



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



CARLA MOSCONI

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE MEDIADORES ENVOLVIDOS NA
EVASÃO IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS TUMORAIS EM CARCINOMA
ADENÓIDE CÍSTICO DE GLÂNDULAS SALIVARES**

Goiânia
2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

Dissertação Tese

2. Nome completo do autor

Carla Mosconi

3. Título do trabalho

Avaliação imunoistoquímica de mediadores envolvidos na evasão imunológica de células tumorais em carcinoma adenóide cístico de glândulas salivares

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Elismauro Francisco De Mendonça, Professor do Magistério Superior**, em 20/10/2020, às 11:42, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **CARLA MOSCONI, Discente**, em 21/10/2020, às 08:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1625409** e o código CRC **AC363E4A**.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

CARLA MOSCONI

**AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE MEDIADORES ENVOLVIDOS NA
EVASÃO IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS TUMORAIS EM CARCINOMA
ADENÓIDE CÍSTICO DE GLÂNDULAS SALIVARES**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás como requisito para obtenção do título de Doutora em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica.

Linha de pesquisa: Alterações do Sistema Estomatognático

Orientador: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça

Goiânia
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Mosconi, Carla

AVALIAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE MEDIADORES ENVOLVIDOS NA EVASÃO IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS TUMORAIS EM CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO DE GLÂNDULAS SALIVARES [manuscrito] / Carla Mosconi. - 2020.

52 f.: il.

Orientador: Profa. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade de Odontologia (FO), Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, tabelas.

1. neoplasias. 2. glândulas salivares. 3. carcinoma adenóide cístico. 4. evasão tumoral. I. Mendonça, Dr. Elismauro Francisco de, orient. II. Título.

CDU 616.314



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

ATA DE DEFESA DE TESE

Ata Nº **33** da sessão de Defesa de Tese de **Carla Mosconi** que confere o título de Doutora em **Odontologia**, na área de concentração em **Clínica Odontológica**.

Aos **quinze dias do mês de outubro de dois mil e vinte**, a partir das **15:00**, por meio de videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada “**Avaliação imunoistoquímica de mediadores envolvidos na evasão imunológica de células tumorais em carcinoma adenóide cístico de glândulas salivares**”. Os trabalhos foram instalados pelo Orientador, Professor Doutor **Elismauro Francisco de Mendonça (PPGO/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professora Doutora **Tarcília Aparecida Silva (PPGO/UFG)**, membro titular externo; Professora Doutora **Pollianna Muniz Alves (PPGO/UEPB)**, membro titular externo; Professor Doutor **Ricardo Alves de Mesquita (PPGO/UFG)**, membro titular externo; Professora Doutora **Nádia do Lago Costa (PPGO/UFG)**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título do **trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor **Elismauro Francisco de Mendonça**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos **quinze dias do mês de outubro de dois mil e vinte**.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **POLLIANNA MUNIZ ALVES, Usuário Externo**, em 15/10/2020, às 18:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elismauro Francisco De Mendonça, Professor do Magistério Superior**, em 15/10/2020, às 18:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Tarcília Aparecida da Silva, Usuário Externo**, em 15/10/2020, às 18:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Alves de Mesquita, Usuário Externo**, em 15/10/2020, às 18:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).

Documento assinado eletronicamente por **Nádia Do Lago Costa, Coordenadora de Pós-Graduação**, em 16/10/2020, às 08:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cláudio Rodrigues Leles, Vice-Coordenador de Pós-graduação**, em 16/10/2020, às 09:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lídia Moraes Ribeiro Jordão, Professora do Magistério Superior**, em 16/10/2020, às 09:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1613013** e o código CRC **999AF37C**.

Referência: Processo nº 23070.010194/2020-85

SEI nº 1613013

DEDICATÓRIA

Primeiramente à DEUS, por me reerguer a cada momento em que pensei em desistir. Não foi uma jornada fácil... Meu sonho e amor pela Odontologia começou quando eu tinha apenas 12 anos, lá no ano de 2002, quando eu ainda era ASB (Auxiliar de Saúde Bucal) em Quirinópolis-GO. Trabalhei no consultório da Dra. Suely Mariê Nakashima e Dr. Cleidisson Martins da Silva por quase 4 anos, quando no ano de 2006 fui contemplada com uma bolsa de estudos para estudar em Goiânia. Foi no Colégio MEGA que tive o privilégio de fazer o meu 3º ano do ensino médio. Sonhava muito em fazer a minha graduação em uma universidade pública, e com a ajuda d'Ele consegui ser aprovada no curso de Odontologia na Universidade Federal de Uberlândia em agosto do ano de 2009 (após 2 anos e meio de cursinho pré-vestibular). Na UFU, tornei-me cirurgiã-dentista no dia 30 de agosto de 2014. E foi na FOUFU que iniciei a minha vida de pesquisadora, tudo se deu quando o Prof. Adriano Mota Loyola, juntamente com o Prof. Paulo Rogério de Faria me concederam a oportunidade de realizar duas iniciações científicas, e foi fantástico. Naquele momento a “sementinha havia sido plantada”. No ano de 2015, decidi ir além e enfrentar um novo desafio, e assim, iniciei a minha pós-graduação nível stricto sensu mestrado na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, instituição que me acolheu com muito carinho. Quem diria que eu poderia chegar tão longe assim!

Após a conclusão do mestrado, decidi continuar os estudos para me tornar uma doutora e assim, dei início ao meu doutorado em 2017. Momentos desafiantes fizeram parte dessa trajetória, vieram grandes responsabilidades, estudos e fichamento de artigos, noites mal dormidas, aulas, projetos de extensão e junto a isso tudo foram sendo construídas as amizades, e essas irão permanecer para além do curso de pós-graduação. Durante o meu mestrado e doutorado tive a oportunidade de ser orientada pela Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista, pessoa pela qual tenho muito respeito e carinho, aprendi muito esses anos que passei na FOUFG.

Atualmente, sou professora na Faculdade União de Goyazes (FUG) em Trindade/GO, onde coordeno e ministro aulas nas disciplinas de Estomatologia e Diagnóstico bucal, também ministro aulas na disciplina de Radiologia Odontológica e tenho a oportunidade de orientar alunos de iniciação científica.

No atual momento da minha vida, apenas agradeço à Deus por tantas bênçãos. Sei que tenho um propósito, e sei também que estou exatamente onde eu deveria estar, e com as pessoas certas, fundamentais para o meu crescimento profissional e pessoal.

Um filme de todos esses momentos que vivi, agora está passando em minha cabeça, e é muito gratificante. Sinto muito orgulho da minha trajetória acadêmica. Obrigada meu senhor meu Deus, eu tenho convicção que muitas outras conquistas estão por vir.

Dedico também a minha família, minha raiz, minha origem, obrigada ao meu pai **José Carlos Mosconi**, o senhor faz muita falta, como eu gostaria de compartilhar esses momentos com o senhor, mas sei, que de onde estiver, o senhor olha por nós. Agradeço imensamente à minha mãe **Ivaneide Petrolini Mosconi** que nunca mediu esforços para formar cada uma de suas filhas. Mesmo não tendo graduação, sonhava em nos ver formadas, sempre acreditando que a educação poderia mudar as nossas vidas para melhor, e acertou em cheio. Toda minha admiração e eterno respeito, a senhora é uma guerreira e uma inspiração constante para mim.

Às minhas irmãs **Aline Mosconi** e **Flaviani Mosconi** e aos meus sobrinhos **Mable Vitória, Pedro Henrique, Rafael e Helena Maria**, só posso agradecer por todos os momentos que vocês me proporcionam, vocês me fazem querer ser melhor a cada dia.

E por fim, gostaria de deixar registrado o meu muito obrigada aos grandes amores da minha vida **Guilherme Augusto Muniz**, meu companheiro há 17 anos e a minha amada filha **Mariana Mosconi Muniz**. Tenho muito orgulho da minha família.

Gui, nossa família é o bem mais precioso que tenho. Sim, parece coisa de Deus, e é! Sem vocês, nada teria graça ou mesmo sentido. Que Deus continue nos abençoando e nos honrando.

Mari, minha vida, obrigada por me proporcionar momentos únicos de tanta alegria e amor. Em você eu vejo a pureza dessa vida, e toda vez que você me olha eu tenho a certeza da existência de DEUS, pois só ELE seria capaz de fazer algo tão maravilhoso. Deus foi muito generoso comigo e eu sou muito agradecida. Após o nascimento da nossa menina no dia 01/04/2019, eu posso dizer que me sinto completamente realizada, nada nesse mundo é mais importante do que vocês. Eu os AMO com todas as minhas forças!

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Goiás, na pessoa do Reitor **Prof. Dr. Edward Madureira Brasil**.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás - FO/UFG, na pessoa do diretor **Prof. Dr. Gersinei Carlos de Freitas**.

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, na pessoa da coordenadora **Prof^a. Dr^a. Nádia do Lago Costa**.

Ao Hospital Araújo Jorge/Associação de Combate ao Câncer de Goiás (HAJ/ACCG) na pessoa do Diretor **Dr. Cláudio Francisco Cabral**.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG)** e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo financiamento do estudo e pela concessão da bolsa de Doutorado.

À minha orientadora **Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista (in memoriam)**, tenho imensa gratidão por ter sido orientada pela senhora, foram anos de muito aprendizado que levarei por toda a minha vida. A senhora é uma profissional dedicada e muito exigente, tinha plena certeza que sairiam trabalhos de qualidade sob sua supervisão, e não foi diferente.

Ao **Prof. Dr. Elismauro Francisco Mendonça**, meu atual orientador, agradeço pela amizade e enriquecedora contribuição para minha formação. A humildade é uma de suas características mais marcantes, parabéns pelo profissional que és, o senhor sempre estará presente em minhas melhores lembranças como pós-graduanda.

Aos professores que contribuíram imensamente para o meu crescimento intelectual: **Prof^a. Dr^a. Tarcília Aparecida Silva, Prof. Dr. Ricardo Alves de Mesquita e Prof. Dr. Felipe Paiva Fonseca**. Vocês são referência em Patologia Oral no Brasil, obrigada pela oportunidade de ter passado momentos de muito aprendizado na **UFMG**. À **Prof^a. Dr^a. Pollianna Muniz Alves** pela leveza nas palavras, amizade e conselhos dispensados a mim, a senhora é uma querida.

À amizade de **Alcides, Lauren e Leni**, alunos de pós-graduação da **UFMG**, vocês são incríveis, alunos exemplares. São extremamente dedicados e estudiosos, sem nunca perder o bom humor. O sucesso é certo na vida de vocês. Desejo que nossa amizade perdure por muitos anos. #et al.

Às minhas alunas de I.C e companheiras de laboratório, **Ana Caroline Rodrigues de Farias** e **Gabriella Alves Quixabeira Oliveira**, vocês foram indispensáveis para a conclusão desde trabalho, obrigada!

Aos servidores da Faculdade de Odontologia da UFG em nome da **Clara** (secretária da pós-graduação), **Gláucia** (coordenadora administrativa), **Erildo** (técnico do laboratório de patologia bucal), **Elizete** (auxiliar de serviços gerais), **Estela** (guarda), **João** (porteiro) deixo o meu muito obrigada, vocês fizeram os dias estressantes se tornarem leves e mais divertidos, um fortíssimo abraço em cada um de vocês.

EPÍGRAFE

“Dizem que antes de um rio entrar no mar, ele treme de medo. Olha para trás, para toda jornada que percorreu, para os cumes, as montanhas, para o longo caminho sinuoso que trilhou através de florestas e povoados, e vê à sua frente um oceano tão vasto, que entrar nele nada mais é do que desaparecer para sempre. Mas não há outra maneira. O rio não pode voltar. Ninguém pode voltar. Voltar é impossível na existência. O rio precisa se arriscar e entrar no oceano. Somente ao entrar no oceano o medo irá desaparecer, porque apenas então o rio saberá que não se trata de desaparecer no oceano, mas de tornar-se oceano.”

