



UNIVERSIDADE CHRISTUS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS –
PATOLOGIA ORAL E ESTOMATOLOGIA

SUELY CRISTINA ARAGÃO VERAS DOS SANTOS

IMUNOEXPRESSÃO DO HETERODÍMERO TLR1/2 NO PROGNÓSTICO DO
CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL

FORTALEZA

2026

SUELY CRISTINA ARAGÃO VERAS DOS SANTOS

IMUNOEXPRESSÃO DO HETERODÍMERO TLR1/2 NO PROGNÓSTICO DO
CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Christus, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Área de concentração: Patologia Oral e Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabricio Bitu Sousa

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

FORTALEZA
2026

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

D722i Dos Santos, Suely Cristina Aragão Veras.
Imunoexpressão do heterodímero tlr1/2 no prognóstico do
carcinoma espinocelular oral / Suely Cristina Aragão Veras Dos
Santos. - 2026.
56 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário Christus -
Unichristus, Mestrado em Ciências Odontológicas, Fortaleza, 2026.
Orientação: Prof. Dr. Fabricio Bitu Sousa.
Coorientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva.
Área de concentração: Ciências Odontológicas.

1. imuno-histoquímica. 2. receptor toll-like 2. 3. receptor toll-like
1. 4. carcinoma de células escamosas.. I. Título.

CDD 617.6

SUELY CRISTINA ARAGÃO VERAS DOS SANTOS

IMUNOEXPRESSÃO DO HETERODÍMERO TLR1/2 NO PROGNÓSTICO DO
CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Christus, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Área de concentração: Patologia Oral e Estomatologia.

Aprovada em: 10 / 02 /2026 .

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabricio Bitu Sousa

Universidade Christus

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva

Universidade Christus

Prof. Dra. Maria Júlia Barbosa Bezerra

Hospital Haroldo Juaçaba / Instituto do Câncer do Ceará

Dedico este trabalho à minha querida vó Ilce Martins (*in memoriam*), minha maior saudade, minha eterna cumade e a minha mãe Kátia.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde, força, sabedoria, fé e esperança ao longo desses 2 anos, pelas batalhas enfrentadas, os desafios encontrados no caminho, mas com Ele segui firme e forte, acreditando sempre nos caminhos d'Ele para mim.

A Nossa Senhora de Aparecida, por diversas vezes ter me dado sabedoria, paciência, ciência ao longo de toda minha vida e por ter me permitido a visitar o seu santuário. A ti me consagro, Mãe querida.

Aos meus pais, Kátia e Júnior, por acreditarem em mim, por segurarem minhas mãos, por terem fé e esperança de que dias melhores iriam chegar, por me permitirem a sonhar e por nunca terem me deixado desistir nessa jornada.

As minhas irmãs, Gabriela e Ana Júlia, por confiarem tanto em mim, por me terem como um espelho de uma irmã mais velha e por todo amor distribuído nos momentos mais difíceis.

A minha tia Kelly e minha prima Raissa, por terem me ajudado em diversos momentos da minha vida, pela confiança e esperança no que estou construindo.

Ao meu companheiro Ésio Filho, por ser meu apoio constante ao longo dessa jornada, por segurar minha mão nos momentos difíceis, pela força dada durante as longas contagens de lâminas e cada desafio enfrentado. Obrigada pelo incentivo constante, pela presença e por sonhar comigo os meus sonhos.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fabricio Bitu, por ter acreditado e colocado confiança em mim, no meu trabalho, na minha capacidade e por compartilhar de experiências e ensinamentos científicos e humanos. Sua condução foi fundamental para meu crescimento acadêmico e profissional.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Paulo Goberlânio, minha profunda gratidão pela orientação, que sempre esteve disponível, atento e generoso em compartilhar os seus conhecimentos infinitos. Sua orientação foi essencial em todas as etapas do estudo, contribuindo de forma decisiva para meu crescimento científico, acadêmico e profissional.

Aos professores Dra. Carolina Teófilo, Dr. Daniel Sá e Dr. Artur Forte, pelo acolhimento na clínica de estomatologia, pelas contribuições acadêmicas, disponibilidade, apoio e ensinamentos compartilhados, que foram essenciais para o aprimoramento clínico, humano e para minha formação durante o mestrado acadêmico.

Ao membro da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar o trabalho, pelas contribuições valiosas, sugestões e questionamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas e à Universidade, pela oportunidade de formação, pela estrutura oferecida e pelo compromisso com o ensino e a pesquisa.

Às instituições, laboratórios e serviços, que viabilizaram a realização desta pesquisa, bem como aos profissionais que colaboraram direta ou indiretamente durante as etapas do estudo.

À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP), pelo apoio financeiro por meio da concessão de bolsa de mestrado, viabilizada por meio do **Edital nº 01/2023 – Bolsas de Mestrado e Doutorado, processo nº 402237/2023-4**, fundamental para a dedicação e execução desta pesquisa

Aos amigos do mestrado, pela troca de conhecimentos, de experiências clínicas, apoio mútuo, incentivo, risos e companheirismo ao longo dessa trajetória, tornando essa caminhada mais leve e enriquecedora.

“É justo que muito custe o que muito vale.”
(Santa Teresa D’Ávila)

RESUMO

Os receptores semelhantes ao Toll (TLRs) são expressos em células do sistema imunológico, como macrófagos, células endoteliais, neutrófilos, que detectam e reconhecem os padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Com isso, recentemente foi descrito que o TLR 2 reconhece diversos ligantes bacterianos, o qual pode formar um homodímero ou um heterodímero com o TLR1 e TLR6. Assim, foi descrito também uma expressão nuclear de TLR2 que está associada com o envolvimento de carcinomas espinocelulares orais, que está presente em células escamosas orais e na displasia oral, a qual mostra o envolvimento na migração e proliferação de células cancerígenas. Dessa forma, o objetivo desse estudo é avaliar a influência da imunoexpressão do heterodímero TLR1/2 com o prognóstico e características clínico-patológicas do carcinoma espinocelular de boca. Trata-se de um estudo quantitativo, observacional, longitudinal e retrospectivo, conduzido com 215 casos de carcinoma espinocelular oral (CEC) diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará entre 2012 e 2022. Foram coletados dados sociodemográficos, clínico-patológicos e prognósticos a partir dos prontuários médicos. As amostras tumorais foram processadas pela técnica de Tissue Microarray (TMA) e submetidas à imunohistoquímica para detecção da expressão dos TLR 1 e 2, além do marcador NFκB p65. A análise da imunoexpressão foi realizada por meio de contagem do percentual de células com expressão citoplasmática e/ou nuclear. Os dados foram submetidos a testes qui-quadrado ou exato de Fisher, Long-Rank Mantel-Cox e regressão de Cox, adotando nível de significância de 5%. Nos 215 casos, a expressão nuclear de TLR1 ($p < 0,001$), citoplasmática de TLR2 ($p = 0,012$) e nuclear de NFκB p65 ($p = 0,002$) associaram-se a melhor sobrevida, enquanto a expressão estromal de TLR1 ($p = 0,013$) e de NFκB p65 ($p = 0,024$) relacionaram-se a pior prognóstico. Na análise univariada, o fumo também esteve associado a pior prognóstico ($p = 0,027$). Na análise multivariada, a expressão nuclear de TLR1 e citoplasmática de TLR2 configuraram-se como fatores protetores independentes ($p = 0,013$), enquanto TLR1 estromal ($p = 0,002$) e TLR2 nuclear ($p = 0,049$) foram preditores de recidiva tumoral. Portanto, a alta imunoexpressão citoplasmática de TLR2 podem ser considerados fatores prognósticos importantes para o CEC oral.

Palavras-chave: imuno-histoquímica; receptor toll-like 2; receptor toll-like 1; carcinoma de células escamosas.

ABSTRACT

Toll-like receptors (TLRs) are expressed by immune system cells, such as macrophages, endothelial cells, and neutrophils, where they detect and recognize pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Recently, TLR2 has been described as recognizing several bacterial ligands and can form either a homodimer or a heterodimer with TLR1 and TLR6. Moreover, nuclear expression of TLR2 has been reported and is associated with the development of oral squamous cell carcinoma (OSCC), being present in oral squamous cells and in oral dysplasia, indicating its role in cancer cell migration and proliferation. Therefore, the aim of this study was to evaluate the influence of TLR1/2 heterodimer immunoexpression on prognosis and clinicopathological characteristics of oral squamous cell carcinoma. This quantitative, observational, longitudinal, and retrospective study included 215 OSCC cases diagnosed and treated at Haroldo Juaçaba Hospital/Ceará Cancer Institute between 2012 and 2022. Sociodemographic, clinicopathological, and prognostic data were collected from medical records. Tumor samples were processed using the Tissue Microarray (TMA) technique and subjected to immunohistochemistry to assess the expression of TLR1 and TLR2, beyond the NFκB p65 marker. Immunoexpression analysis was performed by quantifying the percentage of tumor cells showing cytoplasmic and/or nuclear staining. The data were analyzed using chi-square or Fisher's exact tests, Log-Rank Mantel-Cox test, and Cox regression, adopting a 5% significance level. Among the 215 cases, nuclear expression of TLR1 ($p < 0.001$), cytoplasmic expression of TLR2 ($p = 0.012$), and nuclear expression of NFκB p65 ($p = 0.002$) were associated with better survival, whereas stromal expression of TLR1 ($p = 0.013$) and NFκB p65 ($p = 0.024$) correlated with poorer prognosis. In univariate analysis, smoking was also associated with worse prognosis ($p = 0.027$). In multivariate analysis, nuclear TLR1 expression and cytoplasmic TLR2 expression were identified as independent protective factors ($p = 0.013$), whereas stromal TLR1 ($p = 0.002$) and nuclear TLR2 ($p = 0.049$) were predictors of tumor recurrence. Therefore, high cytoplasmic immunoexpression of TLR2 may be considered an important prognostic factor in oral squamous cell carcinoma.

Keywords: immunohistochemistry; toll-like receptor 2; toll-like receptor 1; carcinoma, squamous cell.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Anticorpos utilizados para imuno-histoquímica	19
Tabela 2 -	Características clínico-terapêutica de pacientes com CEC oral tratados cirurgicamente em um período de 10 anos	21
Tabela 3 -	Correlação entre a imunoexpressão de TLR1, TLR2 e NFkB p65 em compartimentos celulares de carcinomas orais	24
Tabela 4 –	Influência de características clínico-terapêuticas e de expressão de NFkB p65 no perfil de imunoexpressão para TLR1 em CEC orais tratados cirurgicamente em um período de 10 anos	27
Tabela 5 –	Influência de características clínico-terapêuticas e de expressão de NFkB p65 no perfil de imunoexpressão para TLR2 em CEC orais tratados cirurgicamente em um período de 10 anos	31
Tabela 6 –	Influência de características clínicas e do perfil de imunoexpressão para TLR1, TLR2 e NFkB p65 na sobrevida livre de doença de pacientes com CEC orais tratados cirurgicamente em um período de 10 anos	34
Tabela 7 -	Análise multivariada de fatores de risco para recidiva em pacientes com CEC orais tratados cirurgicamente em um período de 10 anos	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Perfil de imunexpressão (baixo e alto) para TLR1, TLR2 e NFκB p65 em CEC oral	26
Figura 2 -	Influência da imunexpressão para TLR1 tumoral e estromal na sobrevida livre de doença em pacientes com CEC oral tratados cirurgicamente em um período de 10 anos	36
Figura 3 -	Influência da imunexpressão para TLR2 tumoral e estromal na sobrevida livre de doença em pacientes com CEC oral tratados cirurgicamente em um período de 10 anos	37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	Comitê Conjunto Americano de Câncer
CACON	Centro de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia
CEC	Carcinoma Espinocelular Oral
CLTs	Células T Específicas do Tumor
cTNM	Estadiamento Clínico
DAB	3,3' Diaminobenzidina
DAMPs	Padrão Moleculares Associados a Danos
HHJ/ICC	Hospital Haroldo Juaçaba / Instituto do Câncer do Ceará
HPV	Papilomavírus Humano
IL	Interleucinas
LTA	Ácido Lipoteicóico
MAT	Microambiente Tumoral
MEC	Matriz Extracelular
MyD88	Fator de Diferenciação Mieloide
NFkB	Fator Nuclear Kappa B
PAMPs	Padrão Moleculares Associados a Patógenos
PBS	Tampão Fosfato
PGN	Peptidoglicano
PMN	Leucócitos Polimorfonucleares
PSK	Agonista Krestin
pTNM	Estadiamento Patológico
RRP	Receptor de Reconhecimento Padrão
RQT	Radioquimioterapia
RT	Radioterapia isolada
SLD	Sobrevida Livre de Doença
TEM	Transição Epitelial-Mesenquimal
TIRAP	Receptor de Interleucina-1 Toll
TLRs	Receptor Toll-like
TMA	Técnica de Tissue Microarray

