2020; YASUNAGA, 2020). No presente estudo, foi visto que houve um aumento maior de células CD20+ na região intratumorais/intraepiteliais de tumores p16+ que nos tumores p16- , estes fatos sugerem que o CD20 podendo está desempenhando papel semelhante aos marcadores CD3+ e CD8+ contribuindo com a citotoxicidade mediada por anticorpos na região tumoral (LACET, 2020),

Outro marcador que teve resultados evidentes foi o CD68+ marcador importante para analisar a presença de macrófagos na região. O seu efeito na resposta inflamatória demonstrou que o seu recrutamento nos tumores p16+ nas regiões intratumorais/intraepiteliais mostrou-se relativamente alto, resultado este inverso nas

regiões peritumorais, desta forma, sugerindo um alto poder de penetração e interação tumoral. Corroborando estes dados com os outros achados anteriores é visto um padrão entre o CD68+ e os outros marcadores CD8+ e CD20+, concluindo que eles conseguem penetrar mais nos tumores p16+ e interagir entre si contribuindo com o controle do tumor. Reforçando a hipótese gerada nos primeiros dados sobre a existência da influência de marcadores inflamatórios dentro do MAT, é observado que nos tumores p16+ as células CD3+ e CD8+ mostraram correlação positiva com todos os marcadores e CD68+ ainda se correlacionou positivamente com FoxP3+ .

A exposição ao tabaco é amplamente considerada correlacionada com o desenvolvimento de vários tipos de câncer e a cessação do tabagismo reduzirá a mortalidade e aumentará a expectativa de vida dos pacientes (LU et al., 2021) . No estudo, identificamos uma tendência de aumento significativo no número de todas as células estudadas intra e peritumorais exceto o CD68 quando existe histórico de fumo associado nos tumores p16 positivos sugerindo um desenvolvimento significativo na piora do quadro clínico destes pacientes diferentemente dos outros dados como histórico familiar de câncer, o consumo de álcool e a incidência de metástases nodais que não demonstraram alterações significantes. Desta forma, com base nos resultados deste estudo somados aos achados já existentes na literatura é possível observar uma associação significativa entre o fumo e expressão tumoral em tumores p16+, concluindo que este tipo de câncer associado ao fumo estimula todo o microambiente tumoral nos tumores p16+

No estudo de Arneth em 2019 foi realizado uma revisão sistemática na integra com resultados significantes acerca da influência do microambiente na sobrevida dos pacientes. Através da avaliação dos linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ foi observado que as células inflamatórias são pró-tumorigênicos, enquanto outros são mais restritivos, ao tumor (FOXP3, CD20, CD68) ressaltando que ao direcionar o microambiente do tumor poderá ajudar a aumentar a resistência adquirida, melhorar a eficácia terapêutica e prevenir metástases. No no caso dos linfócitos B eles também contribuem para a regulação da sobrevivência e proliferação de células tumorais e para o desenvolvimento de resistência ao tratamento, além disso, essas células têm sido associadas ao processo de promoção do escape imune (ARNETH, 2019). Resultados como no estudo de Del Prete et al (2017) que avaliava a importância do microambiente tumoral no tratamento e manejo do câncer, foi demonstrada que a influencia no prognóstico da doença e na imunidade antitumoral é bastante interligada (DEL PRETE et al., 2017). No estudo, a análise de sobrevida demonstrou que nenhuma característica clínica influenciou significativamente as curvas de sobrevida global, mas os tumores p16+ com mais células CD3+ e CD68+ peritumorais e CD8+ intratumorais apresentaram melhor prognóstico (Tabela 4). Em análise multivariada CD3+ e CD68+ intratumorais influenciaram significativamente na sobrevida global de pacientes com tumores p16+ (Tabela 5).

Com base nestes dados apresentados, outros estudos como o de Wu e Dai (2017) demonstraram que o gerenciamento da resistência mediada pelo MAT teria um efeito profundo na carcinogênese, exemplificando essa possibilidade utilizar estratégias de terapia direcionadas ao microambiente incluindo a inibição das interações ligante-receptor extracelular e vias a jusante podem ser eficazes visto que as células imunes podem melhorar e obstruir a eficácia terapêutica e podem variar em seu estado de ativação dentro do microambiente tumoral; assim, a reprogramação da resposta imune como linfócitos e macrófagos, por exemplo, seriam substancialmente mais benéfica (WU; DAI, 2017). Portanto sugerir uma compreensão aprofundada do MAT, o seu papel e moléculas associadas oferecerá informações cruciais sobre o comportamento biológico de diferentes tipos de tumores, consequentemente, proporcionar uma melhor taxa de sobrevida dos pacientes.

6.CONCLUSÃO

Em conclusão, nossos dados indicam que altas densidades de CD68⁺, T CD3⁺ ao redor do tumor e CD8⁺ no centro do tumor e margens invasivas associam-se significativamente à melhora da sobrevida global em pacientes com CECOF primário, porém o marcador CD20⁺ em altas densidades em regiões próximas a tumores p16⁺ apresentou correlação com metástases linfonodais igualmente ao marcador FoxP3⁺ também apresentou associação, porém sua correlação não difere entre regiões próximas ou no centro do tumor.