Osho, citando Khalil Gilbran

RESUMO

Justificativa do estudo: O Carcinoma adenoide cístico (CAC) é um dos tumores de glândulas salivares mais comuns na região de cabeça e pescoço. Caracteriza-se por possuir evolução lenta, curso clínico prolongado, ser altamente infiltrativo, com altas taxas de recidivas, ocorrência de metástase regional e à distância. Para evitar a ocorrência de metástases, as células neoplásicas devem ser reconhecidas pelo sistema imunológico. Os mediadores que estão expressos em células neoplásicas e linfócitos, podem propiciar a imunossupressão e o escape das células tumorais favorecendo a ocorrência de metástase local e a distância. **Objetivos:** O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão das proteínas Antígeno leucocitário humano-G (HLA-G), Ligante de morte celular programada 1 (PD-L1), Ligante de morte celular programada 2 (PD-L2), Cluster de diferenciação 8 (CD8), Granzima B (GrB), Cluster de diferenciação 1a (CD1a), Cluster de diferenciação 83 (CD83), Antígeno 4 de linfócito T citotóxico (CTLA-4) e Morte celular programada 1 (PD-1) em amostras de CAC e a associação destas com os parâmetros clinicopatológicos da doença. **Material e métodos:** Foram selecionadas 36 amostras de CAC e a identificação da expressão das proteínas foi realizada pela técnica da imunistoquímica. As células neoplásicas do CAC, positivas para as proteínas HLA-G, PD-L1, PD-L2, foram avaliadas semi-quantitativamente em porcentagem de células positivas (0 – 100%) e do infiltrado inflamatório positivas para CD8, GB, CD1a, CD83, CTLA-4 e PD-1 foram quantificadas e convertidas em densidade (células/mm²). Amostras de trofoblastos, líquen plano e linfonodos foram utilizadas como controle positivos das reações. **Resultados:** O CAC apresentou escassa expressão de TIL CD8⁺, GrB⁺, CD1a⁺ e CD83⁺, assim como, escassa positividade para CTLA-4 e PD-1. De forma contrária, observou-se expressão de PD-L2 e HLA-G, enquanto PD-L1 foi negativo em todas as amostras avaliadas. Interessantemente, casos que tinham baixa densidade de TIL CD8⁺, apresentaram maiores taxas de recidivas. **Conclusão:** Nossos achados sugerem que o microambiente do CAC apresenta uma baixa imunogenicidade, representada pela escassa densidade de TIL e células dendríticas. Além disso, parece haver ativação das proteínas inibitórias imunes PD-L2 e HLA-G, o que sugere um cenário que pode favorecer o escape tumoral do sistema imunológico e contribui para o prognóstico desfavorável dessas neoplasias.

Palavras-chave: neoplasias. glândulas salivares. carcinoma adenoide cístico. evasão tumoral.

ABSTRACT

Study Rationale: Adenoid cystic carcinoma (ACC) is one of the most common salivary gland tumors in the head and neck region. It is characterized by having a slow evolution, prolonged clinical course, being highly infiltrative, with high recurrences rates, occurrence of regional and distant metastasis. To prevent the occurrence of metastases, neoplastic cells must be counteracted by the immune system. The mediators that are expressed in neoplastic cells and lymphocytes, can propitiate the immunosuppression and the escape of the tumor cells favoring the occurrence of local and distant metastasis. **Objective:** The aim of this study was to evaluate the expression of the proteins HLA-G, PD-L1, PD-L2, CD8, GrB, CD1a, CD83, CTLA-4 and PD-1 in the parenchyma and tumor stroma by immunohistochemistry CAC samples and to investigate the association of these proteins with clinical and pathological parameters. **Methods:** ACC neoplastic cells, positive for HLA-G, PD-L1, PD-L2 proteins were evaluated semi-quantitatively in percentage of positive cells (0-100%) and inflammatory infiltrate cells positive for CD8, GrB, CD1a, CD83, CTLA-4 and PD-1 were quantified in 10 random fields through an integration lattice with area of 0.0961 mm². For each protein evaluated, cut-off was established according to previous articles validated and already published in the literature. Samples of trophoblasts, lichen planus and lymph nodes were used as positive control of the reactions. **Results:** The ACC presented low expression of CD8⁺ TIL, GrB⁺, CD1a and CD83, as well as, low positivity for CTLA-4 and PD-1. Conversely, expression of PD-L2 and HLA-G was observed, while PD-L1 was negative in all the samples evaluated. Interestingly, cases that had low CD8⁺ TIL density had higher recurrence rates. **Conclusion:** Our findings suggest the ACC microenvironment features low immunogenicity, represented by the low density of TIL and dendritic cells. In addition, there appears to be activation of the PD-L2 and HLA-G immune inhibitory proteins, suggesting a scenario that may favor tumor escape from the immune system and partially explain the poor prognosis of these neoplasms.

Keywords: neoplasms. salivary glands. adenoid cystic carcinoma. tumor evasion.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Antigen presenting cells (Células apresentadoras de antígenos)
CAC	Carcinoma adenóide cístico
CD1a	<i>Cluster of differentiation 1a</i> (Cluster de diferenciação 1a)
CD8	<i>Cluster of differentiation 8</i> (Cluster de diferenciação 8)
CD 83	<i>Cluster of differentiation 38</i> (Cluster de diferenciação 83)
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen 4</i> (Antígeno 4 de linfócito T citotóxico)
DCs	Células dendríticas
FO/UFG	Faculdade de Odontologia/Universidade Federal de Goiás
GrB	<i>Granzyme B</i> - Granzima B
HAI/ACCG	Hospital Araújo Jorge/Associação de Combate ao Câncer de Goiás
HE	Hematoxilina e Eosina
HLA-G	<i>Human leukocyte antigen - G</i> (Antígeno leucocitário humano - G)
LTCs	Linfócitos T citotóxico
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> (Complexo principal de histocompatibilidade)
NK	<i>Células Natural Killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS-BSA	<i>Phosphate buffered saline - Bovine serum albumin</i> (Tampão fosfato-salino - Soro albumina bovino)
PD-1	<i>Programmed death-1</i> (Morte celular programada 1)
PD-L1	<i>Programmed death ligand 1</i> (Ligante de morte celular programada 1)
PD-L2	<i>Programmed death ligand 2</i> (Ligante de morte celular programada 2)
RE	Retículo endoplasmático
SCP	Serviço de Cabeça e Pescoço
TAP	Transportador associado a processamento de antígeno
TIL	Tumor-infiltrating lymphocytes (Linfócitos infiltrantes de tumor)
TNM	Tamanho do tumor/ Metástase regional/ Metástase à distância

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1. Caracterização clínico-patológica do carcinoma adenoide cístico	19
2.2. Resposta imunológica antitumoral e evasão de células neoplásicas	24
2.3. Mediadores envolvidos na imunossupressão local e evasão de células neoplásicas: efeitos no câncer	27
3. OBJETIVOS	31
3.1. Objetivo Geral	31
3.2. Objetivos Específicos	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	32
4.1. Obtenção, seleção e caracterização das amostras	32
4.2. Gradação histopatológica das amostras de CAC	32
4.3. Técnicas empregadas	33
4.3.1. Técnica de rotina (Hematoxilina e Eosina)	33
4.3.2. Técnica da Imunoistoquímica	33
4.4. Análise semiquantitativa e quantitativa dos dados	34
4.5. Análise estatística dos dados	35
5. PUBLICAÇÃO	36
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	37
6.1. Sobre o estudo	37
6.2. Sobre a minha trajetória no doutorado	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39
ANEXO A	46

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), os tumores de glândulas salivares representam 0,3% das neoplasias malignas e sua incidência varia de 0,4 a 13,5 casos para cada 100.000 habitantes (EL-NAGGAR et al., 2017). Embora raros, o carcinoma adenóide cístico (CAC) é uma das neoplasias mais comuns de glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual) e menores (SPIRO 1986; KHAN et al., 2001). Esses tumores apresentam evolução lenta, curso clínico prolongado, é altamente infiltrativo, apresentam altas taxas de recidiva e ocorrência de metástase regional e à distância (KHAN et al., 2001). Frequentemente são diagnosticados na quinta década de vida e afetam ambos os sexos, no entanto tem predileção por mulheres na proporção de 1,5:1 (EL-NAGGAR et al., 2017). No Brasil, dados epidemiológicos indicam que o CAC é mais comum na região Centro-Oeste (DE OLIVEIRA et al., 2009).

O CAC é representado clinicamente como um aumento de volume ou nódulo, geralmente sintomático, podendo estar associado com dormência e/ou parestesia. A lesão é frequentemente encontrada no palato, língua, mucosa jugal, lábio e assoalho da boca (EL-NAGGAR et al., 2017). A morfogênese deste tumor ainda não foi completamente elucidada, entretanto, sabe-se que são constituídos por células neoplásicas epiteliais e mioepiteliais. Tais células são organizadas nos padrões histológicos cribriforme, tubular e sólido. Esses subtipos podem estar associados a comportamentos biológicos distintos da lesão (ALVES et al., 2007; MOSKALUK, 2013). Na dependência do estadiamento clínico, o tratamento de escolha para o CAC implica na excisão cirúrgica do tumor, algumas vezes combinado à radioterapia pós-operatória (CORDESMEYER et al., 2018).

O prognóstico para o CAC é considerado ruim. Usualmente, o paciente vai a óbito devido recidivas locais e metástase à distância, sendo esta estimada entre 25-55% (SPIRO & HUVOS, 1992; BARNES et al., 2005; VAN WEERT et al., 2013). Os pulmões seguidos de ossos, cérebro e fígado são os órgãos mais acometidos e apenas 20% dos pacientes com metástases sobrevivem nos 5 primeiros anos (KOKEMUELLER et al., 2004; BARNES et al., 2005).

Para evitar a ocorrência de metástases, as células neoplásicas devem ser reconhecidas pelo sistema imunológico, que deverão atuar tanto localmente como na circulação do indivíduo (BALKWILL & MANTOVANI, 2001; LIOTTA & KOHN, 2001). O principal mecanismo da

imunidade tumoral é a destruição das células tumorais mediante a ação das células apresentadoras de antígenos (APCs) como (CD1a, CD83) e linfócitos T citotóxicos (CD8) que juntamente com as células Natural Killer exercem suas atividades através da liberação dos grânulos citotóxicos perforina e granzima B (GrB) (TRAPANI et al., 1998; IDA et al., 2005). A perforina é uma proteína que quando em altas concentrações forma poros de 5 a 20 nm de diâmetro na membrana das células alteradas, os quais atuam como um canal para o influxo da GrB, uma protease capaz de promover a morte apoptótica de células geneticamente alteradas (LOWIN et al., 1995; LOGUE & MARTIN et al., 2008).

No entanto, os tumores desenvolvem estratégias de imunossupressão, na qual, as células são capazes de adquirir diferentes fenótipos, e assim, escaparem do sistema imune (ROUAS-FREISS et al., 2003). Dentre os mecanismos de escape pode-se citar a expressão do antígeno leucocitário humano (HLA) não clássico (HLA-G), molécula co-estimulatória ou inibitória da família B7 denominadas de Ligante de morte celular programada (PD-L1 e PD-L2). Essas proteínas são capazes de inibir as células NK, LTC e APCs, as quais são fundamentais no desenvolvimento de uma resposta imune citotóxica antitumoral (DONG et al., 2004; OIKAWA et al., 2007; CAROSELLA et al., 2008). Participam também os receptores inibitórios da família CD28, Antígeno 4 associado com o linfócito T (CTLA-4) ou (CD152), que são responsáveis pela finalização da resposta imune em situações de normalidade. No entanto, quando a proteína CTLA-4 é expressa em linfócitos presentes em microambientes tumorais, são capazes de inibir a resposta citotóxica (CAROSELLA et al., 2015). A regulação da expressão dessas proteínas supramencionadas através da imunoterapia em pacientes com diversos tipos de cânceres tem se mostrado um método efetivo para reverter a imunossupressão tumoral e, assim, promover uma resposta imunológica efetiva contra as células neoplásicas (CAROSELLA et al., 2015).