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	Imunidade inata e receptores de padrões moleculares associados a patógenos	12
1.2	Receptores Toll-Like e cânceres.....	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral.....	166
2.2	Objetivos específicos.....	16
3	MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1	Aspectos éticos e desenho do estudo.....	17
3.2	População do estudo e delineamento amostral	17
3.3	Critérios de inclusão e exclusão e coleta de dados.....	17
3.4	Gradação histológica	18
3.5	Coleta de dados sociodemográficos e clínicos	18
3.6	Técnica do Tissue Microarray (TMA) e Processamento Imuno-histoquímico.....	18
3.7	Análise imuno-histoquímica	19
3.8	Análise Estatística	20
4	RESULTADOS	20
4.1	Características da amostra	20
4.2	Correlação entre a expressão de TLR1, TLR2 e NFkB p65	23
4.3	Influência de características clínico-terapêuticas e de NFkB p65 na expressão de TLR1	25
4.4	Influência de características clínico-terapêuticas e de NFkB p65 na expressão de TLR2	25
4.5	Sobrevida livre de doença (SLD)	30
4.6	Análise multivariada de fatores de risco para recidiva (regressão de Cox).....	37
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO	44
	REFERÊNCIAS	46
	ANEXO A - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA	50

1 INTRODUÇÃO GERAL

1.1 Imunidade inata e receptores de padrões moleculares associados a patógenos

A imunidade inata consiste na defesa inicial contra as infecções e alguns dos seus componentes são ativados antes mesmo de ocorrer uma invasão de um microrganismo, como as barreiras epiteliais e químicas à entrada de invasores, e os inativados, presença de células fagocitárias e sistema do complemento (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). A resposta imunológica natural não tem especificidade, mas reconhece estruturas de patógenos microbianos que não estão presentes nas células dos mamíferos. Essas substâncias dos microrganismos que estimulam a resposta da imunidade inata são chamadas de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (ALI *et al.*, 2008).

Os PAMPs se ligam aos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), com isso, são expressos por um amplo espectro de agentes infecciosos, como RNA de fita dupla, flagelina, lipopolissacarídeo bacteriano, DNA bacteriano, RNA viral, protozoários, fungos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Os PRRs reconhecem as substâncias microbianas e desencadeiam as vias de sinalização para ativação das células do sistema imunológico em resposta à infecção por patógenos (KAWAI; AKIRA, 2010).

Os principais PRRs são: receptores semelhantes ao Toll (TLR), receptores varredores (*scavenger*), receptor a manose, receptor a N-formil- metionil, lectinas tipo C, os quais são codificados na linhagem germinativa, ou seja, a imunidade inata possui um conjunto de especificidades limitado. Os receptores varredores (*scavenger*), lectinas tipo C e receptor a N-formil-metionil são localizados nas membranas plasmáticas dos fagócitos, que se ligam aos seus ligantes PAMPs específicos, como carboidratos da superfície microbiana com manose (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Assim, os receptores semelhantes ao Toll (TLRs) são expressos em células do sistema imunológico, como macrófagos, células dendríticas, células endoteliais, neutrófilos (leucócitos polimorfonucleares ou PMN) e, também, são co-estimulatórios para ativação da resposta imune adaptativa, de células T e B, contra antígenos específicos (FERRAZ *et al.*, 2011; GOWING *et al.*, 2020; VAN TONGEREN *et al.*, 2015).

Os TLRs detectam e reconhecem tanto os PAMPs como também os padrões moleculares associados a danos (DAMPs), os quais são liberados de células/tecidos danificados ou estressados (PISANI; ESTADELLA; RIBEIRO, 2017). Esses receptores são proteínas

localizadas de forma transmembrana ou em membranas endossômicas, localizados intracelularmente (MCGETTRICK; O'NEILL, 2010).

Atualmente, há 11 tipos de TLRs expressos em humanos (TLR1 a TLR11), em que cada um tem um ligante específico, ou seja, cada um tem sua determinada classe de PAMPs e sua localização (PISANI; ESTADELLA; RIBEIRO, 2017). Os TLRs 1, 2, 4, 5 e 6 estão localizados na superfície celular, os quais reconhecem lipopeptídeos bacterianos, ácido lipoteicóico, LPS gram bacteriano negativo, flagelina bacteriana. Já os TLRs 3, 7, 8 e 9 estão localizados em endossomos e detectam RNA de fita dupla viral e DNA bacteriano (PISANI; ESTADELLA; RIBEIRO, 2017). O TLR10 ainda não possui um ligante específico reconhecido (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009).

O receptor toll-like do tipo 2 reconhece diversos ligantes bacterianos, o qual pode formar um homodímero ou um heterodímero com o TLR1 e TLR6, sendo os lipopeptídeos triacilados os ligantes para TLR2-TLR1 e os lipopeptídeos diacilados para o heterodímero TLR2-TLR6, que reconhece vários antígenos bacterianos e micobacterianos (ZHANG *et al.*, 2014).

A interação do dímero TLR2 - TLR6 reconhecerá PAMPs de bactérias Gram-positivas, como ácido lipoteicóico (LTA) e peptidoglicano (PGN), características da parede celular, e a ligação do TLR2 - TLR1 reconhece LTA e zimosan - polissacarídeos derivado de fungos (FERRAZ *et al.*, 2011, MÄKINEN *et al.*, 2015, GOWING *et al.*, 2020).

Com isso, quando ocorre a ligação de um PAMPs a um TLR, há ativação de vias de sinalização e de fatores de transcrição, como NFκB, por meio de proteínas adaptadoras MyD88, o qual leva a modulação da expressão de diversos genes responsivos pela resposta imune. O resultado final é a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias (interleucinas -IL-), quimiocinas e outras citocinas antivirais, como os interferons (GALLO *et al.*, 2017, MCINTURFF; MODLIN; KIM, 2005, ARANCIBIA *et al.*, 2007).

Em razão da ativação de fator de transcrição nuclear - NFκB -, ocorrerá a indução das citocinas inflamatórias e das moléculas de adesão, como IL-1,-2, -4,-5,-6, -12, importantes para o recrutamento de macrófagos e leucócitos para o local da infecção, ativação dos linfócitos B, proliferação das células T, além de induzir a fagocitose (KUMAR; KAWAI; AKIRA, 2009).

Vale ressaltar que a ativação de um receptor Toll pode ocorrer por meio de ligantes adicionais secretados também por células cancerígenas, que intensificam tanto os TLRs de uma célula tumoral quanto os TLRs do hospedeiro, o qual contribui para o desenvolvimento e progressão tumoral, angiogênese, linfangiogênese e metástase por causa da ativação desregulada de NFκB (ARANCIBIA *et al.*, 2007, GOWING *et al.*, 2020).

Devido essa desregulação, cria-se um microambiente tumoral (MAT) com presença de

células cancerígenas, células imunológicas, fibroblastos e uma matriz extracelular (MEC), o qual também auxilia as células tumorais a escapar da vigilância imunológica, inibindo a atividade das células dendríticas e das células T específicas do tumor (CTLs), tendo um escape imunológico de células tumorais (LIU *et al.*, 2022).

Por isso, o aumento no interesse clínico nos estudos relacionados sobre cânceres e os receptores Toll-Like, por terem a possibilidade de inovar nas terapias e medicamentos contra o câncer, por meio do uso de agonistas capazes de estimular a resposta imune antitumoral ou pelo desenvolvimento de antagonistas direcionados a vias pró-tumorais associadas à inflamação crônica, (SO; OUCHI, 2010; ZHU; MOHAN, 2010; ÖHLSCHLÄGER *et al.*, 2011) visto que há uma correlação positiva da ativação da via de sinalização dos receptores toll-like com o câncer oral, principalmente o carcinoma espinocelular oral, tendo os TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 e TLR9 expressos nessas células cancerígenas (PARK *et al.*, 2010).

1.2 Receptores Toll-Like e cânceres

A progressão tumoral está relacionada à regulação negativa de genes supressores de tumor, a ativação de proto-oncogenes e as vias de sinalização associadas, o qual pode ocorrer um efeito pró ou antitumoral a depender de qual TLR específico foi estimulado, do tipo de célula e da cascata de sinalização. Efeito antitumoral dos TLR tem sido descrito por meio de comunicação entre células imunológicas e cancerígenas através de citocinas ou moléculas co-estimuladoras (JAVOID; CHOI, 2020).

Os receptores TLR3 e TLR5 possuem efeitos antitumorais promissores, o que os diferenciam dos TLR4, TLR7, TLR8 e TLR9, que podem desempenhar um papel pró-tumoral em outros tipos de tumores. TLR como os TLR2 e TLR4 representam um papel de atividade pró-tumoral nas células do câncer de ovário (BAUER *et al.*, 2005, JAVOID; CHOI, 2020) e o TLR4 que tem sido relacionado à transição epitelial-mesenquimal (TEM) no câncer gástrico e carcinomas espinocelulares orais, aumentando a capacidade migratória e invasiva das células cancerígenas (GOWING *et al.*, 2020).

O aumento da atividade mitótica induzida por ligantes de TLR estimula o crescimento do tumor primário como também permite a progressão do câncer em locais metastáticos, tendo um aumento da resposta angiogênica e a evolução metastática para a circulação sanguínea (GOWING *et al.*, 2020).

Com isso, cada receptor do tipo toll like ligado com seu agonista em determinadas células podem ter atividades pró-tumoral em diversos tipos de cânceres, por exemplo: TLR2 com o ligante peptidoglicano (PGN) está relacionado com o câncer epitelial de ovário, já com

o ligante versicano, gera um microambiente inflamatório tendo associação com carcinoma pulmonar de Lewis e presença de metástase (CHEFETZ *et al.*, 2013, KIM *et al.*, 2009).

Já o TLR4 ao se ligar ao LPS pode gerar o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial, relacionado com o câncer gástrico e a proliferação celular. Em relação ao TLR5, tendo como agonista a flagelina, acelera a produção de IL-8 e TNF- α em cânceres gástricos humanos, que leva à proliferação de células tumorais, mas também pode ocorrer o aumento da atividade apoptótica e a diminuição da proliferação de células cancerígenas de cabeça e pescoço (JAVOID; CHOI, 2020, BURDELYA *et al.*, 2012).

Em relação à atividade antitumoral do TLR2 nos cânceres de mama, ocorre a ligação com o agonista krestin (PSK) o qual leva o mecanismo de estimular as células T CD8⁺ e células NK para que ocorra a inibição do crescimento tumoral (LU *et al.*, 2011). Recentemente, foi descrito que a expressão nuclear de TLR2 está associada também com o envolvimento de carcinomas espinocelulares orais em relação às metástases cervicais ou tumores recorrentes de cabeça e pescoço (MÄKINEN *et al.*, 2015).

Portanto, a expressão nuclear de TLR2 em células escamosas orais e na displasia oral, a qual mostra o envolvimento na migração e proliferação de células cancerígenas (PARK *et al.*, 2010). Dessa forma, se faz necessário pesquisar mais sobre a relação do câncer oral com o receptor Toll-like tipo 2, juntamente com suas ligações com os receptores tipo 1 e 6, para analisar o desenvolvimento tumoral e a ocorrência de metástases cervicais.