A imunoexpressão de marcadores inflamatórios aumentou nos tecidos tumorais, e a sua expressão intratumoral em tumores p16⁺ demonstrou menor risco de morte sugerindo uma relação entre marcadores inflamatórios e o prognóstico no carcinoma de células escamosas de orofaringe. Contudo, o estilo de vida e a utilização de agentes promotores cancerígenos como o cigarro possuem interação com o microambiente tumoral produzindo efeitos negativos na sobrevida destes pacientes diferentemente dos outros dados como familiares de câncer, o consumo de álcool e a incidência de metástases nodais que não demonstraram alterações significantes.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. M.; DIEL, L. F.; LAMERS, M. L. Macrophages and prognosis of oral squamous cell carcinoma: A systematic review. **J Oral Pathol Med.** 47, n. 5, p. 460-467, May 2018.
- ARNETH, B. Tumor microenvironment. **Medicina.** v. 56, n. 1, p. 15, 2019.
- CAMPOS, P. S. Modulação do comportamento de células do carcinoma espinocelular oral: influência de fatores químicos e físicos. 2020.
- CRAIG, S. G. *et al.* Recommendations for determining HPV status in patients with oropharyngeal cancers under TNM8 guidelines: a two-tier approach. **British Journal of Cancer**, v. 120, n. 8, p. 827-833, 2019.
- 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 OLIVEIRA FILHO, O. V. *et al.* Mismatch Repair Proteins in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Observational Study. **Head and Neck Pathology**, v. 15, n. 3, p. 803-816, 2021.
- GALBIATTI, A.L.S. *et al.* Câncer de cabeça e pescoço: causas, prevenção e tratamento. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 2, p. 239-247, 2013.
- GENTLES, A.J. *et al.* A human lung tumor microenvironment interactome identifies clinically relevant cell-type cross-talk. **Genome biology**, v. 21, n. 1, p. 1-22, 2020.
- GOU, L. *et al.* Marginal or segmental mandibulectomy: treatment modality selection for oral cancer: a systematic review and meta-analysis. **International journal of oral and maxillofacial surgery.** v. 47, n. 1, p. 1-10, 2018.
- GOULART, A.P.S *et al.* Avaliação da expressão de telomerase (hTert), Ki-67 e P16iNK4a em lesões intraepiteliais cervicais de baixo e alto grau. 2016.
- INCA. Estimativa de Câncer no Brasil. **INCA.** 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acessado em: 25/04/2022.
- KRISHNAMURTHY, S. *et al.* Detection of minimal residual disease in blood and bone marrow in early stage breast cancer. **Cancer**, v. 116, n. 14, p. 3330-3337, 2010.
- KWON, M. *et al.* Recurrence and cancer-specific survival according to the expression of IL-4R α and IL-13R α 1 in patients with oral cavity cancer. **European Journal of Cancer**, v. 51, n. 2, p. 177-185, 2015.
- LACET, D. F. R. Qual o significado clínico-patológico da imunoexpressão de CD20 no linfoma de Hodgkin clássico?. 2020.

LIU, F. *et al.* TBL1XR1 Is Highly Expressed in Gastric Cancer and Predicts Poor Prognosis. **Dis Markers**, 2016.

LU, X. *et al.* The impact of tobacco exposure on tumor microenvironment and prognosis in lung adenocarcinoma by integrative analysis of multi-omics data. **International Immunopharmacology**, v. 101, p. 108253, 2021.

LU, Y. *et al.* Epigenetic silencing of the DNA mismatch repair gene, MLH1, induced by hypoxic stress in a pathway dependent on the histone demethylase, LSD1. **Cell Reports**. v.8, n.2, p.501-513, 2014.

LYDIATT, W.; O'SULLIVAN, B.; PATEL, S. Major Changes in Head and Neck Staging for. **Am Soc Clin Oncol Educ B**. v.2018, p.505–514, 2018.

LYDIATT, W.M. Head and Neck Cancers—Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, p. 122-137, 2017.

MEHANNA, H. *et al.* 911O Performance of dual p16 and HPV testing for determining prognosis in cancer of the oropharynx, the EPIC-OPC Study. **Annals of Oncology**, v. 31, p. S658-S659, 2020.

MIKSCH, R.C. *et al.* Prognostic impact of tumor-infiltrating lymphocytes and neutrophils on survival of patients with upfront resection of pancreatic cancer. **Cancers**, v. 11, n. 1, p. 39, 2019.

NGUYEN J. *et al.* Morphine stimulates cancer progression and mast cell activation and impairs survival in transgenic mice with breast cancer. **British journal of Anaesthesia**, v.113, n. 1, p. 4-13, 2014.

SANTOS, T.H.B.D.P. *et al.* Clinical findings and risk factors to oral squamous cell carcinoma in young patients: A 12-year retrospective analysis. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 21, n. 2, p. e151, 2016.

SCUTTI, J. A. B. *et al.* Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSCC): desvendando os mistérios do microambiente tumoral. **Revista da Associacao Paulista de Cirurgioes Dentistas**, v. 70, n. 2, p. 156-163, 2016.