Até o momento, não há estudos que investigaram conjuntamente essas proteínas no CAC. Desta forma, considerando o valor prognóstico e o potencial imunoterapêutico destas, torna-se relevante a caracterização das proteínas imunossupressoras e do perfil das células imunes e dos mediadores envolvidos na resposta antitumoral do CAC. Além disso, os dados aqui apresentados poderão contribuir para a definição de possíveis alvos terapêuticos para o tratamento deste tipo de lesão.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Caracterização clínico-patológica do Carcinoma Adenóide Cístico

O Carcinoma adenóide cístico (CAC) foi descrito pela primeira vez há aproximadamente 165 anos pelos pesquisadores Dr. Robin e Dr. Laboulbène que chamaram a lesão de “cylindroma” (TAUXE et al., 1962). Esta lesão é uma rara neoplasia maligna de glândula salivar que apresenta crescimento lento e persistente e representa menos de 1% de todas as neoplasias de cabeça e pescoço (ELLINGTON et al., 2012; VAN WEERT et al., 2013; VAN WEERT et al., 2015; COCA-PELAZ et al., 2015). O CAC ocorre com maior frequência nas glândulas salivares maiores, sendo as glândulas submandibulares as principais acometidas, com uma frequência relativa de 45% (WAHLBERG et al., 2002; BOUKHERIS et al., 2009). Pode acometer todas as faixas etárias, mas há uma predileção por pacientes de meia-idade do sexo feminino (BARNES et al., 2005). A etiopatogenia do CAC e de outros tumores de glândulas salivares é complexa e ainda não completamente elucidada, alguns fatores de risco são citados pela OMS, como por exemplo: infecção por vírus, radiação, exposição ocupacional a metais, estilo de vida, nutrição e hormônios (BARNES et al., 2005). O CAC parece ter origem das células que constituem os ductos salivares intercalares (MILLS, 2012) (Figura 1).

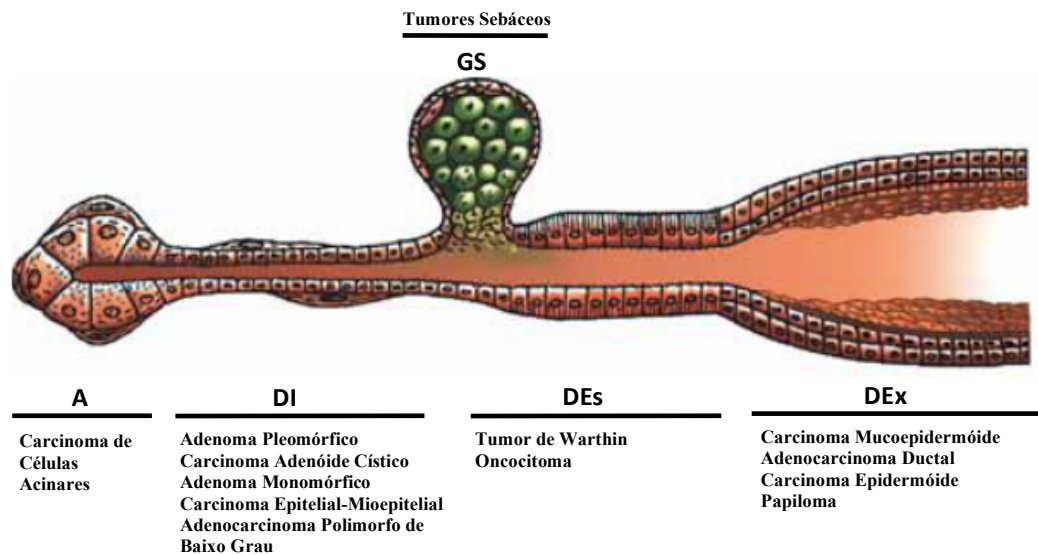


Figura 1. Semelhança morfológica de alguns tumores salivares e as diferentes estruturas epiteliais da glândula salivar: ácinos (A), ducto intercalares (DI), ducto estriado (DEs), ducto excretor (DEx) e glândula sebácea (GS). Fonte: Modificado de MILLS, 2012, p.493.

Como muitos tumores de glândulas salivares, o CAC apresenta variados padrões microscópicos. No entanto, as células que formam esses padrões são notavelmente uniformes em tamanho, forma e qualidade da coloração. Histologicamente, esta lesão exibe três padrões de crescimento, isto é, cribriforme, tubular e sólido (PERZIN et al., 1978; SZANTO et al., 1984; DARDICK, 1996) (Figura 2).

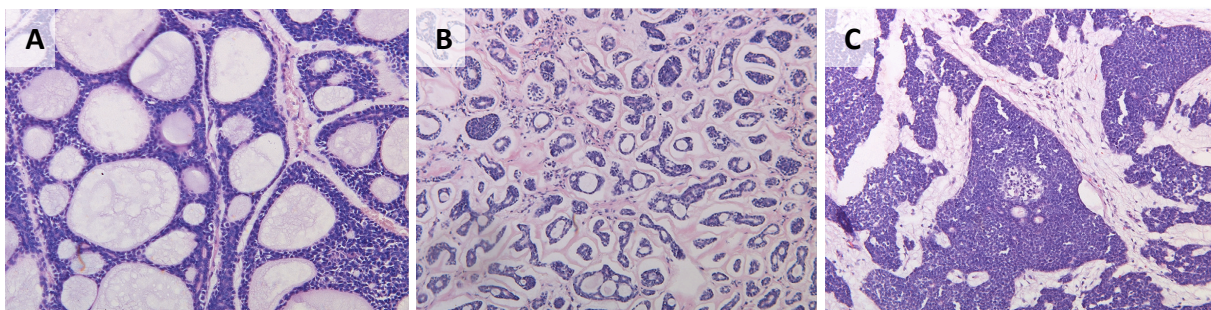


Figura 2. Padrões microscópicos do CAC: (A) Cribriforme, (B) tubular e (C) sólido. Fonte: Modificado de VAN WEERT et al., 2015, p. 72.

Sugere-se que a classificação histológica do CAC tenha significância prognóstica. Entretanto, mais recentemente, a gradação demonstrou ser talvez um preditor mais significativo de sucesso clínico. Os critérios para classificar este tumor variam de relativamente simples a mais complexos, mas geralmente CAC de grau I consistem apenas em histomorfologia cribriforme e tubular, uma mistura de padrões de crescimento cribriforme, tubular e sólido (o último com menos de 30% do tumor) indica um tumor grau II e aqueles com características predominantemente sólidas são considerados grau III. A sobrevida a longo prazo é particularmente baixa nos tumores grau III (DARDICK, 1996) (Figura 3).

Padrão cribriforme:

- Frequentemente, ninhos de tamanho variável se separam discretamente das faixas bastante uniformes de estroma colagenizado.
- Podem ser extensos lençóis de células tumorais com padrão cribriforme, aglomerados relativamente grandes, de tamanhos variados e conformados, ou cordões organizados de forma complexa.
- Ninhos cribriformes geralmente compostos de células basais / mioepiteliais relativamente pequenas, de coloração escura e levemente separadas, e estruturas pequenas, por vezes discretas, semelhantes a ductos, que podem conter produtos

secretórios; ocasionalmente, os ductos podem ser mais óbvios e as células ductais, um componente mais proeminente.

- Citologicamente, ambos os tipos de células são uniformes e a mitose é geralmente mínima.
- Espaços intercelulares redondos a ovais, muitas vezes de tamanho bastante uniforme, denominados pseudocistos, contendo azul-acinzentado pálido a material granulofibrilar rosado às vezes com padrão reticular, que se desenvolvem em relação às células basais / mioepiteliais.
- O aumento da proliferação de células basais / mioepiteliais leva a alguns ninhos com um padrão de crescimento mais sólido.
- Geralmente, bandas razoavelmente regulares de estroma relativamente acelular com vascularização limitada; não é incomum ter regiões com estroma colagenizado aumentado isolando e limitando gradativamente o padrão cribriforme clássico a pequenos ninhos ou cordões interconectados de células luminais e não-luminais.
- Infreqüentemente dentro dos nódulos, a fusão de materiais extracelulares pode ser suficiente para produzir um padrão de crescimento pleomórfico tipo adenoma; zonas mixóides podem se desenvolver e, ainda mais incomum, diferenciação condróide.
- A separação de células basais / mioepiteliais por glicosaminoglicanos pode ser extensa e produzir áreas que lembra o carcinoma epitelial-mioepitelial.
- Raramente, pequenos focos de diferenciação escamosa.

Padrão tubular:

- Padrão de crescimento tubular com dutos de dupla camada, geralmente compostos por uma camada interna de células ductais cuboidais a colunares, com quantidades moderadas de citoplasma eosinofílico e células externas mais escuras.
- Ocasionalmente, as células basais / mioepiteliais externas podem ser mais regulares em disposição, cuboidais e com citoplasma eosinofílico moderado ou como uma única camada de células tumorais achatadas.
- Túbulos bastante uniformemente espaçados dentro de um estroma colagenizado produzindo uma arquitetura que pode ser característica.
- Túbulos de calibre bastante uniforme, mas que podem ser variavelmente contornados, desconectados ou interconectados de forma complexa, produzindo um padrão de crescimento complexo.
- Túbulos freqüentemente pequenos ou que gradualmente se envolvem em pequenos ninhos ou cordões sólidos, particularmente em áreas com ampla infiltração de parênquima salivar, tecidos moles e invasão óssea ou perineural e perivascular.
- Pode mostrar um componente cribriforme limitado histologicamente, e muitas vezes apenas algumas coleções circulares de materiais extracelulares se formaram em relação às células basais / mioepiteliais.

Padrão sólido:

- Dispostos como grupos variados, mas às vezes razoavelmente uniformes, ou como cordões de pequenas células tumorais de coloração escura que são proliferações em excesso do componente basal / mioepitelial, isto é, basalóide.
- Estruturas pequenas semelhantes a ductos devem ser identificáveis entre as células basalóides.
- Em tumores com a maioria de padrão de crescimento sólido, pode haver alguns grupos de células com um padrão de crescimento cribriforme.
- Células basais / mioepiteliais geralmente uma população razoavelmente uniforme de pequenas células com citoplasma limitado e núcleos pequenos, de coloração escura; ocasionalmente, células basais / mioepiteliais levemente maiores e irregulares em forma de fuso.

- Células mioepiteliais na variante sólida podem ser ligeiramente separadas devido ao desenvolvimento de pequenas quantidades de glicosaminoglicanos intercelularmente; em alguns aglomerados, a formação de focos discretos de lâmina basal e glicosaminoglicanos é suficiente para produzir um padrão cribriforme.
- Na variante sólida, ninhos ou lençóis de células basalóides com as características acima formam 30% ou mais da neoplasia.

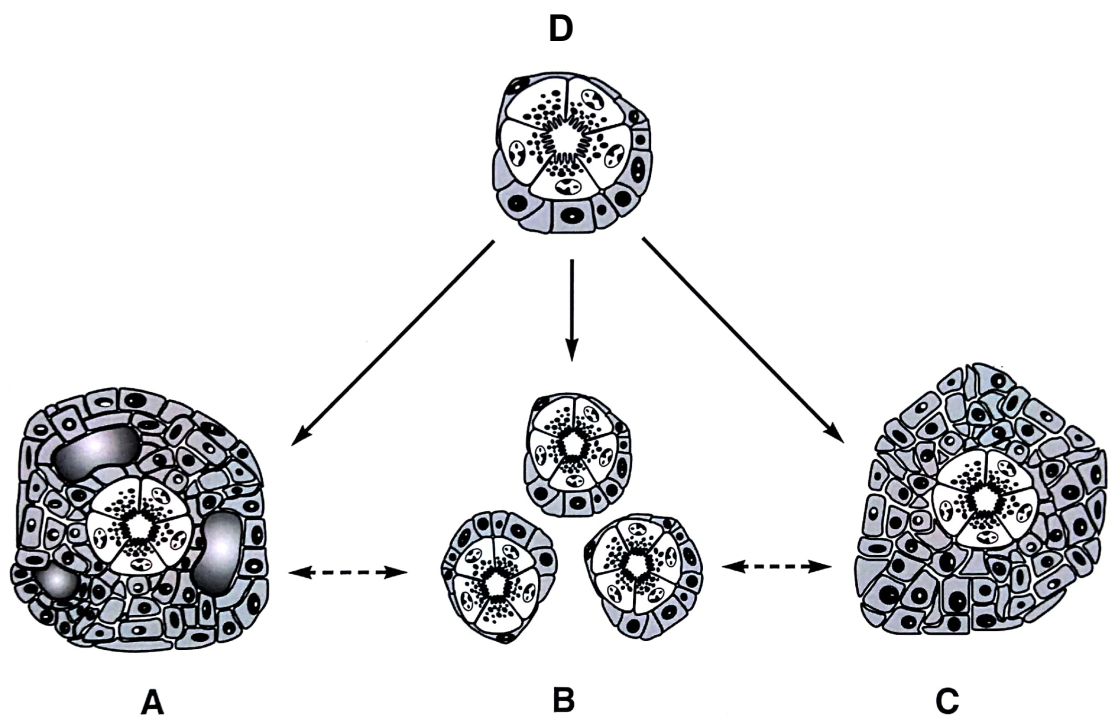


Figura 3. No carcinoma adenóide cístico, a representação da unidade ducto-acinar (D), da origem a três modelos exibidos nos diagramas (abaixo) representando os padrões de crescimento reconhecidos, cribriforme (A), tubular (B) e sólido (C). **A.** Na variante cribriforme, existe algum equilíbrio entre a diferenciação de células luminicas - formando estruturas ductais - e células basais / mioepiteliais; a característica clássica, isto é, aparência cribriforme, é dependente do desenvolvimento de conjuntos de glicosaminoglicanos e lâmina basal (representada pelos preenchimentos radicais) entre células basais / mioepiteliais de uma maneira altamente controlada. **B.** As estruturas tubulares resultam quando os ductos formadores de células luminicas são circundados por uma única ou poucas camadas de células basais / mioepiteliais sem acumulação de materiais intercelulares. **C.** A variante sólida do carcinoma adenoide cístico se desenvolve a partir da proliferação excessiva de células neoplásicas basais / mioepiteliais (a justificativa para se referir às células tumorais e ao subtipo como "basaloide"), juntamente com um pequeno número de estruturas ductais, geralmente com a formação de quantidades limitadas de matriz extracelular e apenas infrequentes focos de padrão de crescimento cribriforme. Fonte: DARDICK, 1996, p.165.