Uma vez que o carcinoma espinocelular oral é uma doença crônica não transmissível grave mundialmente, com mais de 350.000 novos casos anuais e uma taxa de sobrevivência baixa, que varia de 40% a 50% (JAGADEESAN *et al.*, 2024). Estabelece-se como objetivo do presente estudo, o intuito de avaliar a correlação dos receptores toll like, TLR1 e TLR2, com o envolvimento e a progressão do câncer oral com metástases cervicais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a influência da imunoexpressão dos receptores TLR1 e TLR2, com o prognóstico e características clínico-patológicas do carcinoma espinocelular de boca.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a imunoexpressão dos TLR 1 e TLR 2 tumoral em carcinomas espinocelulares orais;
- Correlacionar a imunoexpressão dos TLR 1 e TLR 2 tumoral com características clínica patológica e prognóstica dos carcinomas espinocelulares orais;
- Avaliar a correlação entre a imunoexpressão dos TLR 1 e TLR 2 tumoral entre si.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos e desenho do estudo

Trata-se de um estudo quantitativo, observacional, longitudinal e retrospectivo no qual foram coletados dados de pacientes diagnosticados/tratados com Carcinoma de Células Escamosas (CEC) de boca em um período 10 anos, de primeiro de janeiro de 2012 a 31 de dezembro de 2022, no Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), um Centro de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (CACON) no Nordeste Brasileiro.

Este estudo foi conduzido em conformidade com as diretrizes éticas estabelecidas pela Resolução nº 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde. O protocolo da pesquisa foi submetido à apreciação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto do Câncer do Ceará, por meio de registro na Plataforma Brasil. Com o seguinte número do parecer 5.100.277 (ANEXO I).

3.2 População do estudo e delineamento amostral

Tendo em vista que Kylmä *et al.* (2020) demonstrou que a alta expressão de TLR2 está diretamente associada à menor sobrevida livre de recidiva por CEC de boca em três anos (55 vs 75%) estima-se necessário avaliar 200 casos a fim de obter uma amostra que represente com 80% de poder e 95% de confiança a hipótese alternativa desse estudo. Tendo em vista a possibilidade de perda amostral, acresceu-se 10% sobre esta amostra totalizando 220 casos de CEC de boca. Após perda de cinco casos durante a reação de imuno-histoquímica, 215 casos de CEC de boca permaneceram no referido centro.

3.3 Critérios de inclusão e exclusão e coleta de dados

Foram selecionadas lâminas histológicas de CEC intraorais do Laboratório de Patologia Livino Parente do Instituto do Câncer do Ceará (ICC) e os blocos das referidas lâminas histológicas das peças cirúrgicas, os quais foram avaliadas e estadiadas de acordo com o Manual de Estadiamento do Câncer do Comitê Conjunto Americano de Câncer (AJCC), Oitava Edição (LYDIATT *et al.*, 2017).

Após avaliação dos blocos parafinados, foram excluídos os blocos que não apresentaram material suficiente para técnica do TMA, lâminas com áreas de necrose e após revisão dos prontuários clínicos, foram excluídos os casos de pacientes que não

foram tratados no ICC/HHJ (biópsias externas) e pacientes que receberam terapias neoadjuvantes. Dos blocos e lâminas selecionados, foi possível realizar o levantamento dos dados sociodemográficos, clínico-terapêuticos e prognósticos dos prontuários médicos dos pacientes a qual pertencerem.

3.4 Gradação histológica e Estadiamento Patológico

Após avaliação do grau de concordância e intraexaminador, um patologista com experiência (>10 anos de patologia oral) classificou os CEC de boca usando o sistema de classificação de tumores TNM, que é definido de acordo com as novas diretrizes propostas pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC).

A sobrevida livre de recidiva foi calculada com base na diferença entre a data de início do tratamento (dia, mês e ano) e a data da recidiva (dia, mês e ano) ou final do *follow up*, utilizando o número de meses entre essas datas para análise estatísticas (DE OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2021).

3.5 Coleta de dados sociodemográficos e clínicos

Dados sociodemográficos como idade, sexo foram levantados, assim como dados clínico-patológicos como variante histológica do tumor, localização primária, Estadiamento Patológico (pTNM), tratamento realizado, histórico do uso de fumo e/ou álcool, dados estes fornecidos através dos prontuários dos pacientes.

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

Após a revisão de todas as lâminas histológicas, a seleção das lâminas foram feitas mostrando uma área da peça cirúrgica com o microambiente tumoral adequado, que represente adequadamente o tumor. As lâminas classificadas como displasia epitelial apresentaram alterações arquitetônicas e celulares (DE OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2021). Após a seleção das lâminas, seus respectivos blocos (o bloco doador) foram definidos para formar o bloco TMA (o bloco receptor).

Para a técnica de TMA, utiliza-se um dispositivo técnico conhecido como "*tissue microarrayer*" (Quick Ray UNITMA®). Com este dispositivo, um fragmento do tecido mais representativo do doador, com diâmetro de 2 mm foi puncionado e transferido de forma ordenada para o bloco receptor, tendo a forma de uma matriz precisamente espaçada (DE OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2021)

Assim, cada bloco de TMA foi composto por 70 fragmentos de tecido tumoral, em duplicata. Em seguida, na mesma sessão, o bloco receptor foi submetido a cortes sequenciais de 4µm de espessura colocados em lâminas silanizadas, para coloração padrão de hematoxilina-eosina e reações imuno-histoquímicas.

A imuno-histoquímica ocorreu pela técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Após desparafinização e reidratação, a recuperação do antígeno foi realizada com solução de citrato 0,1 M, pH 6,0 em banho-maria a 97°C por 40 min. Após o resfriamento das lâminas à temperatura ambiente e duas lavagens, cada uma por cinco minutos com tampão fosfato 0,1M pH 7,3 (PBS), realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% diluído em PBS por 30 min em uma câmara escura, lavada adicionalmente em tampão e incubada *overnight* com anticorpos primários de acordo com a diluição determinada na literatura ou por reações em teste de estudo piloto (Tabela 1).

Tabela 1 - Anticorpos utilizados para imuno-histoquímica.

Anticorpo	Fabricante	Clone	Recuperação antigênica	Diluição
TLR1	Thermofisher ®	PA5-80135	Citrato pH 6.0	1:200
TLR2	Abcam®	ab21367	Citrato pH 6.0	1:300
NFκB p65	Thermofisher®	PA5-27617	Citrato pH 6.0	1:400

Fonte: elaborada pelo autor.

Após a incubação com o anticorpo primário por um tempo determinado pelos ensaios piloto, as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas com o sistema Envision (Dako®) por 30 min, e após a lavagem, a revelação foi por meio da incubação com 3,3' Diaminobenzidina (DAB) (Abcam®) e reagindo com hematoxilina de Harris a 7% por 10 segundos. Após a coloração e contra-coloração, as lâminas são lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellan® (DE OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2021).

Os controles negativos de tecidos não displásicos foram realizados nas lâminas do TMA utilizando a mesma técnica imuno-histoquímica descrita acima, mas omitindo a etapa de incubação com o anticorpo primário.

3.7 Análise imuno-histoquímica

A presença da cor marrom acastanhado foi utilizada como parâmetro de marcação

de antígeno em todas as amostras. Com isso, as lâminas foram escaneadas pelo software MoticEasyScan, a qual foi possível observar campos tanto intratumorais quanto peritumoral no software de análise QuPath, com um total de dez campos totalizados por um corte histológico com aumento de 400x (DE OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2021).

A contagem de células tumorais e estromais peritumorais foi realizada em cada um dos 10 campos selecionados. Além disso, para esses marcadores foram contadas as células tumorais coradas de marrom-acastanhado, em núcleo e/ou citoplasmático para cálculo do percentual de imunoexpressão (DANTAS *et al.*, 2019; DE OLIVEIRA FILHO *et al.*, 2021; AIRLEY *et al.*, 2010).

3.8 Análise estatística

Foi calculado o percentual de células tumorais e estromais peritumorais positivas para cada marcador e sua média e desvio-padrão. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e comparados por meio dos testes de Friedman/Dunn e correlação de Spearman (dados não paramétricos).

A mediana de imunoexpressão de cada marcador foi utilizada como ponto de corte para definição de baixa e alta expressão, e essas categorias foram associadas com as demais variáveis clínico-patológicas por meio dos testes exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson.

Adicionalmente, foi calculada sobrevida mediana livre de recidiva utilizando curvas de Kaplan-Meier, as quais foram associadas a todas as variáveis por modelo do teste de Log-Rank Mantel-Cox e modelo de regressão de Cox. Todas as análises foram realizadas adotando uma confiança de 95% no software SPSS versão 20.0 para Windows.

4 RESULTADOS

4.1 Características da amostra

Foram incluídos 215 pacientes com carcinoma espinocelular oral (CEC) tratados cirurgicamente no período de 10 anos referido. A maioria era do sexo masculino (74,9%), enquanto 25,1% eram do sexo feminino. A média de idade foi de aproximadamente 60 anos, com distribuição equilibrada entre pacientes com até 60 anos (51,2%) e acima de 60 anos (48,8%). Em relação aos hábitos, 42,5% dos pacientes eram fumantes e 29,9% referiram consumo de álcool (Tabela 2).

Quanto às características tumorais, observou-se uma maior frequência de tumores classificados como pT3 e pT4 (31,2% cada), enquanto pT1 representou apenas 8,4% dos

casos. Para o comprometimento linfonodal (pN), 49,3% não apresentavam metástase regional, ao passo que 18,1%, 23,3% e 9,3% foram classificados como pN1, pN2 e pN3, respectivamente (Tabela 2).

O estadiamento clínico revelou uma maior concentração nos estágios avançados, com predomínio de estágio IVa (42,8%), seguido de III (25,6%), II (14,9%), IVb (9,3%) e apenas 7,4% no estágio I (Tabela 2).

Em relação a localização anatômica, a língua foi o sítio anatômico mais acometido (55,3%), seguida pelo assoalho de boca (40,9%), palato (3,3%) e mucosa jugal (0,5%) (Tabela 2).

No que se refere ao tratamento adjuvante, 27% dos pacientes não receberam terapias adicionais, enquanto 29,8% foram submetidos exclusivamente à radioterapia (RT). A quimiorradioterapia com cisplatina foi o protocolo mais utilizado (30,7%), seguida de regimes alternativos, como carboplatina (3,7%), cisplatina associada a taxol (1,4%), cisplatina + vinorelbina (0,5%), cisplatina + cetuximabe + 5-FU (0,5%), entre outros em menor frequência. Além disso, 4,7% receberam quimioterapia com cisplatina isolada (Tabela 2).

Tabela 2 - Características clínico-terapêutica de pacientes com CEC oral tratados cirurgicamente em um período de 10 anos.

	n (%)
Sexo	
Feminino	54 (25.1%)
Masculino	161 (74.9%)
Idade	
Até 60	110 (51.2%)
>60	105 (48.8%)
Fumo	
Não	123 (57.5%)
Sim	91 (42.5%)
Álcool	
Não	150 (70.1%)
Sim	64 (29.9%)
pT	
1	18 (8.4%)

2	63 (29.3%)
3	67 (31.2%)
4	67 (31.2%)
pN	
0	106 (49.3%)
1	39 (18.1%)
2	50 (23.3%)
3	20 (9.3%)
Estadio Clínico	
I	16 (7.4%)
II	32 (14.9%)
III	55 (25.6%)
IVa	92 (42.8%)
IVb	20 (9.3%)
Localização	
Assoalho de boca	88 (40.9%)
Língua	119 (55.3%)
Palato	7 (3.3%)
Mucosa jugal	1 (0.5%)
Adjuvância	
Não	58 (27.0%)
RT	64 (29.8%)
RQT (Cisplatina)	66 (30.7%)
RQT (Carbotaxol)	8 (3.7%)
RQT (Cisplatina + Taxol)	3 (1.4%)
RQT (Cetuximabe + Cisplatina + 5FU)	1 (0.5%)
RQT (Cisplatina + Vinorelbina)	1 (0.5%)
RQT (Taxano)	2 (0.9%)
RQT (Metotrexato)	1 (0.5%)
RQT (Cetuximabe)	1 (0.5%)
QT (cisplatina)	10 (4.7%)

Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

Fonte: elaborada pelo autor.