WOLF, G.T. *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: a preliminary study. **Oral oncology**. v. 51, n. 1, p. 90-95, 2015

WU, T; DAI, Y. Tumor microenvironment and therapeutic response. **Cancer letters**, v. 387, p. 61-68, 2017.

XIAO, L. *et al.* Multiple myeloma-associated skin light chain amyloidosis: A case of misdiagnosis. **Oncology Letters**. v. 11, n. 6, p. 3617-3620, 2016.

YANG, M. *et al.* GALC Triggers Tumorigenicity of Colorectal Cancer via Senescent Fibroblasts. **Frontiers in Oncology**. v. 10, p. 380, 2020

7.TABELAS

Tabela 1: Caracterização do microambiente tumoral e imunomarcacão de marcadores CD3, CD8, CD20, CD68 nas regiões de MRC, TP e ML.

	CD3		CD8		CD20		CD68		FoxP3	
	IT	PT	IT	PT	IT	PT	IT	PT	IT	PT
Tecido										
MRC (n=25)	50,81±40,26	105,66±95,03	35,98±39,51	49,42±52,06	7,97±14,50	39,16±41,75	12,23±10,39	39,28±24,65	14,23±12,21	51,98±34,26
TP p16- (n=29)	20,83±22,01*	145,41±110,23	19,31±20,21*	52,46±44,88	4,18±10,10	25,86±33,66	30,48±18,87	68,13±33,33	19,88±65,23	38,58±42,07
TP p16+ (n=21)	53,90±47,97	171,90±159,50	38,31±38,40	79,00±56,78	14,42±17,53*	46,84±46,24	43,33±23,74*	72,86±32,17	12,89±17,98	38,00±31,97
ML p16- (n=16)	59,44±87,79	162,89±148,46	41,89±54,85	74,78±80,25	40,22±46,75*†	127,67±150,075*	63,44±30,83*	90,89±53,06	68,75±42,02*	108,63±57,60*
ML p16+ (n=9)	63,50±64,32	215,50±80,77	39,40±29,88	98,20±72,94	63,44±104,62*†	114,72±104,93*	54,40±41,31*	90,53±48,46	53,30±28,69*	82,20±35,83*
p-Valor ^a	0,005	0,191	0,045	0,208	<0,001	0,013	0,005	0,539	<0,001	<0,001

^aTeste de Kruskal-Wallis/Dunn, *p<0,05 versus outros grupos; †p<0,05 versus outros grupos; (média ± SD). MRC = Margens de ressecção cirúrgica; TP = Tumores primários; ML = Metástase linfonodal.

Tabela 2: As características clínico-patológicas e de fatores de risco da coorte e a associação com a expressão de proteínas do microambiente tumoral e marcadores CD3, CD8, CD20, CD68 e FoxP3 no CECOF p16-.

	CD3		CD8		CD20		CD68		FoxP3	
	IT	PT	IT	PT	IT	PT	IT	PT	IT	PT
Sexo										
Homens (n=24)	19,86±19,84	149,91±110,56	18,90±17,97	52,15±42,65	3,64±10,37	22,36±34,12	28,65±15,96	71,70±32,09	22,80±74,47	42,55±45,20
Mulheres (n=5)	23,86±29,49	131,29±116,66	20,67±28,49	53,50±56,21	6,17±9,62	38,67±31,30	35,75±26,15	57,88±36,92	10,17±7,28	25,33±28,51
p-Valor^b	0,838	0,646	0,855	0,808	0,192	0,109	0,603	0,310	0,359	0,235
Idade										
≤60 (n=5)	10,00±8,29	74,17±45,54	7,60±7,09	26,20±17,73	1,67±1,86	14,00±15,39	19,83±10,34	57,33±22,20	8,20±6,14	25,20±22,86
>60 (n=24)	23,65±23,68	164,00±115,10	22,10±21,40	58,71±47,35	4,86±11,31	29,09±36,74	33,04±19,69	70,72±35,35	22,67±72,58	41,76±45,30
p-Valor^b	0,169	0,041	0,133	0,172	0,534	0,694	0,054	0,381	0,601	0,558
História de câncer na família										
Sim (n=5)	42,00±35,84	202,50±202,34	41,67±27,72	78,83±67,39	13,33±19,55	57,83±52,76	45,86±29,53	68,57±42,34	63,67±134,51	66,17±69,16
Não (n=24)	15,30±13,06	130,52±70,98	12,60±11,40	44,55±34,20	1,68±3,09	17,14±20,55	26,00±12,01	68,00±31,32	6,75±7,03	30,30±27,52
p-Valor^a	0,071	0,872	0,009	0,315	0,277	0,217	0,076	0,981	0,119	0,201
Histórico de Fumo										