Mais recentemente, uma classificação simplificada das lesões foi proposta, dividindo esses tumores em duas categorias, sólida e não sólida (VAN WEERT et al., 2015) (Tabela 1). O tumor sólido tem um padrão de crescimento agressivo e tendência para o desenvolvimento

de metástase à distância, e deve ser considerado o subtipo como pior prognóstico para o paciente (SZANTO et al., 1984; VANDER POORTEN et al., 1999; HAO et al., 2010).

Tabela 1. Definições dos sistemas de classificação histológica usados na literatura atual e no sistema sólido/não sólido (S ±).

Perzin et al., 1978 / Szanto et al., 1984	Spiro et al., 1974	Van Weert et al., 2015
Grade	Grade	Sólido / Não sólido
I. Predominantemente tubular, não sólido	I. Principalmente tubular ou cribriforme, ocasionalmente sólido	S+
II. Predominantemente cribriforme, <30% sólido	II. misturado com componente sólido (>50%)	S-
III. Componente sólido > 30%	III. Somente sólido	

S - Sólido

Fonte: VAN WEERT et al., 2015.

O CAC é caracterizado por invasão perineural e múltiplas recidivas locais. Metástases linfonodais regionais, bem como metástases a distância, especialmente hepáticas, ósseas e pulmonares são comumente relatadas. Em geral, o prognóstico de CAC de cabeça e pescoço é desfavorável (VAN WEERT et al., 2013; MARCINOW et al., 2014; COCA-PELAZ et al., 2015; RETTIG et al., 2015). Ciccolallo et al. (2009) relataram uma taxa de sobrevida em 10 anos de de 65%, enquanto van Weert et al. (2013) relataram taxas de 5, 10 e 20 anos de 68%, 52% e 28%, respectivamente (CICCOLALLO et al., 2009; VAN WEERT et al., 2013). O tratamento preferido para a maioria dos pacientes é a excisão cirúrgica radical, algumas vezes combinada à radioterapia pós-operatória (CORDESMEYER et al., 2018).

2.2. Resposta imunológica antitumoral e evasão de células neoplásicas

A formação de metástase é um evento complexo que envolve interação entre as células neoplásicas e células normais do hospedeiro presentes no estroma (FILHO et al., 2004). As principais etapas envolvidas na metástase são: destacamento das células neoplásicas da massa principal, deslocamento ou locomoção (orientadas por fatores quimiotáticos), remodelação da

matriz extracelular, evasão das células neoplásicas aos mecanismos locais de defesa inatos e adaptativos, invasão dos vasos sanguíneos ou linfáticos, evasão na circulação aos mecanismos imunológicos de defesa inatos e adaptativos, a aderência das células neoplásicas ao endotélio vascular do órgão onde a metástase se forma, a transmigração orientada por quimiocinas no estroma do órgão-alvo e, por fim, o crescimento secundário no novo local onde essas células iniciam o processo de angiogênese e novamente de evasão imunológica (FILHO et al., 2004).

Desta forma, a resposta imunológica do hospedeiro contra as células tumorais neoformadas (resposta imune antitumoral), tanto localmente quanto na circulação, é de suma importância para a contenção do processo de invasão local e metástase (BALKWILL & MANTOVANI, 2001; LIOTTA & KOHN, 2001; ABBAS et al., 2015).

O principal mecanismo da imunidade tumoral é a destruição dos antígenos ou células tumorais mediante a ação dos linfócitos T citotóxicos ou CD8⁺ (LTCs) e células Natural Killer (NK) (ABBAS et al., 2015). Inicialmente, os antígenos tumorais são processados e apresentados aos LTCs pela via MHC-I ou mediante um processo denominado de apresentação cruzada de antígeno ou *crossing-priming* (ABBAS et al., 2015). A via MHC-I é utilizada quando, por exemplo, uma célula neoplásica sofre mutações e passa a expressar proteínas estranhas em seu interior. Essas proteínas estranhas são então reconhecidas como um antígeno e degradadas em peptídeos tumorais no citosol da célula, mediante a ação de um complexo enzimático chamado de proteassomo. Posteriormente, esse peptídeo é levado ao retículo endoplasmático (RE) e se acopla ao MHC-I. Quem faz a translocação do peptídeo tumoral do citosol para o RE é uma proteína denominada TAP (transportador associado a processamento de antígenos), a qual está localizada na membrana do RE. Uma vez dentro do RE, o peptídeo associa-se ao MHC-I e esse complexo é expresso na superfície celular podendo, portanto, ser reconhecido pelos LTCs ativados – CD8 (ABBAS et al., 2015). A apresentação cruzada de antígenos ou *crossing-priming* ocorre quando uma célula apresentadora de antígeno (APC, como por exemplo CD1a e CD83) interioriza um antígeno ou células tumorais e o apresenta via MHC-I (ZINKERNAGEL et al., 2002; CHEN et al., 2004). Por motivos ainda não elucidados, formam-se poros no endossomo e o peptídeo tumoral passa para o citosol da célula. Uma vez no citosol da célula ele é apresentado utilizando o mesmo processo descrito acima para via MHC-I (PAUL et al., 2008; ABBAS et al., 2015).

O LTC-CD8 exerce sua atividade mediante a liberação de grânulos citotóxicos, tais como a perforina e granzima B (GrB) (TRAPANI et al., 1998; AFONINA et al., 2010). A perforina

é uma proteína que quando em altas concentrações forma poros de 5 a 20 nm de diâmetro na membrana das células alteradas, os quais atuam como um canal para o influxo da GrB, protease que promove a morte apoptótica da célula-alvo (LOGUE & MARTIN, 2008; SINTSOV et al., 2008; ABBAS et al, 2015). Embora a GrB seja capaz de penetrar no citosol das células neoplásicas mediante o mecanismo de endocitose, com o auxílio da perforina esse processo se torna mais rápido e eficaz (TRAPANI et al., 1998; SINTSOV et al., 2008).

Os eventos supracitados dependem do reconhecimento e captura de antígenos tumorais por células dendríticas (DCs) (CD1a e CD83) que transportam esses antígenos para os linfonodos regionais, apresentando-os aos linfócitos T CD8 (TRAN JANCO et al., 2015). As DCs desempenham um papel fundamental no microambiente do tumor, que é conhecido por afetar a progressão da doença em muitas malignidades humanas. A infiltração por DCs maduras e ativas (CD83) nos tumores confere um aumento na ativação imunológica e no recrutamento de células e vias imunitárias efetoras que combatem doenças (TRAN JANCO et al., 2015).

A maioria dos cânceres desenvolvem estratégias de imunossupressão e escape do sistema de defesa do hospedeiro (ROUAS-FREISS et al., 2003; ROUAS-FREISS et al., 2005; CAROSELLA et al., 2008; ABBAS et al., 2015). Dentre os mecanismos de escape imunológicos utilizados pelas células tumorais, pode-se citar a expressão do antígeno leucocitário humano (HLA) não clássico (HLA-G) (ROUAS-FREISS et al., 2007) e da molécula inibitória da família B7 denominada Ligante de morte celular programada (PD-L1, B7-H1 ou CD274) e PD-L2 (HAMANISHI et al., 2007; ZOU & CHEN, 2008; HOMET MORENO & RIBAS, 2015). As proteínas HLA-G, PD-L1 e PD-L2 participam da inibição de células imunocompetentes tais como células NK, LTC-CD8 e células apresentadoras de antígenos (APCs - CD1a e CD83) (ROUAS-FREISS et al., 2003; ROUAS-FREISS et al., 2005; KORMAN et al., 2006; ROUAS-FREISS et al., 2007; HAMANISHI et al., 2007; ZOU & CHEN, 2008; CAROSELLA et al., 2008; HOMET MORENO & RIBAS, 2015).

A molécula HLA-G é uma proteína do HLA que se diferem de outras moléculas HLA-I clássicas, sobretudo, por apresentar as seguintes características: (1) limitado polimorfismo gênico; (2) propriedades biológicas que conferem tolerância imunológica; (3) restrita distribuição tecidual, sendo que o HLA-G se limita ao trofoblasto, timo, pâncreas, matriz proximal da unha, córnea e precursores eritróides e endoteliais. (FAVIER et al., 2007; CAROSELLA et al., 2008a; CAROSELLA et al., 2008b).

Conforme descrito acima, a molécula HLA-G participa na inibição de células responsáveis pela imunovigilância (TRAPANI et al., 1998; ROUAS-FREISS et al., 2005; ABBAS et al., 2015). Este processo ocorre mediante a interação direta do HLA-G com receptores inibidores das células imunocompetentes tais como o receptor KIR2DL4 (CD158d) (BUKUR et al., 2003), ILT-2 (CD85j) (MOREAU et al., 2003) e ILT-4 (CD85d) (MOUILLOT et al., 2005).

Outro mecanismo do qual a molécula HLA-G contribui para o escape tumoral denomina-se trogocitose. Este consiste num processo pelo qual uma célula adquire o conteúdo citoplasmático ou fragmentos da membrana de outra célula com quem interage. Assim, células tumorais HLA-G positivas (HLA-G⁺) podem transferir sua membrana para células HLA-G negativas (HLA-G⁻), as quais se transformam em HLA-G⁺ e essa célula passa a agir como uma molécula imunossupressora (CAROSELLA et al., 2008; WASTOWSKI et al., 2009). Por conseguinte, apenas algumas células HLA-G⁺ são necessárias para exercer efeitos inibidores significativos, o que culmina em uma maior proteção tumoral.

2.3. Mediadores envolvidos na imunossupressão local e evasão de células neoplásicas: efeitos no câncer

No nível celular, alguns tumores conseguem evadir à resposta imunológica antitumoral ao utilizar estratégias que resultam na redução do reconhecimento da célula neoplásica ou na resistência aos efeitos citotóxicos do sistema imunológico, que consistem na fase de evasão da edição do sistema imune (DUNN et al., 2002; BLOCK & MARKOVIC, 2009; SCHREIBER et al., 2011).

Baseando-se nas propriedades inibitórias do HLA-G sobre as células APCs, NKs e LTCs, alguns estudos têm postulado que a expressão dessas moléculas pelas células neoplásicas pode ser uma importante forma de escape tumoral. Nesse contexto, Cabestre et al. (1999) evidenciaram, pela primeira vez, a expressão do HLA-G (transcrito e proteína) em células melanocíticas, tendo sido demonstrado ainda que as células que expressam o HLA-G de fato inibem o efeito citotóxico mediado pelas células NK (CABESTRE et al., 1999).

Em um estudo de Fregonezi et al. (2012), no qual os pesquisadores compararam a expressão, por imunistoquímica, do HLA-G entre lesões orais benignas, pré-cancerizáveis e carcinoma espinocelular (CEC) de cavidade oral. Contrapondo-se à maioria dos relatos já descritos, os autores demonstraram que a expressão da molécula HLA-G nas lesões orais

benignas e pré-malignas foi maior do que nos tecidos malignos. Os autores sugerem que o HLA-G possa estar relacionado com a subversão da resposta imune em estágios iniciais da carcinogênese, não excluindo também a possibilidade de que algumas alterações genéticas do CEC de boca possam modificar a expressão do HLA-G nas células neoplásicas (FREGONEZI et al., 2012).