4.2 Correlação entre a expressão de TLR1, TLR2 e NFkB p65

A análise de correlação de Spearman evidenciou diferentes padrões de associação entre os marcadores. A expressão nuclear de TLR1 correlacionou-se positivamente e de forma significativa com sua expressão citoplasmática ($r = 0,701$; $p < 0,001$) (Tabela 3).

A expressão citoplasmática de TLR1 apresentou correlação positiva com a expressão citoplasmática de TLR2 ($r = 0,213$; $p = 0,003$) (Tabela 3).

Entre os parâmetros relacionados ao TLR2, observou-se forte correlação positiva entre sua expressão nuclear e citoplasmática ($r = 0,916$; $p < 0,001$), além de correlação moderada entre a expressão nuclear e estromal do mesmo marcador ($r = 0,392$; $p < 0,001$). De forma semelhante, houve correlação significativa entre a expressão citoplasmática e estromal de TLR2 ($r = 0,342$; $p < 0,001$) (Tabela 3).

No que diz respeito ao NFkB p65, verificou-se correlação positiva entre sua expressão nuclear e estromal ($r = 0,155$; $p = 0,031$). Não foram observadas correlações significativas entre a expressão de NFkB p65 e os marcadores TLR1 ou TLR2 (Tabela 3).

Tabela 3 - Correlação entre a imunoeexpressão de TLR1, TLR2 e NFkB p65 em compartimentos celulares de carcinomas orais.

		TLR1 tumor (%)		TLR1 (%)	TLR2 tumor (%)		TLR2 (%)	NFkB p65 (%)	NFkB p65 (%)	Estroma (%)
		Nuclear	Citoplasma	Estroma	Nuclear	Citoplasma	Estroma	Nuclear	Citoplasma	Estroma
Média±DP		5.11±6.57	46.82±23.41	86.95±24.09	2.58±6.50	3.47±7.84	0.04±0.13	11.64±19.61	93.74±19.90	46.30±22.88
TLR1 tumor	r=	-	0.701*	0.060	0.019	0.038	0.131	0.073	-0.031	-0.021
nuclear (%)	p-Valor	-	<0.001	0.408	0.793	0.598	0.070	0.309	0.662	0.772
TLR1 tumor	r=	-	-	0.022	0.106	0.213*	0.076	0.140	0.063	0.017
citoplasma (%)	p-Valor	-	-	0.761	0.146	0.003	0.298	0.052	0.380	0.819
TLR1 estroma	r=	-	-	-	0.073	-0.033	0.052	0.102	0.018	0.097
(%)	p-Valor	-	-	-	0.338	0.671	0.502	0.177	0.816	0.196
TLR2 tumor	r=	-	-	-	-	0.916*	0.392*	0.057	0.087	-0.004
nuclear (%)	p-Valor	-	-	-	-	<0.001	<0.001	0.442	0.245	0.961
TLR2 tumor	r=	-	-	-	-	-	0.342*	0.056	0.051	-0.047
citoplasma (%)	p-Valor	-	-	-	-	-	<0.001	0.457	0.494	0.532
TLR2 estroma	r=	-	-	-	-	-	-	0.026	0.056	0.139
(%)	p-Valor	-	-	-	-	-	-	0.727	0.453	0.063
NFkB p65 tumor	r=	-	-	-	-	-	-	-	-0.054	0.155*
nuclear (%)	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	0.451	0.031
NFkB p65 tumor	r=	-	-	-	-	-	-	-	-	0.036
citoplasma (%)	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	0.622
NFkB p65	r=	-	-	-	-	-	-	-	-	-
estroma (%)	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*p<0,05, correlação de Spearman.

Fonte: elaborada pelo autor.

4.3 - Influência de características clínico-terapêuticas e de NFkB p65 na expressão de TLR1

Observou-se que o sexo esteve associado à expressão citoplasmática de TLR1, com maior frequência de positividade em mulheres ($p = 0,022$). Da mesma forma, indivíduos não fumantes apresentaram maior expressão citoplasmática de TLR1 em comparação aos fumantes ($p = 0,044$) (Tabela 4).

Quanto ao tratamento, a adjuvância mostrou associação relevante. Pacientes submetidos à radioterapia isolada apresentaram maior positividade nuclear e citoplasmática de TLR1, enquanto aqueles tratados com radioquimioterapia apresentaram menores proporções de positividade ($p = 0,004$ e $p = 0,022$, respectivamente) (Tabela 4). Em relação à interação com NFkB p65, verificou-se que a ausência de expressão nuclear de NFkB p65 esteve significativamente associada a maior proporção de casos com baixa expressão nuclear e citoplasmática de TLR1 ($p = 0,001$ e $p < 0,001$, respectivamente). Além disso, a expressão estromal de NFkB p65 $\leq 40\%$ relacionou-se à menor expressão estromal de TLR1 ($p = 0,018$) (Tabela 4).

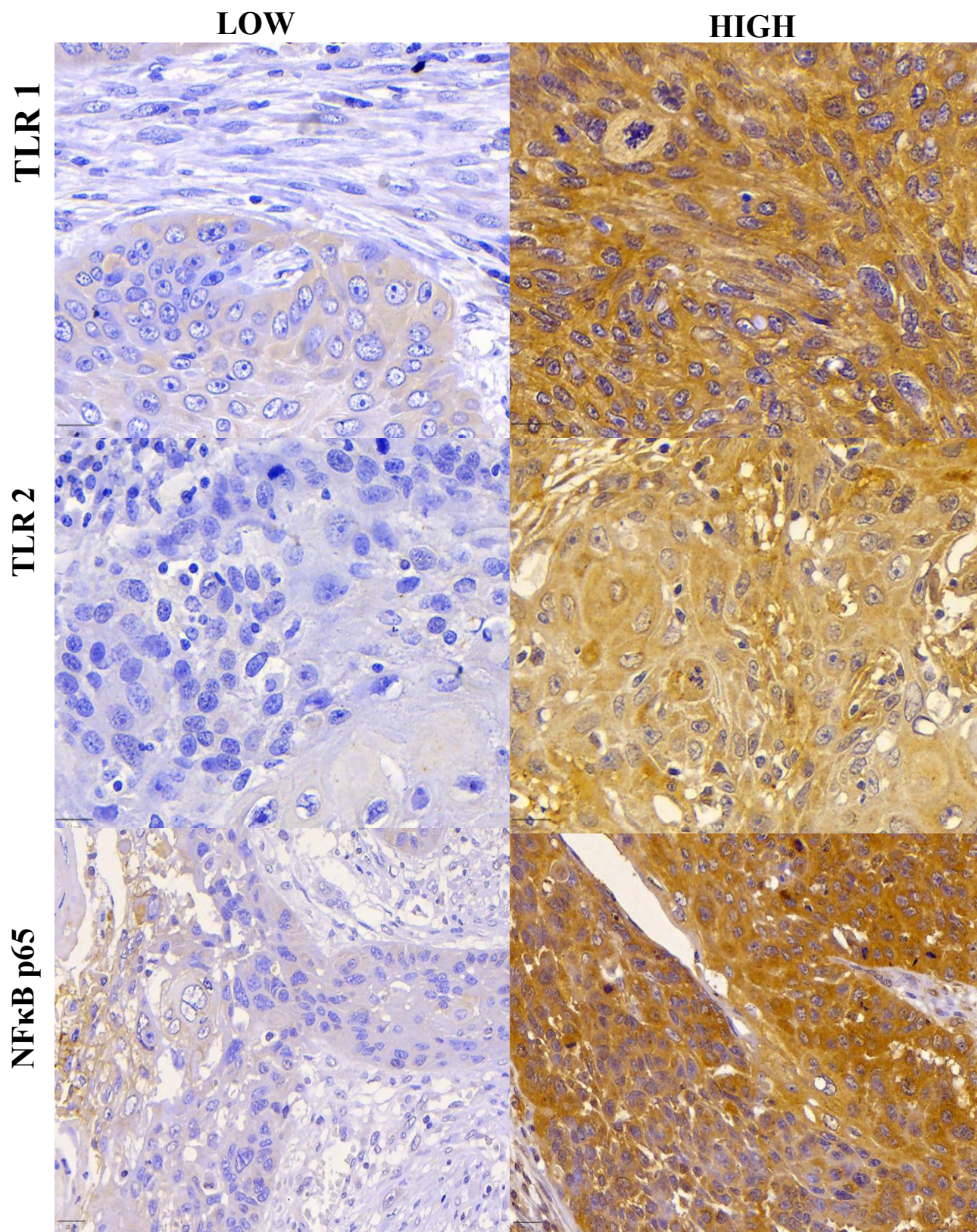
Por outro lado, idade, consumo de álcool, estadiamento clínico, localização tumoral e status linfonodal (pN) não apresentaram associação significativa com os padrões de imunoexpressão de TLR1.

4.4 - Influência de características clínico-terapêuticas e de NFkB p65 na expressão de TLR2

Na análise da expressão de TLR2, a maioria das variáveis clínico-patológicas avaliadas não apresentou associação significativa com os diferentes compartimentos tumorais. Entretanto, observou-se que pacientes não fumantes apresentaram maior frequência de positividade citoplasmática para TLR2 em comparação aos fumantes ($p = 0,035$) (Tabela 5).

A associação mais sólida foi identificada com a expressão de NFkB p65, o qual a ausência de expressão nuclear de NFkB p65 esteve significativamente relacionada à maior proporção de casos com baixa expressão de TLR2 nos compartimentos nuclear, citoplasmático e estromal ($p < 0,001$; $p < 0,001$; $p = 0,007$, respectivamente). Por outro lado, a positividade de NFkB p65 ($> 0\%$) esteve associada à maior expressão de TLR2 em todos os compartimentos tumorais (Tabela 5).

Figura 1 - Perfil de imunoexpressão (baixo e alto) para TLR1, TLR2 e NFkB p65 em CEC oral.



Fonte: elaborada pelo autor.

pN0	49 (48.5%)	57 (50.0%)	0,828	35 (49.3%)	71 (49.3%)	0,999	19 (45.2%)	87 (50.3%)	0,557
pN+	52 (51.5%)	57 (50.0%)		36 (50.7%)	73 (50.7%)		23 (54.8%)	86 (49.7%)	
Estadio Clínico									
I/II	23 (22.8%)	25 (21.9%)	0,472	18 (25.4%)	30 (20.8%)	0,742	10 (23.8%)	38 (22.0%)	0,555
III	22 (21.8%)	33 (28.9%)		18 (25.4%)	37 (25.7%)		8 (19.0%)	47 (27.2%)	
IV	56 (55.4%)	56 (49.1%)		35 (49.3%)	77 (53.5%)		24 (57.1%)	88 (50.9%)	
Localização									
Língua	52 (51.5%)	67 (58.8%)	0,283	37 (52.1%)	82 (56.9%)	0,503	19 (45.2%)	100 (57.8%)	0,142
Outros	49 (48.5%)	47 (41.2%)		34 (47.9%)	62 (43.1%)		23 (54.8%)	73 (42.2%)	
Adjuvância									
Não	27 (26.7%)	31 (27.2%)	0,004	16 (22.5%)	42 (29.2%) *	0,022	11 (26.2%)	47 (27.2%)	0,553
RT	20 (19.8%)	44 (38.6%) *		15 (21.1%)	49 (34.0%) *		10 (23.8%)	54 (31.2%)	
RQT	54 (53.5%) *	39 (34.2%)		40 (56.3%) *	53 (36.8%)		21 (50.0%)	72 (41.6%)	
NFkB p65 tumor nuclear (%)									
0%	59 (63.4%) *	41 (39.8%)	0,001	46 (74.2%) *	54 (40.3%)	0,000	17 (47.2%)	83 (51.9%)	0,614
>0%	34 (36.6%)	62 (60.2%) *		16 (25.8%)	80 (59.7%) *		19 (52.8%)	77 (48.1%)	
NFkB p65 tumor citoplasma (%)									
<100%	11 (11.8%)	17 (16.5%)	0,350	11 (17.7%)	17 (12.7%)	0,347	9 (25.0%) *	19 (11.9%)	0,042

=100%	82 (88.2%)	86 (83.5%)		51 (82.3%)	117 (87.3%)		27 (75.0%)	141 (88.1%)*	
NFkB p65 estroma									
(%)									
Até 40%	33 (35.1%)	31 (30.4%)	0,482	23 (37.1%)	41 (30.6%)	0,367	17 (50.0%)*	47 (29.0%)	0,018
>40%	61 (64.9%)	71 (69.6%)		39 (62.9%)	93 (69.4%)		17 (50.0%)	115 (71.0%)*	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson (n, %).