Sim (n=6)	21,00±26,71	159,33±110,76	17,25±25,23	51,38±50,49	4,33±8,11	28,44±31,40	35,22±24,14	67,33±40,59	8,13±6,01	26,38±27,12
Não (n=23)	20,75±20,34	139,15±112,28	20,22±18,32	52,94±43,73	4,11±11,12	24,63±35,45	28,55±16,53	68,45±30,97	25,11±78,41	44,00±46,89
p-Valor^a	0,759	0,524	0,419	0,824	0,429	0,657	0,500	0,983	0,616	0,331
Consumo de Álcool										
Sim (n=5)	13,29±12,61	153,29±70,11	15,57±10,64	42,43±39,02	2,00±3,06	24,00±31,90	26,71±10,75	69,00±43,51	9,14±9,51	22,86±14,81
Não (n=24)	23,23±23,99	142,91±121,53	20,68±22,85	56,16±47,29	4,90±11,51	26,48±34,97	31,58±20,71	67,88±30,90	23,84±76,27	44,37±47,47
p-Valor^a	0,296	0,346	0,862	0,506	0,977	0,852	0,850	0,795	0,794	0,506
cT										
T1/2 (n=12)	16,83±15,30	123,58±72,54	11,64±12,42	51,18±33,91	1,82±3,74	15,82±14,79	22,92±13,05	60,67±28,65	7,00±5,39	32,82±31,64
T3/4 (n=17)	23,87±26,64	164,73±139,00	25,15±23,16	58,92±54,55	6,47±13,20	36,53±41,71	35,47±21,54	76,76±35,97	31,21±88,65	43,86±50,67
p-Valor^a	0,625	0,626	0,048	0,862	0,166	0,405	0,039	0,278	0,869	0,742
cN										
N0 (n=8)	13,44±13,64	118,22±87,42	11,43±15,51	48,43±42,33	0,25±0,46	21,63±24,30	25,40±10,33	63,40±28,45	4,38±4,07	28,50±34,68
N+ (n=21)	26,57±27,85	167,00±134,03	23,31±23,62	64,85±51,52	8,07±13,37	34,64±41,16	32,93±25,23	76,60±39,33	33,50±87,97	51,14±48,20
p-Valor^a	0,219	0,329	0,044	0,383	0,028	0,837	0,846	0,437	0,028	0,035

*p<0,05 versus outros grupos; teste de ^aMann-Whitney; ^bTeste de Wilcoxon; p<0,05 (média ± DP). MSI = instabilidade de microssatélites.

Tabela 3: As características clínico-patológicas e de fatores de risco da coorte e a associação com a expressão de proteínas do microambiente tumoral e marcadores CD3, CD8, CD20, CD68 e FoxP3 no CECOF p16+.

	CD3		CD8		CD20		CD68		FoxP3	
	IT	PT	IT	PT	IT	PT	IT	PT	IT	PT
Sexo										
Homens (n=14)	45,21±42,60	159,36±185,76	26,00±19,65	66,21±52,04	15,00±19,46	40,00±33,75	43,79±22,88	67,36±32,96	7,08±7,96	25,00±20,31
Mulheres (n=7)	71,29±56,67	197,00±94,51	62,93±54,94	104,57±61,12	13,17±13,95	61,67±67,67	42,43±27,25	83,86±29,72	25,50±27,07	66,17±36,04
p-Valor^b	0,233	0,117	0,126	0,205	0,825	0,661	0,911	0,247	0,036	0,014
Idade										
≤60 (n=7)	79,71±52,85	229,57±188,39	63,57±53,39	83,43±64,40	25,67±20,43	74,00±60,98	46,14±26,49	80,57±38,61	26,80±29,89	42,20±40,71
>60 (n=14)	41,00±41,40	143,07±141,67	25,68±20,92	76,79±55,05	9,23±13,95	34,31±33,46	41,93±23,17	69,00±29,25	7,93±8,47	36,50±29,93
p-Valor^b	0,062	0,205	0,093	0,881	0,037	0,136	0,765	0,218	0,094	0,890

História de câncer na família

Sim (n=7)	58,86±35,24	282,43±223,96	51,36±43,32	99,00±68,53	24,50±22,37	52,50±19,46	50,14±25,96	88,14±37,16	6,20±3,11	48,20±41,87
Não (n=14)	51,43±54,29	116,64±78,23	31,79±35,57	69.00±49,70	9,77±13,36	44,23±55,02	39,93±22,76	65,21±27,67	15,29±20,52	34,36±28,66
p-Valor ^a	0,332	0,086	0,218	0,370	0,111	0,254	0,332	0,135	0,780	0,405

Histórico de fumo

Sim (n=4)	90,25±55,77	322,25±17,.70	73,00±49,22	131,50±40,78	31,25±21,93	91,25±68,05	51,75±8,42	78,50±19,12	20,50±15,80	66,00±30,07
Não (n=17)	45,35±43,43	136,53±138,19	30,15±31,90	66,65±53,55	9,93±13,77	35,00±32,30	41,35±25,87	71,53±34,86	10,87±18,47	30,53±28,93
p-Valor ^a	<i>0,037</i>	<i>0,016</i>	<i>0,044</i>	<i>0,039</i>	<i>0,043</i>	<i>0,037</i>	0,194	0,501	<i>0,031</i>	<i>0.036</i>