Além de Fregonezi et al. (2012), recentemente nosso grupo de pesquisa evidenciou uma alta expressão de HLA-G em CEC de boca se comparado a mucosa bucal saudável (GONÇALVES et al., 2014; GONÇALVES et al., 2015) e, que os CEC de cavidade oral que fazem metástase para os linfonodos cervicais apresentam uma expressão significativamente maior da molécula HLA-G comparado àqueles pacientes que não fazem metástase linfonodal (GONÇALVES et al., 2014). Adicionalmente, também evidenciamos que pacientes com maior expressão da molécula HLA-G têm uma tendência a um menor tempo de sobrevida que pacientes com ausente ou baixa expressão da molécula, o que prenuncia um prognóstico clínico desfavorável aos pacientes (GONÇALVES et al., 2014). Também observamos uma alta expressão de HLA-G em carcinoma mucoepidermóide de glândulas salivares intraorais, e essa elevada expressão foi observada em todas as gradações deste tumor sugerindo que estes tumores desenvolvem estratégia de escape da imunovigância (MOSCONI et al., 2017).

Dentre as proteínas inibitórias da família B7, o PD-L1 ou B7-H1 foi primeiramente identificado por Dong et al. (1999) a partir de uma sequência de DNA homóloga a outras moléculas B7, sobretudo o CD80 (20% de aminoácidos idênticos) (DONG et al., 1999). A expressão do RNAm para o PD-L1 está presente em células T, B, APCs como DCs e macrófagos, NKs, células endoteliais ativadas, sendo expresso ainda em tecidos imunoprivilegiados como olhos e placenta (DONG et al., 1999; FREEMAN et al., 2000; PETROFF et al., 2002; BROWN et al., 2003; CURIEL et al., 2003; HORI J et al., 2006). PD-L2 (também conhecido como CD273 ou B7-DC) é outro ligante PD-1, e também desempenha um papel na regulação da imunidade tumoral (CHANG et al., 2017). Assim como o PD-L1, o PDL-2 desempenha um papel importante na imunidade, modulando a resposta das células T via PD-1. A expressão de PD-L2 foi relatada em vários tipos celulares, incluindo células dendríticas, células tumorais, linfócitos T e B (SRIDHARAN et al., 2016).

Diversos tipos de cânceres (pulmonar, esofágico, gástrico, retal, ovariano, melanoma, pancreático e nasofaríngeo) têm apresentado altos níveis de PD-L1, estratégia atribuída à célula neoplásica que propicia o escape a imunidade antitumoral e, conseqüentemente, a associação

com um pior prognóstico clínico (KONISHI et al., 2004; OHIGASHI et al., 2005; WU et al., 2006; HAMANISHI et al., 2007; HINO et al., 2010; WANG et al., 2010; MALASPINA et al., 2011; KATSUYA et al., 2015; QING et al., 2015; ZHANG et al. 2015; ZOU & CHEN, 2008). As células tumorais que expressam o PD-L1 utilizam distintos mecanismos para evadir da resposta imune mediada por células T. Dentre esses mecanismos pode se citar: apoptose, anergia ou exaustão de células T, formação de uma proteção molecular evitando a lise da célula neoplásica, produção de citocina imunossupressiva como IL-10 e supressão via células T reguladoras (DONG et al., 1999; DONG et al., 2002; DONG et al., 2004; OIKAWA et al., 2007).

Com referência ao câncer de boca, Tsushima et al. (2006) demonstraram que o PD-L1 é amplamente expresso pelas células tumorais e que a administração de anticorpos que bloqueiam esse marcador inibe o crescimento tumoral, sugerindo, portanto, que o PD-L1 regula negativamente a resposta imune de combate aos tumores (TSUSHIMA et al., 2006). Cho et al. (2011) demonstraram que a expressão de PD-L1 não afetou a sobrevida de pacientes com câncer de boca, porém sua expressão diminui o número de LTCs neste tipo de neoplasia, suscitando que o desenvolvimento de uma estratégia para bloquear as interações do PD-L1 com os LTCs seria uma ferramenta útil para a inibição do crescimento tumoral (CHO et al., 2011). Chen et al. (2012) evidenciaram que a proteína quinase isoforma 2 (PKD2), um importante regulador da expressão de PD-L1, em CEC de cavidade oral induzido por IFN- γ , sendo que a apoptose de linfócitos T CD8 induzida pela via PD-L1/PD1 foi significativamente reduzida, e consequentemente a resposta imune antitumoral foi mais efetiva (CHEN et al., 2012). Em relação aos tumores malignos de glândulas salivares, Chang e colaboradores observaram que a expressão de PD-L2 foi alta, enquanto a expressão de PD-L1 foi relativamente baixa em termos de porcentagem de células coradas positivamente e intensidade de coloração sugerindo, que a aplicação de tratamento anti-PD-1, ou tratamento futuro com foco em agentes anti-PD-L2, deve ser avaliada para pacientes com esses tumores (CHANG et al., 2017).

A regulação da expressão da proteína PD-1 e seu ligante PD-L1 em pacientes com diversos tipos de câncer tem se mostrado um método efetivo para reverter a imunossupressão tumoral e, assim, promover uma resposta imunológica efetiva contra as células neoplásicas (HOMET MORENO & RIBAS, 2015; GANGADHAR & SALAMA, 2015). Ensaios clínicos randomizados utilizando anticorpos anti-PD-1 demonstraram que essa imunoterapia parece ser superior a quimioterapia em pacientes com melanoma metastático (GANGADHAR & SALAMA, 2015; LUKE & OTT, 2015). Neste tipo de câncer, o tratamento com dois anticorpos

anti-PD-1, o pembrolizumab (Merck) e nivolumab (Bristol-Myers Squibb), tem sido aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) dos Estados Unidos (HOMET MORENO & RIBAS, 2015).

A via CD28 / CTLA-4 é outra via bem estabelecida envolvida na imunidade tumoral. O CTLA-4 primeiro compete com o CD28, que é expresso em células T CD4⁺ e CD8⁺, depois se liga a dois ligantes principais, CD80 e CD86, que estão presentes em células apresentadoras de antígeno. A interação do CTLA-4 com o CD80/86 gera sinais inibitórios intrínsecos e previne a ativação das células T, causando ativação das células tumorais (GARDNER et al., 2014). O anticorpo anti-CTLA-4 também demonstrou atividade clínica e é usado no tratamento do melanoma maligno (HODI et al., 2010).

Escassos são os estudos sobre resposta imunológica mediada por TILs em CAC (SRIDHARAN et al., 2016; MUKAIGAWA et al., 2016; CHANG et al., 2017). Chang e colaboradores observaram, em neoplasia maligna de glândula salivares, uma associação entre a alta expressão de TIL CD8⁺ com um menor tamanho do tumor, demonstrando assim um valor prognóstico interessante (CHANG et al., 2017). Além disso, outros estudos têm demonstrando a importância dessas células no microambiente tumoral, e a sua relevância com o bom prognóstico clínico do paciente em diferentes tipos de neoplasias, como analisado em câncer de ovário (HAMANISHI et al., 2007), câncer de boca (MARSH et al., 2011), câncer de orofaringe (WARD et al., 2014) e câncer de faringe e laringe (KARPATHIU et al., 2017).

O estudo de PDL-1/PD-1, PDL-2, HLA-G e CTLA-4 em malignidades de cabeça e pescoço é pertinente, pois essas proteínas são potenciais alvos terapêuticos que contribuem para o controle da progressão neoplásica. Além disso, a infiltração de células, como as TILs CD8⁺ e PD-1 nos microambientes tumorais, foi avaliada em tumores malignos de glândulas salivares (MOSCONI et al., 2017; CHANG et al., 2017).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Investigar a expressão de mediadores envolvidos na imunossupressão local e evasão de células neoplásicas em Carcinoma Adenóide Cístico (CAC), bem como a relação destes mediadores com fatores clinicopatológicos associados ao prognóstico dessas neoplasias.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a presença de células imunes LTCs CD8⁺, células granzima B⁺, células dendríticas (CD1a⁺ e CD83⁺).
- Avaliar a imunexpressão das proteínas CTLA-4⁺, PD-1⁺/PD-L1⁺, PD-L2⁺ e HLA-G⁺ em CAC de glândulas salivares menores e maiores.
- Caracterização clínico morfológico/histopatológico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção, seleção e caracterização das amostras

Este estudo foi submetido aos Comitês de Ética em pesquisa da Universidade Federal de Goiás (UFG) e Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (HAJ/ACCG) (número do parecer: 1.460.804). O presente trabalho foi desenvolvido no âmbito da infra-estrutura básica do laboratório de patologia bucal e imunoistoquímica da Faculdade de Odontologia (FO) da UFG.

Este **estudo transversal** selecionou, a partir de consulta nos Registros do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (HAJ/ACCG), 44 espécimes advindos de biópsias excisionais de pacientes acometidos por CAC de glândulas salivares maiores e menores, os quais foram diagnosticados e tratados entre os anos de 2005 a 2015 no Serviço de Cabeça e Pescoço (SCP). Após seleção desses pacientes, os blocos e lâminas foram selecionados e avaliados através de consulta nos arquivos do Serviço de Anatomopatologia do HAJ/ACCG.

Os **critérios de inclusão** foram: pacientes com CAC de glândulas salivares menores e maiores diagnosticados e tratados no HAJ/ACCG com fichas ou prontuários contendo os seguintes dados: estadiamento clínico TNM, tempo de acompanhamento do paciente de no mínimo 24 meses, informações referentes ao óbito ou não do paciente, informações sobre a presença de metástase regional e/ou à distância, recidivas e localização do tumor e lâminas e blocos em bom estado de conservação. Como **critério de exclusão** foi considerado: lâminas e blocos defeituosos; CACs de outras localizações; casos sem seguimento clínico e com fichas incompletas. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionados 36 amostras para o estudo.

4.2. Gradação histopatológica das amostras de CAC

As características microscópicas que foram consideradas no presente estudo estão de acordo com o estabelecido por Perzin et al., 1978 / Szanto et al., 1984. Grau I: Predominantemente tubular, não sólido; Grau II: Predominantemente cribriforme, <30% sólido e Grau III: componente sólido > 30%. Utilizamos também a classificação simplificada de Van Weert et al., 2015, o qual classificou os CAC em duas categorias sólidos (os tumores que possuíam componentes sólidos) e não sólidos.

4.3. TÉCNICAS EMPREGADAS

4.3.1. Técnicas de rotina (hematoxilina e eosina)

O material selecionado, foi incluído em parafina, seccionado em micrótomo (Leica RM2165), obtendo-se de cada bloco cortes consecutivos de 5µm, que foram colocados sobre lâminas histológicas e corados pelo método de HE. Esses cortes foram utilizados para caracterização microscópica das amostras de acordo com a classificação de Perzin et al., 1978 / Szanto et al., 1984 e Van Weert et al., 2015).

4.3.2. Técnica imunoistoquímica

A partir dos casos selecionados, emblocados em parafina, foram obtidos cortes seriados com aproximadamente 3µm de espessura, em micrótomo (Leica), montados em lâminas silanizadas e submetidos à técnica da imunoistoquímica. Os cortes sobre as lâminas foram desparafinizados em xilol e hidratados em banhos decrescentes de álcool etílico. A etapa de exposição recuperação antigênica das proteínas HLA-G, PD-L1, PD-L2, CD8, GrB, CD1a, CD83, CTLA-4 e PD-1 foi realizada utilizando o TRILOGY™ Concentrate (Cell Marque, Rocklin, CA, USA; 1:100), a uma temperatura de 96°C em banho maria digital (DeLeo, Porto Alegre, RS, Brazil) por 30 minutos. O Sistema de Detecção Kit Novolink™ Max Polymer Detection System (Novocastra, Leica Biosystems Gmb, Wetzlar, HE, Germany) contendo soluções com anticorpo secundário e solução cromogênica de 3.3'-Diaminobenzidina (DAB, Dako, Carpinteria, CA, USA) foi utilizado nos cortes imunomarcados. Amostras de trofoblastos foram utilizadas como controle positivo para HLA-G, PD-L1 e PD-L2, liquen plano oral e linfonodos foram utilizado como controles positivos para CD8, GrB, CD1a, CD83, CTLA-4 e PD-1. Todos os anticorpos utilizados foram padronizados previamente em amostras de tumores de glândulas salivares. Os controles negativos foram utilizados em todas as reações através da substituição do anticorpo primário por PBS-BSA.