Fonte: elaborada pelo autor.

As demais variáveis analisadas, incluindo sexo, idade, consumo de álcool, estágio clínico, localização tumoral, status linfonodal (pN), pT revisado e tipo de adjuvância, não apresentaram associação estatisticamente significativa com a imunoexpressão de TLR2.

4.5. Sobrevida livre de doença (SLD)

Na análise de sobrevida livre de doença (SLD), 35 pacientes (17,5%) apresentaram recidiva tumoral durante o acompanhamento, com mediana de 19 meses (IC95%: 14,48–23,11) (Tabela 6).

Entre as características clínicas, observou-se que pacientes não fumantes apresentaram maior sobrevida em comparação aos fumantes ($p = 0,027$) (Tabela 6). As demais variáveis clínicas, incluindo sexo, idade, consumo de álcool, estágio clínico, localização tumoral, status linfonodal (pN), pT revisado e tipo de adjuvância, não apresentaram associação significativa com a SLD.

Porém, em relação ao perfil de imunoexpressão, destacaram-se associações importantes sobre o TLR1 nuclear $>2\%$, o qual demonstrou uma maior sobrevida livre de doença ($p < 0,001$), enquanto baixa expressão ($\leq 2\%$) esteve relacionada a pior prognóstico. Já o TLR1 estromal até 50% foi associado a melhor sobrevida em comparação a $>50\%$ ($p = 0,013$) (Tabela 6).

E o TLR2 com expressão citoplasmático $>2\%$ associou-se a melhor sobrevida ($p = 0,012$), como também o NFkB p65 nuclear positivo ($>0\%$) que esteve fortemente relacionado a maior sobrevida em relação aos casos negativos (0%) ($p = 0,002$); sendo o NFkB p65 estromal até 40%, a melhor sobrevida em comparação a $>40\%$, com diferença estatística ($p = 0,024$) (Tabela 6).

Tabela 5 - Influência de características clínico-terapêuticas e de expressão de NFkB p65 no perfil de imunoeexpressão para TLR2 em CEC orais tratados cirurgicamente em um período de 10 anos.

	TLR2 tumor nuclear (%)			TLR2 tumor citoplasma			TLR2 estroma		
			p-			p-			p-
	Até 2%	>2%	Valor	Até 2%	>2%	Valor	0%	>0%	Valor
Sexo									
Feminino	42 (26.6%)	11 (22.9%)	0,611	40 (27.2%)	13 (22.0%)	0,442	41 (27.9%)	12 (20.3%)	0,262
Masculino	116 (73.4%)	37 (77.1%)		107 (72.8%)	46 (78.0%)		106 (72.1%)	47 (79.7%)	
Idade									
Até 60	84 (53.2%)	21 (43.8%)	0,253	78 (53.1%)	27 (45.8%)	0,343	74 (50.3%)	31 (52.5%)	0,775
>60	74 (46.8%)	27 (56.3%)		69 (46.9%)	32 (54.2%)		73 (49.7%)	28 (47.5%)	
Fumo									
Não	86 (54.8%)	33 (68.8%)	0,086	78 (53.4%)	41 (69.5%)*	0,035	82 (56.2%)	37 (62.7%)	0,390
Sim	71 (45.2%)	15 (31.3%)		68 (46.6%)*	18 (30.5%)		64 (43.8%)	22 (37.3%)	
Álcool									
Não	106 (67.5%)	38 (79.2%)	0,122	97 (66.4%)	47 (79.7%)	0,061	100 (68.5%)	44 (74.6%)	0,388
Sim	51 (32.5%)	10 (20.8%)		49 (33.6%)	12 (20.3%)		46 (31.5%)	15 (25.4%)	
pT									
pT1/pT2	61 (38.6%)	18 (37.5%)	0,890	58 (39.5%)	21 (35.6%)	0,606	55 (37.4%)	24 (40.7%)	0,663
pT3/pT4	97 (61.4%)	30 (62.5%)		89 (60.5%)	38 (64.4%)		92 (62.6%)	35 (59.3%)	

pN

pN0	80 (50.6%)	20 (41.7%)	0,276	73 (49.7%)	27 (45.8%)	0,613	73 (49.7%)	27 (45.8%)	0,613
pN+	78 (49.4%)	28 (58.3%)		74 (50.3%)	32 (54.2%)		74 (50.3%)	32 (54.2%)	

Estadio Clínico

I/II	38 (24.1%)	9 (18.8%)	0,543	35 (23.8%)	12 (20.3%)	0,859	33 (22.4%)	14 (23.7%)	0,915
III	38 (24.1%)	15 (31.3%)		37 (25.2%)	16 (27.1%)		37 (25.2%)	16 (27.1%)	
IV	82 (51.9%)	24 (50.0%)		75 (51.0%)	31 (52.5%)		77 (52.4%)	29 (49.2%)	

Localização

Língua	87 (55.1%)	27 (56.3%)	0,885	82 (55.8%)	32 (54.2%)	0,840	82 (55.8%)	32 (54.2%)	0,840
Outros	71 (44.9%)	21 (43.8%)		65 (44.2%)	27 (45.8%)		65 (44.2%)	27 (45.8%)	

Adjuvância

Não	41 (25.9%)	14 (29.2%)	0,902	36 (24.5%)	19 (32.2%)	0,526	38 (25.9%)	17 (28.8%)	0,165
RT	47 (29.7%)	14 (29.2%)		45 (30.6%)	16 (27.1%)		39 (26.5%)	22 (37.3%)	
RQT	70 (44.3%)	20 (41.7%)		66 (44.9%)	24 (40.7%)		70 (47.6%)	20 (33.9%)	

NFkB p65 tumor**nuclear (%)**

0%	84 (58.7%) *	12 (26.1%)	0,000	80 (60.6%) *	16 (28.1%)	0,000	76 (57.1%)*	20 (35.7%)	0,007
>0%	59 (41.3%)	34 (73.9%)		52 (39.4%)	41 (71.9%) *		57 (42.9%)	36	
		*						(64.3%)*	

NFkB p65 tumor**citoplasma (%)**

<100%	20 (14.0%)	6 (13.0%)	0,872	18 (13.6%)	8 (14.0%)	0,942	20 (15.0%)	6 (10.7%)	0,431
=100%	123 (86.0%)	40 (87.0%)		114 (86.4%)	49 (86.0%)		113 (85.0%)	50 (89.3%)	

NFkB p65 estroma (%)

Até 40%	44 (31.0%)	17 (37.0%)	0,452	41 (31.3%)	20 (35.1%)	0,610	40 (30.3%)	21 (37.5%)	0,335
>40%	98 (69.0%)	29 (63.0%)		90 (68.7%)	37 (64.9%)		92 (69.7%)	35 (62.5%)	

*p<0,05, teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson (n, %).

Fonte: elaborada pelo autor.

Assim, não foram observadas diferenças significativas para TLR2 nuclear, TLR2 estromal, NFkB p65 citoplasmático e demais variáveis testadas (Tabela 6).

As análises de sobrevida realizadas por meio das curvas de Kaplan-Meier, associadas pelo teste de Log-Rank (Mantel-Cox) e confirmadas pelo modelo de regressão de Cox, demonstraram que a imunomarcção dos receptores TLR1 e TLR2 influenciou significativamente o prognóstico dos pacientes com carcinoma espinocelular oral (Tabela 6).

A alta expressão nuclear de TLR1 (>2%) esteve associada a melhor sobrevida livre de recidiva, enquanto a elevada expressão estromal (>50%) foi correlacionada a pior prognóstico (Figura 2). Em relação ao TLR2, observou-se que a expressão nuclear (até 2%) esteve relacionada a menor tempo de sobrevida sem recidiva, ao passo que a alta expressão citoplasmática (>2%) se associou a evolução mais favorável (Figura 3).

Tabela 6 - Influência de características clínicas e do perfil de imunoexpressão para TLR1, TLR2 e NFkB p65 na sobrevida livre de doença de pacientes com CEC orais tratados cirurgicamente em um período de 10 anos.

	Sobrevida livre de doença		p- Valor
	n (%)	Mediana (IC95%)	
Toda a amostra	35 (17.5%)	19.00 (14.48-23.11)	-
Sexo			
Feminino	9 (19.1%)	16.63 (7.72-25.54)	0,883
Masculino	26 (17.0%)	18.90 (14.30-23.50)	
Idade			
Até 60	19 (18.4%)	18.20 (13.09-23.31)	0,840
>60	16 (16.5%)	19.63 (12.41-26.85)	
Fumo			
Não	25 (22.3%)	20.23 (12.36-28.10)	0,027
Sim	10 (11.4%)	18.17 (10.82-25.52)	
Álcool			
Não	27 (19.7%)	19.30 (16.09-22.51)	0,255
Sim	8 (12.7%)	18.40 (7.89-28.91)	
pT			
pT1/pT2	14 (18.7%)	19.07 (5.86-32.28)	0,334
pT3/pT4	21 (16.8%)	18.90 (16.37-21.43)	

pN			
pN0	17 (17.7%)	22.13 (15.21-29.05)	0,208
pN+	18 (17.3%)	13.97 (7.48-20.46)	
Estadio Clínico			
I/II	5 (11.4%)	21.50 (7.70-35.30)	0,942
III	8 (15.1%)	20.67 (9.85-31.49)	
IV	22 (21.4%)	17.03 (11.94-22.12)	
Localização			
Língua	22 (19.8%)	20.67 (10.94-30.40)	0,257
Outros	13 (14.6%)	18.50 (11.78-25.22)	
Adjuvância			
Não	10 (19.6%)	12.80 (2.58-23.02)	0,088
RT	13 (21.0%)	20.67 (11.57-29.77)	
RQT	12 (13.8%)	19.07 (14.28-23.86)	
TLR1 tumor nuclear percentual			
Até 2%	8 (8.2%)	14.40 (8.99-19.81)	0,000
>2%	27 (26.2%)	23.60 (9.67-37.53)	
TLR1 estroma percentual			
Até 50	11 (28.9%)	26.97 (15.90-38.04)	0,013
>50	24 (14.8%)	17.03 (12.84-21.22)	
TLR2 tumor nuclear percentual			
Até 2%	23 (15.8%)	14.80 (9.97-19.63)	0,215
>2%	9 (20.0%)	21.50 (12.27-30.73)	
TLR2 tumor citoplasma percentual			
Até 2%	19 (13.9%)	14.23 (9.25-19.21)	0,012
>2%	13 (24.1%)	26.83 (16.32-37.34)	
TLR2 estroma percentual			
0%	18 (13.2%)	18.90 (14.07-23.73)	0,087
>0%	14 (25.5%)	18.20 (11.61-24.79)	
NFkB p65 tumor nuclear percentual			
0%	13 (14.1%)	13.97 (8.98-18.96)	0,002
>0%	20 (22.2%)	27.63 (20.24-35.02)	

NFkB p65 tumor citoplasma**percentual**

<100%	3 (13.6%)	14.00 (0.00-32.88)	0,709
=100%	30 (18.8%)	19.37 (15.92-22.82)	