Consumo de Álcool

Sim (n=8)	55,00±53,56	200,00±179,46	43,00±46,02	85,88±60,03	18,43±22,29	60,86±63,08	42,50±18,21	63,50±27,39	13,88±12,62	43,25±32,97
Não (n=13)	53,23±46,49	154,62±150,87	35,42±34,62	74,77±56,75	12,08±14,69	38,67±33,63	43,85±27,29	78,62±34,53	12,18±21,66	34,18±32,26
p-Valor ^a	0,942	0,515	0,800	0,612	0,522	0,447	0,913	0,538	0,060	0,509

cT										
T1/2 (n=9)	78,56±59,09	168,67±104,68	56,72±49,51	96,44±58,08	14,75±14,13	62,75±61,36	53,00±25,22	78,67±26,62	23,25±24,67	61,25±34,61
T3/4 (n=12)	34,64±29,07	183,55±202,42	22,64±20,21	69,09±56,02	15,60±20,85	38,80±28,42	36,00±21,69	71,91±36,00	5,60±2,76	22,50±16,08
p-Valor^a	0,087	0,569	0,034	0,287	0,687	0,657	0,087	0,518	0,196	0,010
cN										
N0 (n=6)	64,80±66,74	142,00±107,93	45,00±51,44	70,80±56,35	10,80±13,18	53,40±43,18	40,60±22,53	84,00±26,87	11,25±14,13	39,50±23,22
N+ (n=15)	52,57±45,43	195,64±182,50	37,04±37,33	85,14±61,15	18,33±19,48	51,83±48,83	45,29±26,39	72,79±34,27	14,38±20,56	42,15±35,05
p-Valor^a	0,781	0,579	1,000	0,610	0,561	0,673	0,781	0.516	0,691	0.821

*p<0,05 versus outros grupos; teste de ^aMann-Whitney; ^bTeste de Wilcoxon; p<0,05 (média ± DP). MSI = instabilidade de microssatélites.

Tabela 4: Associação dos aspectos clínico-patológicos e proteínas do microambiente tumoral e imunocoloração de marcadores CD3, CD8, CD20, CD68 e FoxP3 com as taxas de sobrevida em p16+ e p16- CECOF.

	p16-				p16+			
	10-anos OS	Média±SE (CI95%)	Mediana	p-Valor	10-anos OS	Média±SE (CI95%)	Mediana	p-Valor
Todas as amostras	18 (56,3%)	57,53±8,43 (41,00-74,05)	62	-	12 (57,1%)	75,92±11,14 (54,08-97,76)	-	-
Sexo								
Homens	12 (50,0%)	46,37±8,52 (29,67-63,06)	45	0,225	7 (50,0%)	66,02±13,12 (40,31-91,73)	33	0,325
Mulheres	6 (75,0%)	75,57±15,80 (44,60-106,54)	.		5 (71,4%)	92,00±17,12 (58,44-125,56)	.	
Idade								
≤60	6 (85,7%)	82,29±10,85 (61,03-103,54)	.	0,151	5 (71,4%)	92,29±16,69 (59,58-124,99)	.	0,308
>60	12 (48,0%)	51,31±9,17 (33,33-69,29)	45		7 (50,0%)	57,79±11,32 (35,60-79,97)	40	
Histórico de câncer na família								
Sim	5 (62,5%)	47,00±11,00 (25,45-68,55)	62	0,890	4 (57,1%)	65,14±11,49 (42,62-87,66)	.	0,710
Não	13 (54,2%)	57,26±9,59 (38,47-76,05)	45		8 (57,1%)	74,50±14,11 (46,84-102,16)	.	
Histórico de Fumo								

Sim	4 (44,4%)	41,63±14,64 (12,94-70,33)	21	0,299	2 (50,0%)	57,75±20,28 (17,99-97,51)	33	0,757
Não	14 (60,9%)	58,81±10,24 (38,74-78,89)	62		10 (58,8%)	77,66±12,29 (53,57-101,75)	.	
Consumo de Álcool								
Sim	3 (42,9%)	33,86±11,40 (11,52-56,19)	21	0,387	4 (50,0%)	55,38±14,63 (26,70-84,05)	33	0,495
Não	15 (60,0%)	59,57±9,53 (40,89-78,26)	62		8 (61,5%)	81,85±13,54 (55,31-108,38)	.	
cT								
T1/2	7 (53,8%)	53,10±11,42 (30,73-75,48)	45	0,769	5 (55,6%)	74,44±17,27 (40,60-108,29)	.	0,729
T3/4	11 (64,7%)	66,26±11,58 (43,57-88,95)	.		7 (63,6%)	79,21±14,26 (51,27-107,15)	.	
cN								
N0	5 (50,0%)	53,82±14,18 (26,02-81,62)	45	0,477	4 (80,0%)	75,00±14,31 (46,95-103,05)	.	0,430
N+	11 (68,8%)	63,58±10,52 (42,95-84,20)	.		8 (57,1%)	75,53±13,75 (48,58-102,48)	.	
CD3 intratumoral								
Até 10	4 (33,3%)	39,67±11,09(17,92-61,41)	21	0,193	1 (50,0%)	41,00±19,80 (2,19-79,81)	13	0,781
>10	11 (64,7%)	60,58±10,01(40,95-80,20)	62		11 (57,9%)	76,81±11,65 (53.98-99,64)	.	
CD3 peritumotal								
Até 120	7 (58,3%)	53,74±12,98(28,30-79,18)	24	0,908	2 (22,2%)	36,72±13,18 (10,88-62,56)	21	0,004