Os cortes histológicos foram incubados com os anticorpos monoclonais:

Anticorpos	Clones	Diluição	Fabricantes
anti-HLA-G	MEM-G/2	1:100	Exbio, Vestec, PRG Czech Republic
anti-PD-L1	E1L3N [®]	1:600	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
anti-PD-L2	176611	1:800	R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA
anti-CD8	C8/144B	1:200	Dako, Carpinteria, CA, USA
anti-GrB	GrB-7	1:100	Dako, Carpinteria, CA, USA
anti-CD1a	MA1-80170	1:50	Thermo Scientific, Barrington, IL, USA
anti-CD83	HB15a	1:50	Santa Cruz, Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
anti-CTLA-4	F-8	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA
anti-PD-1	NAT105	Pronto para uso	Cell Marque, Rocklin, CA, USA

Os cortes foram contra-corados com hematoxilina, por 30 segundos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água corrente por 10 minutos, as lâminas foram desidratadas com álcoois, passadas em xilol e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck).

4.4. ANÁLISE SEMIQUANTITATIVA E QUANTITATIVA DOS DADOS

Os TIL CD8⁺ foram medidos semiquantitativamente pelo método de Ward et al. 2014, ou seja, 1 = 20%, 2 = 20-80% e 3 => 80% do estroma, e também utilizando o ponto de corte (49,9 células / mm²) obtido pela curva ROC considerando a recorrência da lesão. A densidade (por mm²) de GrB⁺, CD1a⁺, CD83⁺, CTLA-4⁺ e PD-1⁺ nas regiões intratumoral e estromal foi avaliada nas amostras com o auxílio de uma retículo de integração (4740680000000-Netzmikrometer 12.5x, Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) conectado a um microscópio de luz (AxioScope, Carl Zeiss) em 10 campos alternados com ampliação de 40x. Nesta ampliação, a área de um campo corresponde a 0,0961 mm².

A expressão de HLA-G, PD-L1 e PD-L2 foi definida como imunorreatividade membranosa e citoplasmática, utilizando os valores de corte descritos por Ilie et al. 2016 (PD-L1), Sridharan et al. 2016 (PD-L2) e Mosconi et al. 2017 (HLA-G). A PD-1 foi analisada pelo

método de Taube et al. 2014 e o CTLA-4 foi analisado pelo método de Karpathiou et al. 2017. As células estromais PD-L1, PD-L2 e HLA-G (fibroblastos, células endoteliais, células imunoinflamatórias) foram classificadas como porcentagem de células positivas.

4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise dos dados foi realizada no software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 25.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA). As associações entre variáveis nominais foram analisadas pelo teste exato de Fisher. Após avaliação da distribuição dos dados numéricos pelo teste de Shapiro-Wilk, a comparação foi realizada por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. O tempo de sobrevida foi calculado a partir da ressecção cirúrgica até a última consulta de acompanhamento ou a morte do paciente. Assim, as amostras foram dicotomizadas da seguinte forma: 1 = ausente ou <50% de HLA-G, PD-L1 e PD-L2 e 2 = 50% de células positivas, e as células CD8 TIL foram dicotomizadas de acordo com a curva ROC valor. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

5. PUBLICAÇÃO

O artigo completo foi encaminhado para o periódico “Oral Oncology” (acesse: <https://www.sciencedirect.com/journal/oral-oncology/vol/88/suppl/C>) que detém os direitos autorais da publicação do estudo.

Title: Immune microenvironment and evasion mechanisms in adenoid cystic carcinomas of salivary glands

Authors: Carla Mosconi, José Alcides Almeida de Arruda, Ana Caroline Rodrigues de Faria, Gabriella Alves Quixabeira Oliveira, Henrique Moura de Paula, Felipe Paiva Fonseca, Ricardo Alves Mesquita, Tarcília Aparecida Silva, Elismauro Francisco Mendonça, Aline Carvalho Batista.

Abstract: Objectives: The objective of the present study was to investigate the expression of immune checkpoints (PD-L1, PD-L2, PD-1 and CTLA-4), immune inhibitory molecule HLA-G, markers of tumor-infiltrating lymphocytes (TIL) and dendritic cells (DC), as well as its association with clinicopathological features of adenoid cystic carcinomas (ACC) of the salivary glands. **Materials and methods:** Thirty-six samples from patients with ACC were analyzed immunohistochemically for the expression of PD-L1, PD-L2, PD-1, CTLA-4, HLA-G, CD8, GrB, CD1a and CD83. Positivity of HLA-G, PD-L1 and PD-L2 expression was defined by cut-offs values. CD8+ TIL was measured semiquantitatively and also using cut-off values obtained by the ROC curve considering recurrence of the lesion. **Results:** ACC showed low CD8+, GrB+ TIL, CD1a and CD83 populations, as well as scarce positivity for CTLA-4 and PD-1. In contrast, PD-L2 and HLA-G expression was increased, while no PD-L1 expression was detected. Interestingly, cases with lower CD8+ TIL density presented greater recurrence rates. **Conclusion:** Our findings suggest that the ACC microenvironment exhibits low immunogenicity, represented by low TIL and DC density. Moreover, there seems to be activation of the immune inhibitory proteins/PD-L2 and HLA-G, a scenario that may favor tumor escape from the immune system and partially explain the poor prognosis of ACC.

Keywords: Adenoid cystic carcinoma. Salivary gland. Neoplasm. Tumor escape. Immunogenicity. Immunohistochemical. Head and neck cancer. Oral câncer.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

6.1. Sobre o estudo:

Este estudo investigou diferentes tipos de marcadores que estão intimamente relacionados à resposta imune antitumoral em CAC de glândulas salivares maiores e menores. Nossos resultados mostraram que: **(1)** O CAC tem um microambiente com poucas células relacionadas à participação do mecanismo de defesa do organismo; **(2)** Possui baixa quantidade de células dendríticas CD1a e CD83; **(3)** Escassos linfócitos positivos para CTLA-4 e PD-1; **(4)** Os casos que apresentavam alto CD8⁺ TILs, observou-se poucas células GrB⁺, podendo inferir que esses linfócitos estejam sendo inativados; **(5)** Alguns casos foram positivos para as moléculas HLA-G e PD-L2, ao passo que todos os casos demonstraram negatividade para PD-L1 no parênquima e estroma tumoral. **(6)** Finalmente, pacientes que apresentaram alta quantidade de células CD8⁺ TILs estavam menos propensos a desenvolver recidivas.

Em uma pesquisa realizada em março de 2020 no Serviço do Instituto Nacional de Saúde dos EUA (<https://clinicaltrials.gov>) foram identificados seis ensaios clínicos usando PD-1, quatro ensaios para CTLA-4, quatro ensaios para PD-L1, um ensaio para PD-L2 e nenhum ensaio para drogas inibidoras de HLA-G em pacientes com neoplasias de glândulas salivares. Infelizmente, a limitação do presente estudo foi o pequeno tamanho da amostra. No entanto, isso é justificável em vista da raridade do CAC da glândula salivar e da variação demográfica da amostra. Assim, mais estudos são necessários para incluir protocolos de imunoterapia para os casos de CAC.

6.2. Sobre a minha trajetória no doutorado:

Quanto a minha vivência durante o doutorado, posso afirmar que aumentei a minha confiança e habilidades tanto como docente, quanto como pesquisadora. Como docente, ministrei aulas para alunos de graduação no curso de Odontologia da UFG, nas disciplinas de Patologia Geral e Bucal. Aprendi diferentes tipos de metodologias, produzi material didático, sanei dúvidas durante monitorias, elaborei questões de prova, avaliei atividades durante as aulas teóricas e práticas, orientei alunos de iniciação científica e pude entender mais sobre os processos de ensino aprendizagem. Também, ministrei aulas nos cursos de auxiliar e técnico de saúde bucal (ASB e TSB) no Instituto Lenza de Pós-Graduação, instituição essa que tenho muito a agradecer em nome da Profa. Milena Lenza, pois no período em que ministrei aulas para esses cursos, pude ir aprimorando a minha didática para a transmissão de conhecimento,

melhorando as destrezas dos meus alunos e assim, pude contribuir na formação de capital humano.

Tive também a oportunidade de fazer parcerias científicas com alguns colegas de pós-graduação tanto da UFG, quanto UFMG. Na UFG participei do trabalho de mestrado do aluno Sérgio e trabalho de doutorado do aluno Jean, ambos orientados do Prof. Elismauro Francisco de Mendonça. Já na UFMG, juntamente com os alunos Alcides, Leni e Lauren publicamos estudos multicêntricos. Tenho ainda, estudos em andamento com a aluna de pós-doutorado Karine (orientanda da Prof^a. Maria Cássia Ferreira - UFMG). E há ainda, um manuscrito em desenvolvimento em parceria com os professores Ricardo Alves Mesquita e Lucas Guimarães Abreu (ambos professores da UFMG).

Como pesquisadora, tive a oportunidade de passar 1 mês na UFMG pelo Programa de Cooperação Acadêmica (PROCAD), onde tive a honra de ser supervisionada pela Prof^a. Tarcília Aparecida Silva. Essa experiência me proporcionou bons momentos com outros professores e alunos de outra instituição. Durante esse intercâmbio interinstitucional pude estudar, planejar novos projetos e assim, fortalecer a amizade e parcerias. Essa oportunidade possibilitou várias produções acadêmicas, inclusive artigos de alto impacto científico.

Uma das grandes conquistas e reconhecimento que tive durante o meu doutorado, foi ter sido premiada como melhor painel científico na Sociedade Brasileira de Estomatologia e Patologia Oral (SOBEP) no ano de 2018, sinto muito orgulho desse momento, pois esse evento se enquadra como maior congresso científico brasileiro na minha área de atuação.

Diante do exposto, é verossímil constatar o quão valoroso estas experiências foram para o meu crescimento profissional, além de ser notório o meu amadurecimento acadêmico. Acredito que estes conhecimentos adquiridos durante o doutorado e por mim assimilados, serão de extrema importância para eventuais futuros concursos que irei enfrentar pleiteando uma vaga como professora efetiva de uma instituições de ensino superior pública.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS¹

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; SHIV P. Immunity to tumors. In: Abbas AK, Lichtman AH, Shiv P eds. **Cellular and molecular immunology**. Philadelphia: Saunders, p. 383-96, 2015.

AFONINA, I. S.; CULLEN, S. P., MARTIN, S. J. Cytotoxic and non-cytotoxic roles of the CTL/NK protease granzyme B. **Immunol Rev**, v. 235, p. 105–16, 2010.

ALVES, S.M. et al. Metallothionein immunostaining in adenoid cystic carcinomas of the salivary glands. **Oral Oncol**, v.43, n.3, p. 252-256, 2007.

BALKWILL, F.; MANTOVANI, A. Inflammation and cancer: back to Virchow? **Lancet**, v. 357, n.9255, p. 539-545, 2001.

BARNES, L. et al. **World Health Organization classification of tumours. Pathology & genetics head and neck tumours**. In: Slootweg PJ, Eveson JW. Tumours of the oral cavity and oropharynx: Introduction. Lyon, France: IARC, p. 211-81, 2005.

BLOCK, M. S.; MARKOVIC, S. N. The Tumor/Immune Interface: Clinical Evidence of Cancer Immunosurveillance, Immunoediting and Immunosubversion. **Am J Immunol**, v. 5, p. 29–49, 2009.

BOUKHERIS, H.; CURTIS, R. E.; LAND, C. E.; DORES, G. M. Incidence of carcinoma of the major salivary glands according to the WHO classification, 1992 to 2006: a population-based study in the United States. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, p. 2899–906, 2009.

BROWN, J. A. et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. **J Immunol**, v. 170, n. 3, p. 1257-1266, 2003.

BUKUR J. et al. Functional role of human leukocyte antigen-g up-regulation in renal cell carcinoma. **Cancer Res**, v. 63, p. 4107-4111, 2003.

CABESTRE, F. A. et al. HLA-G expression: immune privilege for tumour cells? **Semin Cancer Biol**, v. 1, p.27-36, 1999.

CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P.; LEMAOULT, J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G: from biology to clinical benefits. **Trends Immunol**, v. 29, p. 125-32, 2008a.

CAROSELLA E. D.; FAVIER B.; ROUAS-FREISS N.; MOREAU P.; LEMAOULT J. Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule. **Blood**, v. 111, p. 4862-4870, 2008b.

¹As referências apresentadas nesse capítulo referem-se àquelas citadas em: INTRODUÇÃO, REFERENCIAL TEÓRICO E MATERIAL E MÉTODOS. Referências seguindo as normas da ABNT NBR 6023:2002

CAROSELLA, E. D.; PLOUSSARD, G.; LEMAULT, J.; DESGRANDCHAMPS, F. A Systematic review of immunotherapy in urologic cancer: evolving roles for targeting of CTLA-4, PD-1/PD-L1, and HLA-G. **Eur Urol**, v. 68, p. 267-79, 2015.