NFkB p65 estroma percentual

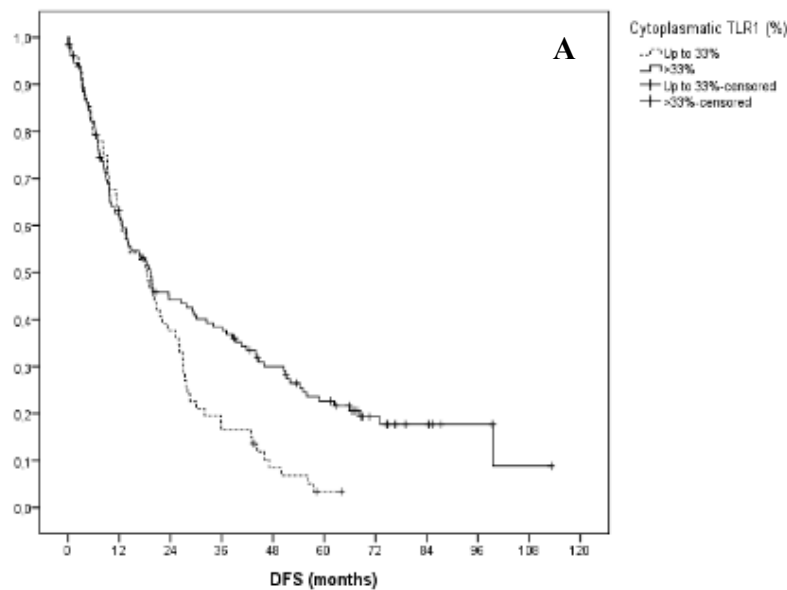
Até 40%	14 (24.1%)	19.67 (10.37-28.97)	0,024
>40%	17 (13.7%)	18.50 (12.98-24.02)	

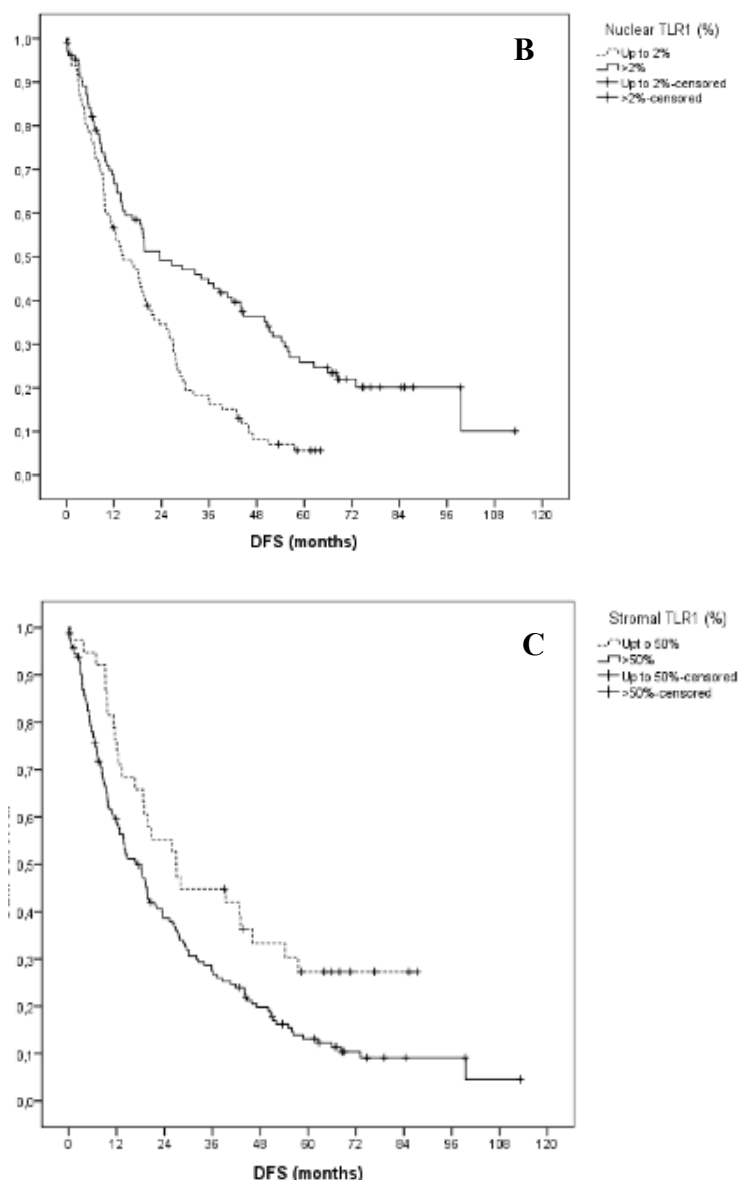
*p<0,05, teste Log-Rank Mantel-Cox; CI95% = intervalo de confiança 95% da mediana de SLD.

Fonte: elaborada pelo autor.

A expressão estromal do TLR2, por sua vez, não apresentou impacto estatisticamente significativo na sobrevida (Figura 3).

Figura 2 - Influência da imunoexpressão para TLR1 tumoral e estromal na sobrevida livre de doença em pacientes com CEC oral tratados cirurgicamente em um período de 10 anos.





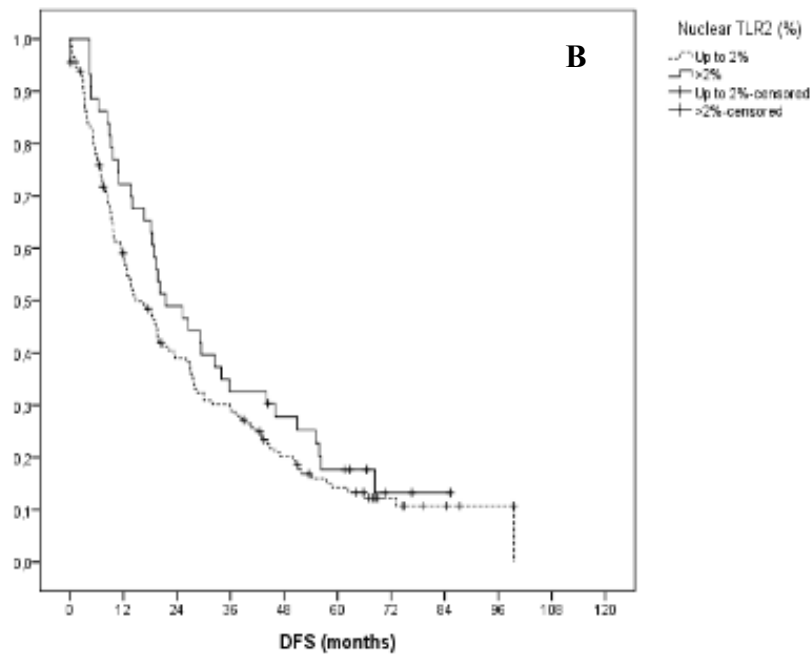
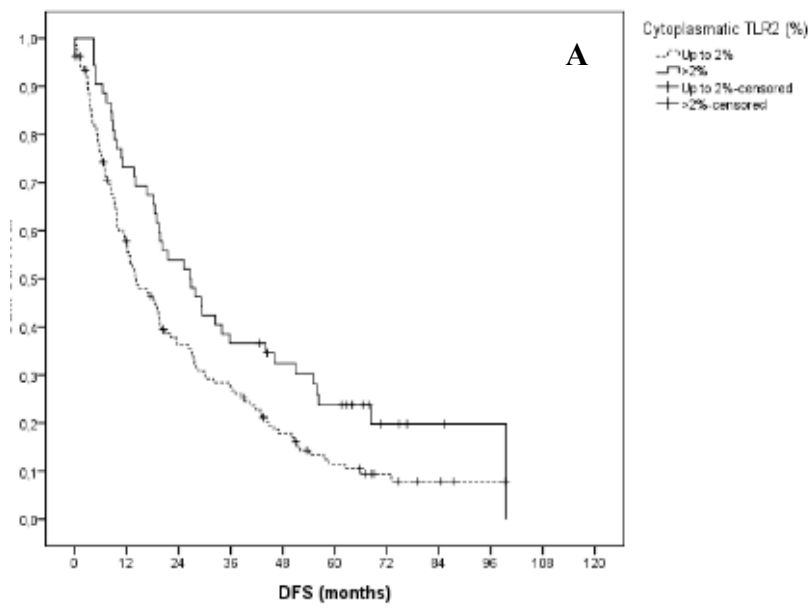
Fonte: elaborada pelo autor.

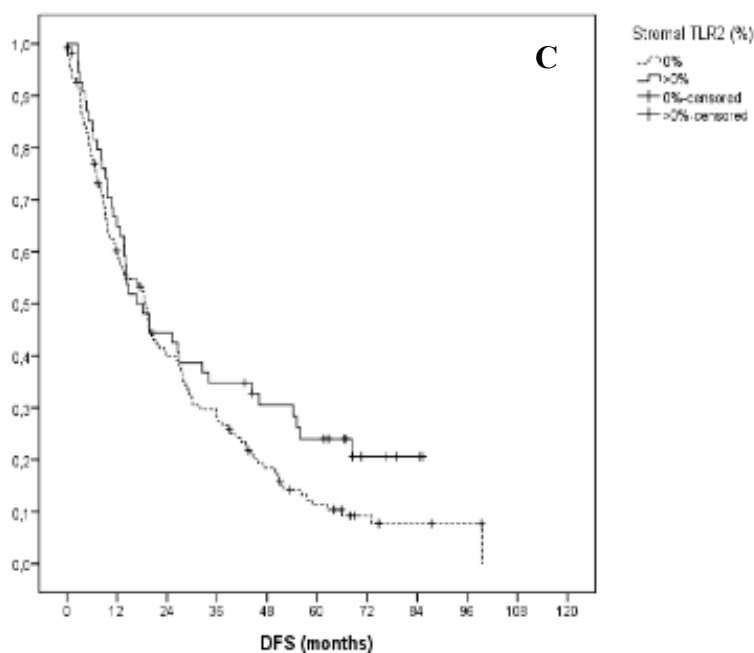
Legenda: (A) A alta expressão citoplasmática (>33%) está relacionada a melhor sobrevida em relação a baixa expressão ($\leq 33\%$) com o prognóstico discretamente melhor; (B) Pacientes com alta expressão nuclear >2% apresentaram maior sobrevida livre de doença em relação aos com baixa expressão $\leq 2\%$; (C) Pacientes com expressão estromal >50% tiveram sobrevida significativamente menor, enquanto $\leq 50\%$ apresentaram maior tempo livre de recorrência.

4.6 – Análise multivariada de fatores de risco para recidiva (regressão de Cox)

Observou-se que as variáveis clínicas avaliadas — sexo, idade, tabagismo, consumo de álcool, estadiamento tumoral (pT e pN revisados), estágio clínico, localização da lesão e tipo de adjuvância — não apresentaram associação estatisticamente significativa com o risco de recidiva da doença ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Figura 3 - Influência da imunoexpressão para TLR2 tumoral e estromal na sobrevida livre de doença em pacientes com CEC oral tratados cirurgicamente em um período de 10 anos.





Fonte: elaborada pelo autor.

Legenda: (A) A expressão citoplasmática de TLR2 acima de 2% esteve associada a melhor prognóstico e maior tempo de sobrevida sem recorrência; (B) A expressão nuclear de TLR2 até 2% esteve associada a pior sobrevida livre de recorrência, indicando maior risco de progressão tumoral; (C) A expressão estromal de TLR2 não apresentou associação estatisticamente significativa com a sobrevida livre de recorrência.

No entanto, o perfil de imunoexpressão revelou a existência de marcadores prognósticos independentes. Ademais, a expressão nuclear de TLR1 demonstrou um efeito protetor significativo, resultando em uma redução de 54% no risco de recidiva ($HRa = 0,46$; $IC95\%: 0,30-0,71$; $p < 0,001$) (Tabela 7). Em contrapartida, a expressão de TLR1 no estroma esteve associada a um aumento substancial no risco de recidiva, mais que duplicando a probabilidade de evento ($HRa = 2,30$; $IC95\%: 1,36-3,89$; $p = 0,002$) (Tabela 7).

Além disso, a expressão nuclear de TLR2 foi significativamente associada a um risco elevado de recidiva ($HRa = 3,01$; $IC95\%: 1,01-8,99$; $p = 0,049$) (Tabela 7). Por outro lado, a expressão citoplasmática de TLR2 exibiu um efeito protetor, reduzindo o risco em 73% na chance de ter recidiva ($HRa = 0,27$; $IC95\%: 0,09-0,75$; $p = 0,013$) (Tabela 7).

Assim, os demais marcadores imuno-histoquímico examinados (TLR1 citoplasmático, TLR2 estromal e NFkB p65 em seus diversos compartimentos) não apresentaram associação independente e significativa com a recidiva da doença.