>120	8 (47,1%)	49,15±9,70 (30,14-68,16)	45		10 (83,3%)	102,36±11,43 (79,97-124,75)	.	
CD8 intratumoral								
Até 25	11 (61,1%)	58,41±9,94 (38,93-77,89)	.	0,304	4 (36,4%)	45,45±12,46 (21,04-69,87)	21	0,026
>25	3 (37,5%)	42,50±13,56 (15,93-69,07)	12		8 (80,0%)	102,00±11,39 (79,67-124,33)	.	
CD8 peritumotal								
Até 40	8 (53,3%)	52,82±10,70 (31,85-73,78)	62	0,969	3 (50,0%)	69,83±20,55 (29,56-110,11)	27	0,684
>40	6 (54,5%)	52,83±12,51 (28,30-77,36)	26		9 (60,0%)	75,69±12,49 (51,20-100,18)	.	
CD20 intratumoral								
Até 5	10 (43,5%)	46,03±8,36 (29,65-62,42)	26	0,347	5 (62,5%)	83,38±16,73 (50,58-116,17)	.	0,961
>5	4 (80,0%)	71,50±18,62 (35,01-107,99)	.		7 (63,6%)	78,18±14,83 (49,11-107,25)	.	
CD20 peritumotal								
Até 20	8 (50,0%)	50,92±10,15 (31,02-70,81)	62	0,925	4 (57,1%)	76,43±19,13 (38,94-113,92)	.	0,739
>20	6 (50,0%)	41,98±9,64 (23,08-60,88)	26		8 (66,7%)	81,40±13,74 (54,46-108,33)	.	
CD68 intratumotal								
Até 40	14 (53,8%)	57,48±9,16 (39,53-75,43)	45	0,881	6 (54,5%)	71,77±14,29 (43,76-99,79)	.	0,915

>40	3 (60,0%)	59,88±17,34(25,90-93,85)	62		6(60,0%)	78,30±16,31(46,33-110,27)	.	
CD68								
peritumoral								
Até 70	9 (56,3%)	60,78±11,44 (38,34-83,21)	62	0,544	3(27,3%)	42,00±13,34(15,84-68,16)	21	0,003
>70	8 (53,3%)	46,45±11,24 (24,43-68,48)	24		9(90,0%)	110,33±9,11(92,47-128,20)	.	
FOXP3								
intratumoral								
Até 5	6 (46,2%)	47,82±12,85 (22,63-73,00)	26	0,249	4(40,0%)	57,70±15,05(28,21-87,19)	27	0,308
>5	9 (69,2%)	66,67±11,20 (44,72-88,61)	.		6(66,7%)	84,83±16,55(52,40-117,27)	.	
FOXP3								
peritumoral								
Até 30	9 (60,0%)	60,36±12,45 (35,95-84,76)	45	0,979	4(44,4%)	60,78±16,26 (28,92-92,64)	27	0,515
>30	6 (54,5%)	55,35±12,40 (31,04-79,65)	.		6(60,0%)	76,59±16,50 (44,24-108,93)	.	

*p<0,05. Teste Log-Rank Mantel Cox; SE = erro padrão; IC95% = intervalo de confiança 95% da média de sobrevida; OS = sobrevida global