CHANG, H. et al. Overexpression of PD-L2 is associated with shorter relapse-free survival in patients with malignant salivary gland tumors. **Onco Targets Ther**, v. 10, p. 2983–92, 2017.

CHEN M. F., et al. Significance of the TGF- β 1/IL-6 axis in oral. **Cancer Clinical Science**, v. 122, n. 10, p. 459–72, 2012.

CHEN, W.; MASTERMAN, K. A.; BASTA, S. et al. Cross-priming of CD8+ T cells by viral and tumor antigens is a robust phenomenon. **Eur J Immunol**, v. 34, p. 194-199, 2004.

CHO, Y. A. et al. Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 47, n. 12, p. 1148-1153, 2011.

CICCOLALLO, L.; LICITRA, L.; CANTÚ, G.; GATTA, G. EUROCARE Working Group. Survival from salivary glands adenoid cystic carcinoma in European populations. **Oral Oncol**, v. 45, p. 669–74, 2009.

COCA-PELAZ, A. et al. A. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck--An update. **Oral Oncol**, v. 51, p. 652–61, 2015.

CORDESMEYER, R.; KAUFFMANN, P.; LASKAWI, R.; RAU, A.; BREMMER, F. The incidence of occult metastasis and the status of elective neck dissection in salivary adenoid cystic carcinoma: a single center study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 125, p. 516–9, 2018.

CURIEL, T. J. et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. **Nature Medicine**, v. 9, n. 5, p. 562-567, 2003.

DARDICK, I. **Color Atlas-text of Salivary Gland Pathology**. New York: Igakushoin Medical Publishers, p. 150, 1996.

DE OLIVEIRA, F. A. et al. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a Brazilian population. **Head Neck Pathol**, v. 3, n. 4, p. 271-275, 2009.

DONG, H. et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. **Nature Medicine**, v. 5, n. 12, p. 1365-9, 1999.

DONG, H. et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. **Nat Med**, v. 8, n. 8, p. 793-800, 2002.

DONG, H. et al. B7-H1 determines accumulation and deletion of intrahepatic CD8(+) T lymphocytes. **Immunity**, v. 20, n. 3, p. 327-36, 2004.

DUNN, G. P.; BRUCE, A. T.; IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol**, v. 3, p. 991–8, 2002.

ELLINGTON, C. L. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: Incidence and survival trends based on 1973-2007 Surveillance, Epidemiology, and End Results data. **Cancer**, v. 118, p. 4444–51, 2012.

EL-NAGGAR, A. K.; CHAN, J. K. C.; GRANDIS, J. R.; TAKATA, T.; SLOOTWEG, P. J. **World Health Organization classification of head and neck tumours**. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2017.

FAVIER, B. et al. Research on HLA-G: an update. **Tissue Antigens**, v. 69, n.3, p. 207-211, Mar. 2007.

FILHO, G. B.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. Capítulo 8, **Bogliolo Patologia Geral**, Guanabara Koogan, 3. ed, 2004.

GANGADHAR, T. C.; SALAMA, A. K. Clinical applications of PD-1-based therapy: a focus on pembrolizumab (MK-3475) in the management of melanoma and other tumor types. **Onco Targets Ther**, v. 22, n. 8, p. 929-937, 2015.

FREEMAN, G. J. et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. **J Exp Med**, v. 192, n. 7, p. 1027-1034, 2000.

FREGONEZI P.A. et al. Expression of nonclassical molecule human leukocyte antigen-G in oral lesion. **Am J Otolaryngol**, v. 33, n. 2, p. 193-198, 2012.

GONÇALVES A.S. et al. The clinicopathologic significance of the expression of HLA-G in oral squamous cell carcinoma. **Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol**, v. 117, n. 3, p. 361-368, 2014.

GONÇALVES A.S. et al. Immunosuppressive mediators of oral squamous cell carcinoma in tumour samples and saliva. **Hum Immunol**, v. 76, n. 1, p. 52-58, 2015.

GARDNER, D.; JEFFERY, L. E.; SANSOM, D. M. Understanding the CD28/CTLA-4 (CD152) pathway and its implications for costimulatory blockade. **Am J Transplant**, v. 14, p. 1985–91, 2014.

HAMANISHI, J. et al. Programmed cell death 1 ligand 1 and tumor-infiltrating CD8+ T lymphocytes are prognostic factors of human ovarian cancer. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, n. 9, p. 3360-3365, 2007.

HAO, L.; XIAO-LIN, N.; QI, C.; YI-PING, Y.; JIA-QUAN, L.; YAN-NING L. Nerve growth factor and vascular endothelial growth factor: retrospective analysis of 63 patients with salivary adenoid cystic carcinoma. **Int J Oral Sci**, v. 2, p. 35–44, 2010.

HINO, R. et al. Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma. **Cancer**, v. 116, n. 7, p. 1757-1766, 2010.

HODI, F. S.; O'DAY, S. J.; MCDERMOTT, D. F. et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. **N Engl J Med**, n. 363, n. 8, p. 711–723, 2010.

HOMET MORENO, B.; RIBAS, A. Anti-programmed cell death protein-1/ligand-1 therapy in different cancers. **Br J Cancer**, v. 112, n. 9, p. 1421-1427, 2015.

HORI, J. et al. B7-H1-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege of corneal allografts. **J Immunol**, v. 177, n. 9, p. 5928-35, 2006.

IDA, H. et al. Granzyme B and natural killer (NK) cell death. **Mod Rheumatol**, v. 15, n.5, p. 315-322, 2005.

KATSUYA, Y. et al. Immunohistochemical status of PD-L1 in thymoma and thymic carcinoma. **Lung Cancer**, v. 88, n. 2, p. 154-159, 2015.

KARPATHIU, G.; CASTEILLO, F.; GIROULT, J. B.; FOREST, F.; FOURNEL, P.; MONAYA, A. et al. Prognostic impact of immune microenvironment in laryngeal and pharyngeal squamous cell carcinoma: Immune cell subtypes, immuno-suppressive pathways and clinicopathologic characteristics. **Oncotarget**, v. 8, p. 19310–22, 2017.

KHAN, A. J. et al. Adenoid cystic carcinoma: a retrospective clinical review. **Int J Cancer**, v. 96, n. 3, p. 149-158, 2001.

KOKEMUELLER, H.; ECKARDT, A.; BRACHVOGEL, P. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck—a 20 years experience. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 33, n. 1, p. 25–31, 2004.

KONISHI, J. et al. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumorinfiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 15, p. 5094-5100, 2004.

KORMAN, A. J.; PEGGS, K. S.; ALLISON, J. P. Checkpoint blockade in cancer immunotherapy. **Adv Immunol**, v. 90, p. 297-339, 2006.

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

LOGUE, S. E.; MARTIN, S. J. Caspase activation cascades in apoptosis. **Biochem Soc Trans**, v. 36, p. 1- 9, 2008.

LOWIN, B.; PEITSCH, M. C.; TSCHOPP, J. Perforin and granzymes: crucial effector molecules in cytolytic T lymphocyte and natural killer cell-mediated cytotoxicity. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 198, p. 1-24, 1995.

LUKE, J. J.; OTT, P. A. PD-1 pathway inhibitors: the next generation of immunotherapy for advanced melanoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 3479-3492, 2015

MALASPINA, T. S. et al. Enhanced programmed death 1 (PD-1) and PD-1 ligand (PD-L1) expression in patients with actinic cheilitis and oral squamous cell carcinoma. **Cancer Immunol Immunother**, v. 60, n. 7, p. 965-974, 2011.

MARCINOW, A.; OZER, E.; TEKNOS, T.; WEI, L.; HURTUK, A.; OLD, M. et al. Clinicopathologic predictors of recurrence and overall survival in adenoid cystic carcinoma of

the head and neck: a single institutional experience at a tertiary care center. **Head Neck**, v. 36, p. 1705–11, 2014.

MARSH, D.; SUCHAK, K.; MOUTASIM, K. A.; VALLATH, S.; HOPPER, C.; JERJES, W. et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. **J Pathol**, v. 223, p. 470–81, 2011.

MILLS, S. E. **Histology for Pathologists**. 4.ed. Virginia: Wolters Kluwer Health, 2012.

MOREAU, P.; MOUILLOT, G.; ROUSSEAU, P. et al. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p. 1191-1196, 2003.

MOSCONI, C.; ARANTES, D. A. C.; GONÇALVES, A. S.; ALENCAR, R. C. G.; OLIVEIRA, J. C.; SILVA, T. A. et al. Immunohistochemical investigations on the expression of programmed cell death ligand 1, human leukocyte antigens G and E, and granzyme B in intraoral mucoepidermoid carcinoma. **Arch Oral Biol**, v. 83, p. 55–62, 2017.

MOSKALUK, C. A. Adenoid cystic carcinoma: clinical and molecular features. **Head Neck Pathol**, v. 7, n. 1, p. 17-22, 2013.

MOUILLOT, G.; MARCOU, C.; ROUSSEAU, P. et al. HLA-G gene activation in tumor cells involves cisacting epigenetic changes. **Int J Cancer**, v. 113, p. 928-936, 2005.

MUKAIGAWA, T.; HAYASHI, R.; HASHIMOTO, K.; UGUMORI, T.; HATO, N.; FUJII, S. Programmed death ligand-1 expression is associated with poor disease free survival in salivary gland carcinomas. **J Surg Oncol**, v. 114, p. 36–43, 2016.

OHIGASHI, Y. et al. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 8, p. 2947-2953, 2005.

OIKAWA, T. et al. Intrahepatic expression of the co-stimulatory molecules programmed death-1, and its ligands in autoimmune liver disease. **Pathol Int**, v. 57, n. 8, p. 485-492, 2007.

PAUL, W.E. **Fundamental Immunology**. 6 ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.

PETROFF, M. G. et al. B7 family molecules: novel immunomodulators at the maternal fetal interface. **Placenta**, v. 23, p. S95-101, 2008.

PERZIN, K. H.; GULLANE, P.; CLAIRMONT, A. C. Adenoid cystic carcinomas arising in salivary glands: a correlation of histologic features and clinical course. **Cancer**, v. 42, p. 265–82, 1978.

QING, Y. et al. Upregulation of PD-L1 and APE1 is associated with tumorigenesis and poor prognosis of gastric cancer. **Drug Des Devel Ther**, v. 16, n. 9, p. 901-909, 2015.

RETTIG, E. M.; TAN, M.; LING, S.; YONESCU, R.; BISHOP, J. A.; FAKHRY, C. et al. MYB rearrangement and clinicopathologic characteristics in head and neck adenoid cystic carcinoma. **Laryngoscope**, v. 125, p. 292–9, 2015.

ROUAS-FREISS N.; MOREAU P.; MENIER C.; CAROSELLA E.D. HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. **Semin Cancer Biol**, v. 13, n. 5, p. 325-336, 2003.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; FERRONE, S.; CAROSELLA, E. D. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? **Cancer Res**, v. 65, n. 22, p. 10139-10144, 2005.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; MENIER, C. et al. Expression of tolerogenic HLA-G molecules in cancer prevents antitumor responses. **Semin Cancer Biol**, v. 17, p. 413-421, 2007.

ROUAS-FREISS, N. et al. HLA-G in cancer: a way to turn off the immune system. **Semin Cancer Biol**, v. 13, n. 5, p. 325-336, 2003.

SCHREIBER, R. D.; OLD, L. J.; SMYTH, M. J. Cancer Immunoediting: Integrating Immunity's Roles in Cancer Suppression and Promotion. **Science**, v. 331, n. 6024, p. 1565–1570, 2011.

SINTSOV, A. V.; KOVALENKO, E. I.; KHANIN, M. A. Apoptosis induced by granzyme B. **Bioorg Khim**, v. 34, p. 725-33, 2008.

SPIRO, R. H. Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients. **Head Neck Surg**, v. 8, n. 3, p. 177-184, 1986.

SPIRO, R. H.; HUVOS, A. G. Stage means more than grade in adenoid cystic carcinoma. **Am J Surg**, v. 164, n. 6, p. 623-628, 1992.

SRIDHARAN, V.; GJINI, E.; LIAO, X.; CHAU, N. G.; HADDAD, R. I.; SEVERGNINI, M. et al. Immune Profiling of Adenoid Cystic Carcinoma: PD-L2 Expression and Associations with Tumor-Infiltrating Lymphocytes. **Cancer Immunol Res**, v. 4, p. 679–87, 2016.