Tabela 7 - Análise multivariada de fatores de risco para recidiva em pacientes com CEC orais tratados cirurgicamente em um período de 10 anos.

	p-Valor	HRa	CI95%
Risco de recidiva			

Sexo	0,889	1,03	0,67	1,60
Idade	0,466	0,88	0,61	1,25
Fumo	0,181	1,41	0,85	2,32
Álcool	0,521	0,84	0,50	1,42
pT	0,497	1,17	0,74	1,87
pN	0,218	1,34	0,84	2,11
Estadio clínico	0,774	1,05	0,74	1,51
Localização	0,128	1,33	0,92	1,93
Adjuvância	0,076	0,79	0,61	1,03
TLR1 tumor nuclear	0,000	0,46	0,30	0,71
TLR1 tumor citoplasma	0,742	0,93	0,58	1,47
TLR1 estroma	0,002	2,30	1,36	3,89
TLR2 tumor nuclear	0,049	3,01	1,01	8,99
TLR2 tumor citoplasma	0,013	0,27	0,09	0,75
TLR2 estroma	0,570	0,88	0,57	1,36
NFkB p65 tumor nuclear	0,412	0,85	0,58	1,25
NFkB p65 tumor citoplasma	0,906	0,97	0,55	1,71
NFkB p65 estroma	0,703	1,08	0,73	1,60

*p<0,05, regressão de Cox; aHR = adjusted hazard risk; CI95% = intervalo de confiança 95% da Ahr.

Fonte: elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

O carcinoma espinocelular oral (CEC) é considerado o tipo mais comum de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, estando presente entre os 8 principais tumores malignos mundialmente (GEORGAKI *et al.*, 2021). Este é geralmente encontrado em mais de 90% dos casos de tumores da cavidade oral, com predominância em pacientes do sexo masculino, na quinta e sexta décadas de vida e prevalência em assoalho de boca/língua e em borda lateral de língua (JAGADEESAN *et al.*, 2024).

Os principais fatores de risco descritos na literatura científica são: o tabagismo, o abuso de álcool, os fatores genéticos, como também, as radiações ultravioletas, associadas a ocorrência de câncer de lábio, os tipos oncogênicos de papilomavírus humano (HPV), as

infecções virais, as infecções por *Candida*, as deficiências nutricionais e mascar noz de bétule – comum nos países do sul da Ásia - (JAGADEESAN *et al.*, 2024, LI; DONG; LI, 2024).

No estudo presente, foi possível observar que dos 215 pacientes, 161 (74,9%) eram do sexo masculino, o qual confirma a predominância por esse sexo, sendo 110 pacientes com até 60 anos de idade e dos 215, 123 (57,5%) não fumantes e 150 (70,1%) não etilistas, o qual demonstrou que o fumo e o álcool na pesquisa atual não foram fatores de risco de alta frequência.

Em relação a localização, notou-se que 119 casos (55,3%) foram localizados na língua e 88 casos (40,9%) em assoalho de boca, o que confirma a prevalência do local do CEC por essas regiões anatômicas, tendo o diagnóstico desses casos já em fases mais avançadas, com prevalência do estadiamento clínico IVa em 92 casos (42,8%) e em segundo lugar, o estadiamento III, com 55 casos.

Oliveira *et al.* (2020) descreveram que os principais fatores associados a baixa sobrevida foram pacientes do sexo masculino, com idade ≥ 60 anos, com raça/cor da pele diferente de branca e com a doença em estágio avançado no momento do diagnóstico, ou seja, com os piores estadiamentos clínicos.

Já no estudo atual, os pacientes fumantes foram associados a menor sobrevida livre de doença ($p=0,027$) na análise univariada. Ou seja, o fumo, um importante fator de risco, está relacionado a um pior prognóstico a esses pacientes, porém, na análise multivariada, não se manteve como fator independente ($HR=1,41$; $p=0,181$), assim como o álcool ($HR= 0,84$; $p=0,521$), que também não houve associação significativa em nenhuma análise ($p>0,05$).

Ford e Rich (2021), verificaram que aumenta de 10 a 15 vezes o risco de desenvolver CEC quando o tabaco é consumido sinergicamente com álcool. Este o qual configura-se como um fator de risco independente para o câncer oral, sendo que os indivíduos com ingestão crônica elevada apresentam um risco de até cinco vezes maior de desenvolver a doença em comparação àqueles que não consomem. Já em relação apenas ao uso de tabaco, a probabilidade de desenvolver câncer bucal aumenta em seis vezes (BHARDWAJ; PRASAD; MUKHERJEE, 2024). No nosso estudo, a exposição ao fumo e álcool não foram fatores prognósticos.

No que tange o tratamento, este é de forma multidisciplinar e consiste em três métodos: a cirurgia, na maioria das vezes uma ressecção cirúrgica, a terapia medicamentosa anticâncer (quimioterapia, imunoterapia) e a radioterapia, de formas adjuvantes ou não, a depender do estadiamento clínico e patológico (KITAMURA *et al.*, 2021, LIU *et al.*, 2024). O prognóstico de um em que apresenta a doença ainda em estágio inicial é considerado relativamente bom e favorável, mas na maioria dos casos, cerca de 40 a 60%, os pacientes já apresentam a doença

em estágio avançado no diagnóstico (OLIVEIRA *et al.*, 2020).

Entretanto, na pesquisa atual mostrou-se que os fatores clínicos-patológicos (pT, pN, estadiamento) não foram preditores de sobrevida livre de recidiva do paciente, ou seja, não teve impacto significativo ($p > 0,05$), o que difere de estudos, como Solomon *et al.* (2021) e Kyrgidis *et al.* (2010), na literatura que associam pN+ e estadiamentos TNM avançados como uma baixa sobrevida e consequentemente a um pior prognóstico.

No tocante sobre o tratamento adjuvante, os resultados deste estudo mostraram uma tendência de maior sobrevida nos pacientes submetidos a este tratamento, seja radioterapia isolada (RT) ou associada à quimioterapia (RQT), quando comparados àqueles que não receberam terapias adicionais. Observou-se que pacientes que não receberam tratamento adjuvante apresentaram uma mediana de sobrevida de 12,8 meses (IC95%: 2,58–23,02). Já aqueles submetidos à RT tiveram uma mediana superior, de 20,67 meses (IC95%: 11,57–29,77), enquanto os tratados com RQT alcançaram 19,07 meses (IC95%: 14,28–23,86).

Apesar dessa tendência de melhor sobrevida aos pacientes que tiveram a terapia adjuvante, é importante reforçar a relevância da adjuvância como estratégia terapêutica no carcinoma espinocelular oral, mesmo mostrando a ausência de significância estatística ($p=0,088$).

Acerca dos marcadores imunológicos, sabe-se que o receptor toll like tipo 1 se localiza na superfície celular, o qual se liga e forma um heterodímero com o receptor toll like tipo 2, reconhecendo o ácido lipoteicóico (LTA) e o peptidoglicano (PGN), que são características da parede celular componentes de bactérias Gram-positivas, como também, há uma expressão do TLR2 nos queratinócitos de epitélios displásicos e em células cancerígenas, como o CEC, o carcinoma de células ósseas (ZHANG *et al.*, 2014, IKEHATA *et al.*, 2017).

Com a ativação da heterodimerização do TLR1/2 pela exposição ao ligante específico, o domínio intracelular do TLR desencadeia uma cascata de sinalização intracelular da via dependente de fator de diferenciação mieloide 88 (MyD88) e dos adaptadores da proteína adaptadora contendo o domínio do receptor de interleucina-1 Toll (TIRAP) para sinalização, o qual leva à translocação nuclear do fator de transcrição nuclear (NFkB), com a liberação de citocinas e interleucinas pró-inflamatórias (COLLESELLI; STIERSCHNEIDER; WIESNER, 2023). Ozinsky *et al.* (2000) foram os pioneiros a descobrir que o TLR2 depende da heterodimerização com TLR1 ou TLR6 para iniciar a ativação celular adequada e uma resposta pró-inflamatória.

Com a análise da expressão do TLR1 nuclear com $>2\%$, evidenciou importância prognóstica, já que mostrou-se significativamente associada a uma melhor sobrevida livre de

doença ($p < 0,001$), achado que se manteve robusto na análise multivariada, onde foi confirmada como fator protetor independente ($HR = 0,46$; $p < 0,001$). O que se remete que a presença nuclear do TLR1 pode atuar favorecendo mecanismos de defesa antitumoral, possivelmente ligados à modulação da resposta imune inata e ao reconhecimento de PAMPs, como também, na inibição da proliferação celular e estímulo da apoptose tumoral.

Porém, a expressão estromal de TLR1 $\leq 50\%$ foi associada a um pior prognóstico ($p = 0,013$), resultado também confirmado na análise multivariada como fator de risco independente, o qual aumenta em mais de duas vezes a chance de recidiva ($HR = 2,30$; $p = 0,002$). Esses dados reforçam a ideia de que a localização celular do TLR1 tem impacto distinto no comportamento biológico do tumor, sendo o compartimento estromal um potencial facilitador de processos pró-tumorais, como inibir a apoptose, promover a migração e invasão celular.

Quanto ao TLR2, observou-se que a expressão nuclear até $>2\%$ não apresentou diferença significativa no contexto de prognóstico ($p = 0,215$), porém, confirma-se como fator de risco independente na análise multivariada, com o aumento de três vezes na chance de recidiva da doença ($HR = 3,01$; $p = 0,049$). Em contraste, a expressão citoplasmática de TLR2 $>2\%$ esteve relacionada a melhor sobrevida livre de recidiva ($p = 0,012$), mantendo-se como fator protetor na regressão de Cox por reduzir em aproximadamente 73% o risco de recidiva ($HR = 0,27$; $p = 0,013$). Dessa forma é crucial estudar a questão de compartimentalização celular desses receptores, pois sugere-se que a ativação citoplasmática do TLR2 pode estar associada a respostas imunológicas mais eficazes, enquanto a marcação na localização nuclear pode ser um indicativo para vias que estimulam a progressão tumoral.

Já em relação a expressão estromal de TLR2, não houve significância estatística com a sobrevida, indicando um papel limitado ou irrelevante nesse compartimento específico.

Com relação ao NF κ B p65, a expressão nuclear apresentou uma associação com melhor taxa de sobrevida nas análises univariadas ($p = 0,002$). Já em relação com a expressão em estroma com até 40% também houve uma associação significativa em relação ao melhor prognóstico ($p = 0,024$), porém, nenhum parâmetro desse marcador se manteve significativo na análise multivariada, o que sugere um papel regulador em conjunto com os TLRs, mas não isoladamente.

O fator nuclear kappa B (NF κ B), o qual é degradado e ativado continuamente, é considerado o principal fator transcricional induzido pela ativação da sinalização de TLR, essencial para a coordenação de respostas inflamatórias, como a imunidade inata e a adaptativa, diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016). O NF κ B se liga ao DNA e ocorre sua regulação por meio de duas vias: a via canônica e

via não canônica, os quais controlam rigorosamente os níveis de NFκB transcricionalmente ativo e em resposta a estímulos, a qual ocorre a liberação de numerosas quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8 e prostaglandina E, acelerando ainda mais a resposta inflamatória (MITCHELL; VARGAS; HOFFMANN, 2016, ZHAO *et al.*, 2021).

No entanto, a via NFκB também é conhecida por acelerar a proliferação celular, inibir a apoptose e promover a migração e invasão celular, favorecendo o microambiente tumoral, que possuem células imunes (macrófagos associados a tumores, linfócitos T, neutrófilos associados a tumores, células dendríticas), fibroblastos, vasos sanguíneos, matriz extracelular (MEC) e complexos extracelulares que estão intimamente associados à progressão do cânceres, pois auxiliam na angiogênese (ZHAO *et al.*, 2021, LI; DONG; LI, 2024).