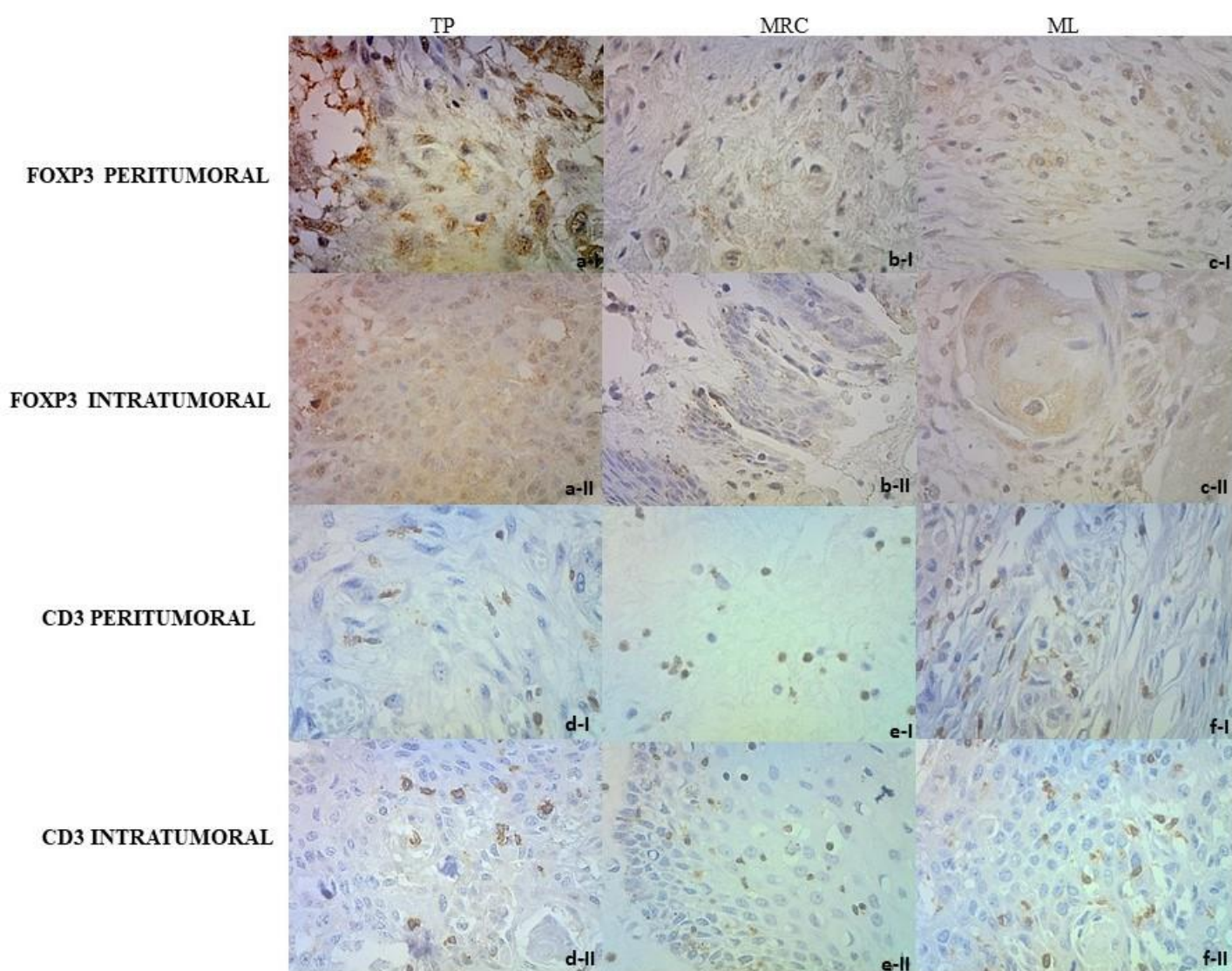
Tabela 5: Preditores de sobrevida global de pacientes com CECOF p16- e p16+ segundo modelo de regressão logística multinomial.

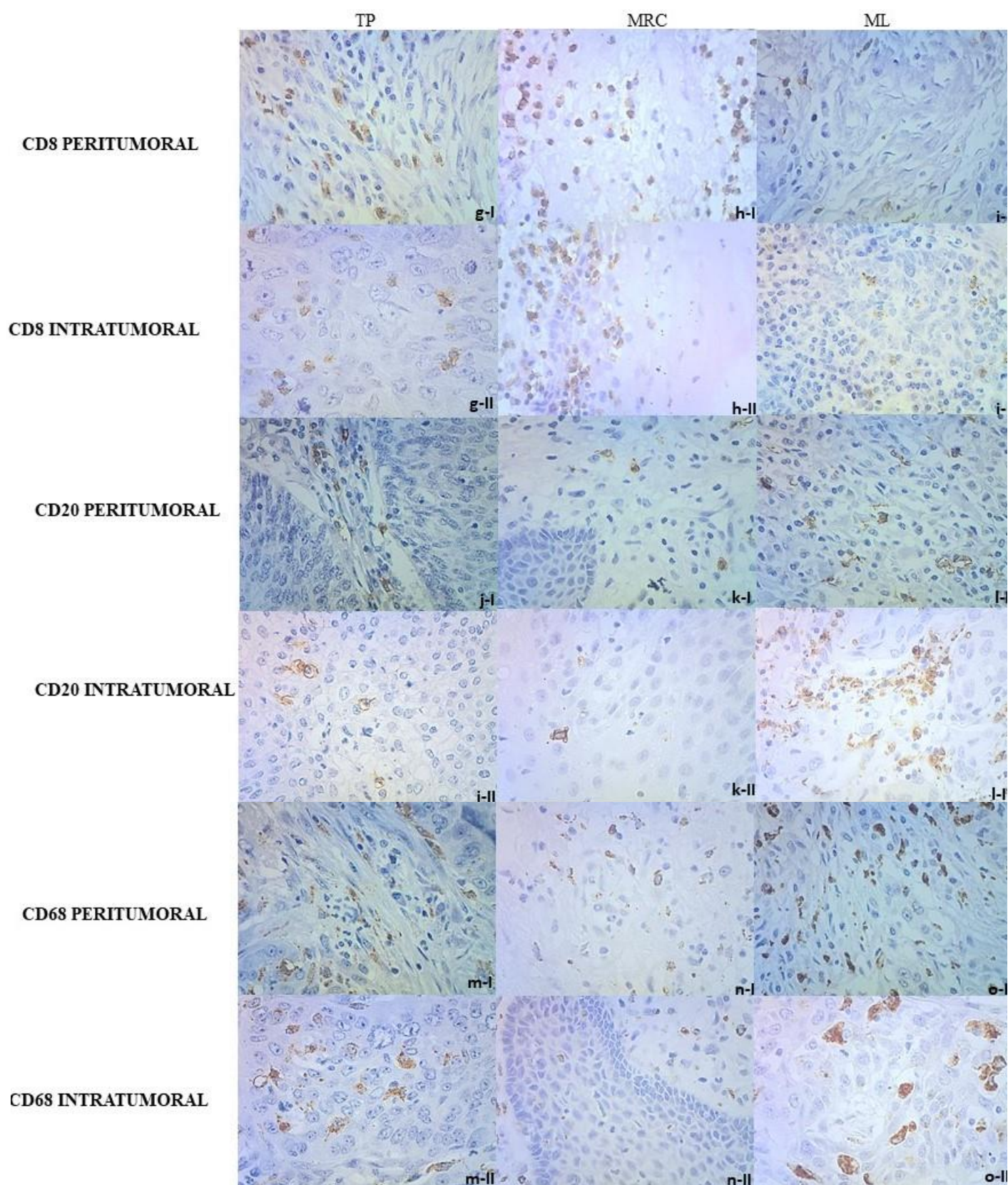
	p-Valor	p16-				P-Valor	p16+		
		HR	CI95%				HR	CI95%	
Sobrevida Global p16									
CD3 (intratumoral)	0,514	0,73	0,29	1,86	*0,023	0,70	0,52	0,95	
CD3 (peritumoral)	0,433	0,97	0,89	1,05	0,952	1,00	0,99	1,01	
CD8 (intratumoral)	0,667	1,17	0,58	2,35	0,235	1,06	0,96	1,16	
CD8 (peritumoral)	0,696	1,03	0,89	1,19	0,375	1,02	0,98	1,05	
CD20 (intratumoral)	0,306	1,55	0,67	3,57	0,512	0,89	0,63	1,25	
CD20 (peritumoral)	0,389	0,92	0,75	1,12	0,814	1,00	0,97	1,04	
CD68 (intratumoral)	0,771	1,02	0,88	1,19	*0,030	1,43	1,04	1,98	
CD68 (peritumoral)	0,270	0,93	0,81	1,06	0,768	0,99	0,95	1,04	
FoxP3 (intratumoral)	0,612	1,11	0,75	1,63	0,810	0,96	0,70	1,32	
FoxP3 (peritumoral)	0,224	1,09	0,95	1,25	0,319	1,03	0,98	1,08	