SZANTO, P. A.; LUNA, M. A.; TORTOLEDO, M. E.; WHITE, R. A. Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. **Cancer**, v. 54, p. 1062–9, 1984.

TAUXE, W. N.; MCDONALD, J. R.; DEVINE, K. D. A century of cylindromas. Short review and report of 27 adenoid cystic carcinomas arising in the upper respiratory passages. **Arch Otolaryngol**, v. 75, p. 364-76, 1962.

TRAN JANCO, J. M.; LAMICHHANE, P.; KARYAMPUDI, L.; KNUTSON, K. L. Tumor-infiltrating dendritic cells in cancer pathogenesis. **J Immunol**, v. 194, p. 2985–91, 2015.

TRAPANI, J. A. et al. Perforin-dependent nuclear entry of granzyme B precedes apoptosis, and is not a consequence of nuclear membrane dysfunction. **Cell Death Differ**, v. 5, n.6, p. 488-496, 1998.

TSUSHIMA, F. et al. Predominant expression of B7-H1 and its immunoregulatory roles in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 42, n. 3, p. 268-274, Mar. 2006.

VAN WEERT, S.; BLOEMENA, E.; VAN DER WAAL, I.; DE BREE, R.; RIETVELD, D. H.; KUIK, J. D. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a single-center analysis of 105 consecutive cases over a 30-year period. **Oral Oncol**, v. 49, p. 824–9, 2013.

VAN WEERT, S.; VAN DER WAAL, I.; WITTE, B. I.; LEEMANS, C. R.; BLOEMENA, E. Histopathological grading of adenoid cystic carcinoma of the head and neck: analysis of currently used grading systems and proposal for a simplified grading scheme. **Oral Oncol**, v. 51, p. 71–6, 2015.

VAN WEERT, S. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a single-center analysis of 105 consecutive cases over a 30-year period. **Oral Oncol**, v. 49, n. 8, p. 824–829, 2013.

VANDER POORTEN, V. L. et al. The development of a prognostic score for patients with parotid carcinoma. **Cancer**, v. 85, p. 2057–67, 1999.

WAHLBERG, P.; ANDERSON, H.; BIÖRKLUND, A.; MÖLLER, T.; PERFEKT R. Carcinoma of the parotid and submandibular glands--a study of survival in 2465 patients. **Oral Oncol**, v. 38, p. 706–13, 2002.

WANG, L. et al. Clinical significance of B7-H1 and B7-1 expressions in pancreatic carcinoma. **World J Surg**, v. 34, n. 5, p. 1059–1065, 2010.

WARD, M. J.; THIRDBOROUGH, S. M.; MELLOWS, T.; RILEY, C.; HARRIS, S.; SUCHAK, K. et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. **Br J Cancer**, v. 110, p. 489–500, 2014.

WASTOWSKI, I. J. et al. HLA-G expression in the skin of patients with systemic sclerosis. **J Rheumatol**, v. 36, n. 6, p. 1230–1234, 2009.

WU, C. et al. Immunohistochemical localization of programmed death-1 ligand-1 (PD-L1) in gastric carcinoma and its clinical significance. **Acta Histochem**, v. 108, n. 1, p. 19–24, 2006.

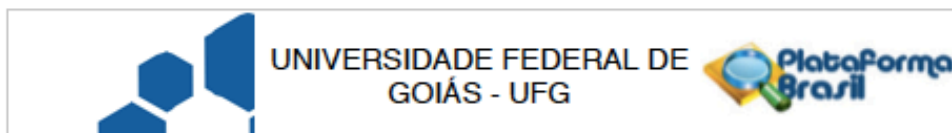
ZHANG, J. et al. Co-expression of PD-1 and PD-L1 predicts poor outcome in nasopharyngeal carcinoma. **Med Oncol**, v. 32, n. 3, p. 86, 2015.

ZINKERNAGEL, R. M. On cross-priming of MHC class I-specific CTL: rule or exception? **Eur J Immunol**, v. 32, n. 9, p. 2385–2392, 2002.

ZOU, W.; CHEN, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 6, p. 467–477, 2008.

ANEXOS

ANEXO A



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de mediadores envolvidos na imunossupressão local e evasão de células de tumores malignos de glândulas salivares

Pesquisador: Aline Carvalho Batista

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 53156015.4.0000.5083

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.460.804

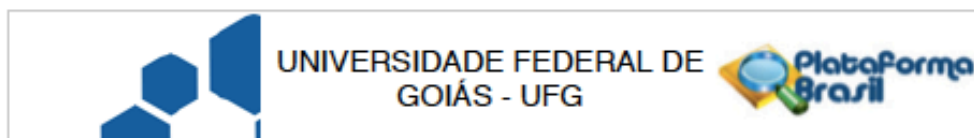
Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo transversal, que selecionará, a partir dos Registros do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (HAJ/ACCG), pacientes acometidos por Carcinoma Mucoepidermoide (CME) e Carcinoma Adenoide Cístico (CAC) de cabeça e pescoço, os quais foram diagnosticados e tratados entre os anos de 1992 a 2012 no Serviço de Cabeça e Pescoço (SCP). Os blocos de parafina e lâminas dos pacientes selecionados, serão analisados e submetidos a ensaios que possibilitem investigar a expressão de mediadores envolvidos na imunossupressão local e evasão de células neoplásicas do Carcinoma Mucoepidermoide (CME) e Carcinoma Adenoide Cístico (CAC), bem como, avaliar, em cada grupo de tumores (CME ou CAC), se há associação entre a expressão da HLAG, HLA-E, PDL-1, TGF-1, -2, -3 e IL-10 com fatores clinicopatológicos tais como presença de metástase linfonodal e/ou à distância, tamanho da lesão primária, tempo de sobrevida dos pacientes, subtipo histológico, localização do tumor e densidade de LTCs ativados (Granzima B+).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Investigar a expressão de mediadores envolvidos na imunossupressão local e evasão de células neoplásicas do Carcinoma Mucoepidermoide (CME) e Carcinoma Adenoide

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambala **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** cep.prpl.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.460.804

Cístico (CAC). Objetivo Secundário: 1. Avaliar a presença, distribuição e expressão das proteínas HLA-G, HLA-E, PDL-1, TGF-1, -2, -3 e IL-10 nos CME e CAC, bem como em glândulas salivares normais (Controle). 2. Avaliar a densidade de LTCs ativados (Granzima B+) nos CME e CAC e no estroma de glândulas salivares normais controle). 3. Investigar, em cada grupo de tumores (CME ou CAC), a associação entre a expressão da HLA-G, HLA-E, PDL-1, TGF-1, -2, -3 e IL-10 com fatores clinicopatológicos tais como presença de metástase linfonodal e/ou à distância, tamanho da lesão primária, tempo de sobrevida dos pacientes, subtipo histológico, localização do tumor e densidade de LTCs ativados (Granzima B+).

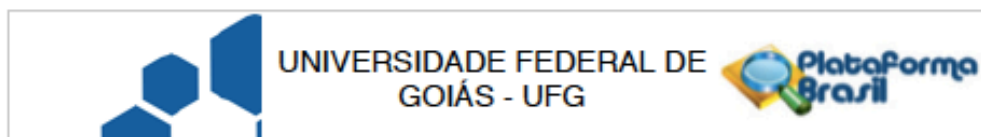
Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os pesquisadores consideram que não há risco ao paciente uma vez que nenhuma intervenção clínica será realizada e não haverá contato direto com o paciente, pois no estudo serão utilizados tecidos tumorais emblocados em parafina e arquivos. Os dados dos pacientes serão obtidos de prontuários médicos e os pesquisadores se comprometem a manter a privacidade dos pacientes e anonimato quando da divulgação dos resultados da pesquisa. **Benefícios:** os dados obtidos nesta pesquisa poderão auxiliar o Oncologista na decisão clínica de realização de possíveis terapêuticas adjuvantes como a quimioterapia, imunoterapia e/ou radioterapia e acompanhamento dos pacientes. Os pacientes podem ser beneficiados diretamente, uma vez que o custo da realização destas investigações moleculares é alto; como benefícios indiretos, espera-se que este estudo proporcione informações importantes sobre tumores de glândula salivar que podem ser altamente agressivos e metastáticos, colaborando para o entendimento dessas doenças e para a realização de novos estudos no tratamento dessas neoplasias

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Serão selecionadas 60 amostras para o estudo a partir de bancos de dados (prontuários e blocos/lâminas do setor de anatomia patológica) do HAJ/ACCG. Cronograma adequado. Foi colocado orçamento e especificado que ele será realizado com recursos de projetos do pesquisador financiados pelo CNPq e FAPEG. Os critérios de inclusão e exclusão foram detalhados. Os pesquisadores afirmam que os riscos são inexistentes porque não haverá contato direto com pacientes e por haver o compromisso do sigilo da identidade dos participantes do estudo. Os benefícios relatados tomam a pesquisa relevante e justificam a sua realização. Foi solicitado a dispensa do TCLE considerando as características da pesquisa e os compromissos assumidos pelos pesquisadores.

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** oep.prpl.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.460.804

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto com todos os itens necessários para a análise; termos de compromisso dos pesquisadores com a privacidade, utilizar os dados apenas para o presente estudo, obedecer os critérios de Ética em Pesquisa com seres humanos, de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. Anuência da direção da Faculdade de odontologia; aprovação da pesquisa no Conselho Diretor da Faculdade de Odontologia; Anuência da direção do Hospital Araújo Jorge e do Setor de Anatomia Patológica para consulta aos prontuários e utilização de blocos/lâminas dos pacientes selecionados.

Foi solicitado dispensa do TCLE que consideramos pertinente, considerando as justificativas dadas pelos pesquisadores.

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após análise dos documentos postados, somos favoráveis à aprovação do presente protocolo de pesquisa.

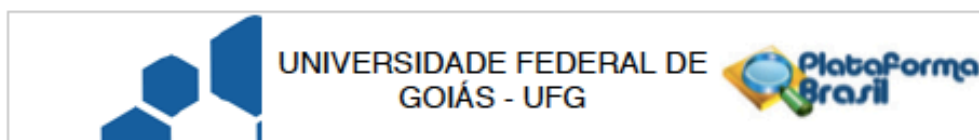
Considerações Finais a critério do CEP:

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa/CEP-UFG considera o presente protocolo APROVADO, o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes. Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar ao CEP-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Resolução CNS n. 466/12. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa maio de 2019.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_600061.pdf	12/02/2016 10:38:21		Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_responsabilidade_coordenador_telefone.pdf	12/02/2016 10:35:31	Aline Carvalho Batista	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_responsabilidade_tarcilia.pdf	12/02/2016 10:34:43	Aline Carvalho Batista	Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracao_responsabilidade_pesquisadores.pdf	12/02/2016 10:33:17	Aline Carvalho Batista	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projeto_detalhado.pdf	12/02/2016 10:29:43	Aline Carvalho Batista	Aceito

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
 Bairro: Campus Samambaia CEP: 74.001-970
 UF: GO Município: GOIANIA
 Telefone: (62)3521-1215 Fax: (62)3521-1163 E-mail: cep.prpl.ufg@gmail.com



Continuação do Parecer: 1.460.804

Investigador	projeto_detalhado.pdf	12/02/2016 10:29:43	Aline Carvalho Batista	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_Diretor_HAJ.pdf	23/12/2015 10:04:13	Aline Carvalho Batista	Aceito
Outros	Autorizacao_arquivosprontuarios_HAJ.pdf	15/12/2015 09:52:48	Aline Carvalho Batista	Aceito
Outros	Autorizacao_patologia_HAJ.pdf	15/12/2015 09:51:34	Aline Carvalho Batista	Aceito
Outros	certidao_conselho_diretor.pdf	15/12/2015 09:50:06	Aline Carvalho Batista	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracao_inst.pdf	16/10/2015 14:45:38	Aline Carvalho Batista	Aceito
Folha de Rosto	Formulario.pdf	16/10/2015 14:38:00	Aline Carvalho Batista	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

GOIANIA, 22 de Março de 2016

Assinado por:
João Batista de Souza
(Coordenador)

Endereço: Prédio da Reitoria Térreo Cx. Postal 131
Bairro: Campus Samambaia **CEP:** 74.001-970
UF: GO **Município:** GOIANIA
Telefone: (62)3521-1215 **Fax:** (62)3521-1163 **E-mail:** oep.prpl.ufg@gmail.com