*p<0,05. Regressão Cox. HR = risco de perigo para morte; IC = intervalo de confiança. HR e IC estimados pelo modelo de regressão de risco proporcional de Cox.

8.FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografias representativas da imunoexpressão dos marcadores CD3, CD8, CD20, CD68, FoxP3 em carcinoma de células escamosas de orofaringe, em tumor primário, margem de ressecção cirúrgica e em metástase linfonodal.





Fonte: própria. MRC = margem de ressecção cirúrgica, TP = tumor primário, ML = metástase linfonodal. Imuno-histoquímica para FoxP3 (a-I até c-II); CD3 (d-I até f-II); CD8 (g-I até i-II); CD20 (j-I até l-II); CD68 (m-I até o-II).

9.ANEXOS

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 sobrevida de participantes portadores de câncer de boca e orofaringe diagnosticados no hospital do câncer do Ceará e no serviço de odontologia do departamento de clínica odontológica da Ceará.

Objetivo da Pesquisa:

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

Secundários - Determinar em biópsias excisionais de carcinomas de boca e orofaringe, através de imunohistoquímica convencional e tissue microarray (TMA), a expressão de: 1. Receptores opioides Mu (μ), Kappa (κ) e Delta (δ) (Anticorpos anti-Mu, anti-Kappa, anti-Delta e anti-Mu 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

ANEXO 2

INSTITUTO DO CÂNCER DO CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 1.618.057

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

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos - O primeiro momento da pesquisa (retrospectivo) tem como riscos aqueles associados com a análise e guarda de prontuários (sigilo da informação e coleta dos dados) e o possível desconforto/constrangimento para responder questionário sobre a doença. No segundo momento da pesquisa os riscos estão relacionados com o uso do material de arquivo (blocos de parafina) que podem ser perdidos/extraviados ou exauridos.

Benefício - Como benefício o(a) pesquisador(a) aponta o conhecimento que pode advir do estudo dos receptores 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

ANEXO 3

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_BÁSICAS_DO_PROJETO_631925.pdf	11/05/2016 21:01:35		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEcorrigido.docx	11/05/2016 21:00:23	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	11/05/2016 21:00:11	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_631925.pdf	29/03/2016 15:49:49		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECORRIGIDO.pdf	29/03/2016 15:49:31	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaopatologiaicc.pdf	29/03/2016 15:12:21	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaocbepcicc.pdf	29/03/2016 15:12:01	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_631925.pdf	22/03/2016 21:20:14		Aceito
Cronograma	cronogramaatualizado.pdf	22/03/2016 21:19:28	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_631925.pdf	23/02/2016 18:59:06		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	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_BÁSICAS_DO_PROJETO_631925.pdf	07/12/2015 19:56:21		Aceito
Outros	fieldepositarioo.jpg	07/12/2015 19:54:08	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Outros	fieldepositario.jpg	07/12/2015 19:53:25	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	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@hospicancer-icc.org.br

ANEXO 4

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
UF: CE **Município:** FORTALEZA **CEP:** 60.441-700
Telefone: (85)3288-4653 **Fax:** (85)3228-4653 **E-mail:** eco@hospicancer-icc.org.br