Ademais, a via NFκB pode ser ativada não apenas por infecções virais e bacterianas, mas também por componentes celulares necróticos e citocinas pró-inflamatórias liberadas durante a resposta imune, como IL-1, que interagem com receptores de membrana, a exemplo dos TLRs (ZHAO *et al.*, 2021). De maneira desregulada, essa cascata contribui também para a proliferação celular exacerbada e a ativação de metaloproteinases, favorecendo migração e invasão, elementos os quais são amplamente descritos na literatura como determinantes da progressão tumoral (TANIGUCHI; KARIN, 2018).

Dessa forma, os efeitos mediados pela via de sinalização NFκB parecem depender diretamente do tipo e da intensidade do estímulo inicial, o que reforça sua relevância tanto na resposta imune quanto na progressão neoplásica, pois no presente estudo sugere que esse mecanismo é particularmente relevante no CEC, já que uma vez a expressão nuclear de TLR1 e TLR2 apresentou impacto prognóstico distinto, modulando positivamente ou negativamente a sobrevida conforme o padrão de expressão.

Além disso, a associação entre os TLRs e NFκB observada neste estudo reforça a hipótese de que a ativação dessa via não atua de forma isoladamente, mas sim em conjunto, dependendo do microambiente tumoral e do compartimento celular envolvido (tumoral ou estromal).

Apesar das limitações deste estudo de ter na análise, os resultados reforçam o potencial que o TLR1 e TLR2 possuem em serem biomarcadores prognósticos no carcinoma espinocelular oral e destacam a importância da localização subcelular para a interpretação de sua função biológica.

6 CONCLUSÃO

A expressão nuclear de TLR1 >2% configurou-se como fator protetor independente,

enquanto a expressão estromal $\leq 50\%$ foi associada a pior prognóstico. Para o TLR2, a expressão nuclear se mostrou fator de risco independente, ao passo que a expressão citoplasmática $>2\%$ atuou como fator protetor.

Assim, a expressão de TLR1 e TLR2 parecem desempenhar um papel crucial na progressão do carcinoma espinocelular oral e sua avaliação pode ser relevante para o prognóstico e manejo clínico da doença, já que podem ser considerados como biomarcadores de prognósticos e auxiliar em futuras terapias contra o câncer, como a ligação de agonistas de TLR em serem investigados para o tratamento de células cancerígenas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, Abul K.; LICHTMAN, Andrew H.; PILLAI, Shiv. **Imunologia celular e molecular**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.
- AIRLEY, R *et al.* Glucose transporter Glut-1 is detectable in peri-necrotic regions in many human tumor types but not normal tissues: Study using tissue microarrays. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, v. 192, n. 3, p. 133-138, 2010.
- ALI, A *et al.* Differential expression of Toll-like receptors in chronic hyperplastic candidosis. **Oral Microbiol Immunol**, Singapore, v. 23, p. 299-307, set. 2008.
- ARANCIBIA, S A *et al.* Toll-like Receptors are key participants in innate immune responses. **Biol Res**, v. 40, n. 2, p. 97-112, 2007.
- BAUER, A K *et al.* Toll-Like Receptor 4 in Butylated Hydroxytoluene–Induced Mouse Pulmonary Inflammation and Tumorigenesis. **Jnci: Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 23, p. 1778-1781, 7 dez. 2005.
- BOSETTI, C *et al.* Global trends in oral and pharyngeal cancer incidence and mortality. **International Journal Of Cancer**, v. 147, n. 4, p. 1040-1049, 30 jan. 2020.
- BHARDWAJ, Ananya; PRASAD, Divya; MUKHERJEE, Sayali. Role of toll-like receptor in the pathogenesis of oral cancer. **Cell biochemistry and biophysics**, v. 82, n. 1, p. 91–105, 2024.
- BURDELYA, L G *et al.* Toll-like Receptor 5 Agonist Protects Mice From Dermatitis and Oral Mucositis Caused by Local Radiation: implications for head-and-neck cancer radiotherapy. **International Journal Of Radiation Oncology*Biology*Physics**, v. 83, n. 1, p. 228-234, maio 2012.
- CHEFETZ, I *et al.* TLR2 enhances ovarian cancer stem cell self-renewal and promotes tumor repair and recurrence. **Cell Cycle**, v. 12, n. 3, p. 511-521, fev. 2013.
- COLLESELLI, K.; STIERSCHNEIDER, A.; WIESNER, C. An Update on Toll-like Receptor 2, Its Function and Dimerization in Proand Anti-Inflammatory Processes. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 12464, 2023. DOI: 10.3390/ijms241512464.
- DANTAS, T *et al.* Role of inflammatory markers in prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, v. 20, n. 12, p. 3635, 2019.
- DE OLIVEIRA FILHO, O V *et al.* Mismatch Repair Proteins in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Observational Study. **Head and Neck Pathology**, v. 15, n. 3, p. 803-816, 2021.
- FERRAZ, E G *et al.* Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. **Rgo - Rev Gaúcha Odontol**, Porto Alegre, v. 59, n. 3, p. 483-490, jul. 2011.
- FORD, Pauline J.; RICH, Alison M. Uso de tabaco e saúde bucal. **Dependência (Abingdon, Inglaterra)**, v. 116, n. 12, p. 3531–3540, 2021.

- GALLO, Camila de Barros *et al.* Toll-like receptor 2 rs4696480 polymorphism and risk of oral cancer and oral potentially malignant disorder. **Archives Of Oral Biology**, v. 82, p. 109-114, out. 2017.
- GEORGAKI, Maria *et al.* Compreendendo a complexa patogênese do câncer bucal: uma revisão abrangente. **Cirurgia oral, medicina oral, patologia oral e radiologia oral**, v. 132, n. 5, p. 566–579, 2021.
- GOWING, S D *et al.* Toll-like receptors: exploring their potential connection with post-operative infectious complications and cancer recurrence. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 37, n. 2, p. 225-239, 23 jan. 2020.
- IKEHATA, N *et al.* Toll-like receptor 2 activation implicated in oral squamous cell carcinoma development. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 2017. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.12.098.
- JAGADEESAN, Dharshini *et al.* Insights abrangentes sobre carcinoma espinocelular oral: diagnóstico, patogênese e avanços terapêuticos. **Patologia, pesquisa e prática**, v. 261, n. 155489, p. 155489, 2024.
- JAVAID, N; CHOI, S. Toll-like Receptors from the Perspective of Cancer Treatment. **Cancers**, v. 12, n. 2, p. 297, 27 jan. 2020.
- KAWAI, T; AKIRA, S. O papel dos receptores de reconhecimento de padrões na imunidade inata: atualização sobre os receptores Toll-like. **Imunologia da natureza**, v. 11, n. 5, pág. 373-384, 2010.
- KIM, S *et al.* Carcinoma-produced factors activate myeloid cells through TLR2 to stimulate metastasis. **Nature**, v. 457, n. 7225, p. 102-106, jan. 2009.
- KITAMURA, N *et al.* Tendências atuais e perspectivas futuras da terapia molecular direcionada ao carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. **Revista Internacional de Ciências Moleculares**, v. 22, n. 1, p. 240, 2020.
- KUMAR, H; KAWAI, T; AKIRA, S. Toll-like receptors and innate immunity. **Biochemical And Biophysical Research Communications**, v. 388, n. 4, p. 621-625, out. 2009.
- KYLMÄ, Anna Kaisa *et al.* In HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma, elevated toll-like receptor 2 immunoexpression may increase the risk of disease-specific mortality. **Oral Oncology**, v. 107, 104778, ago. 2020.
- KYRGIDIS, A *et al.* Cutaneous squamous cell carcinoma (SCC) of the head and neck: risk factors of overall and recurrence-free survival. **European Journal of Cancer**, v. 46, n. 9, p. 1563–1572, jun. 2010.
- LI, Chenxi; DONG, Xiaodan; LI, Bo. Microambiente tumoral no carcinoma espinocelular oral. **Frontiers in immunology**, v. 15, p. 1485-174, 2024.
- LIU, C *et al.* Tumor microenvironment and immunotherapy of oral cancer. **Eur J Med Res**,

v. 27, n. 1, p. 198, 8 out. 2022.

LIU, C *et al.* SPP1+ macrophages promote head and neck squamous cell carcinoma progression by secreting TNF- α and IL-1 β . **Journal of experimental & clinical cancer research: CR**, v. 43, n. 1, p. 332, 2024.

LU, H *et al.* Polysaccharide Krestin Is a Novel TLR2 Agonist that Mediates Inhibition of Tumor Growth via Stimulation of CD8 T Cells and NK Cells. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 67-76, 1 jan. 2011.

LYDIATT, W *et al.* Head and neck cancers—major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 2, p. 122-137, 2017.

MÄKINEN, L K *et al.* Toll-like receptors 2, 4, and 9 in primary, metastasized, and recurrent oral tongue squamous cell carcinomas. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 45, n. 5, p. 338–345, 2015.

MCGETTRICK, A F; O'NEILL, L A. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. **Current Opinion In Immunology**, v. 22, n. 1, p. 20-27, fev. 2010.

MCINTURFF, J E.; MODLIN, R L.; KIM, J. The role of toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological diseases. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 125, n. 1, pg. 1-8, 2005.

MIRANDA-FILHO, A; BRAY, F. Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth. **Oral Oncology**, v. 102, p. 104551, mar. 2020.

MITCHELL, S.; VARGAS, J.; HOFFMANN, A. Signaling via the NF κ B system. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 227-241, maio 2016.

ÖHLSCHLÄGER, P *et al.* The combination of TLR-9 adjuvantation and electroporation-mediated delivery enhances in vivo antitumor responses after vaccination with HPV-16 E7 encoding DNA. **International journal of cancer**, v. 128, n. 2, p. 473-481, 2011.

OLIVEIRA, LL *et al.* Fatores prognósticos associados à sobrevida global em pacientes com carcinoma espinocelular da cavidade oral. **Medicina oral, patologia oral e cirurgia bucal**, p. e523–e531, 2020.

OZINSKY, A *et al.* The Repertoire for Pattern Recognition of Pathogens by the Innate Immune System Is Defined by Cooperation between Toll-like Receptors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 13766-13771, 2000.

PARK, Jong-Hwan *et al.* Activation of TLR2 and TLR5 did not affect tumor progression of an oral squamous cell carcinoma, YD-10B cells. **Journal Of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 10, p. 781-785, 29 abr. 2010.

PISANI, L P; ESTADELLA, D; RIBEIRO, D A. The Role of Toll Like Receptors (TLRs) in Oral Carcinogenesis. **Anticancer Research**, v. 37, n. 10, p. 5389-5394, 3 out. 2017.

SO, E Y; OUCHI, T. The application of Toll-like receptors in cancer therapy. *International journal of biological sciences*, v. 6, no. 7, p. 675, 2010.

SOLOMON, J *et al.* The impact of close surgical margins on recurrence in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Otolaryngology - Head & Neck Surgery**, v. 50, n. 1, p. 9, 2021.

TANIGUCHI, K.; KARIN, M. NF-kappaB, inflamação, imunidade e câncer: amadurecimento. **Nature Reviews Immunology**, v. 18, p. 309-324, 2018. DOI: 10.1038/nri.2017.142.

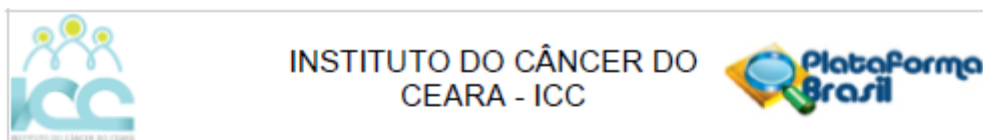
VAN TONGEREN, J *et al.* Synergy between TLR-2 and TLR-3 signaling in primary human nasal epithelial cells. **Immunobiology**, v. 220, n. 4, p. 445-451, abr. 2015. DOI: 10.1016/j.imbio.2014.11.004.

ZHANG, J *et al.* Toll-like receptor recognition of bacteria in fish: ligand specificity and signal pathways. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 41, n. 2, p. 380-388, dez. 2014.

ZHAO, H et al. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 263, jul. 2021.

ZHU, J; MOHAN, C. Toll-Like Receptor Signaling Pathways—Therapeutic Opportunities. **Mediators Of Inflammation**, v. 2010, p. 1-7, 2010.

ANEXO A - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência do microambiente tumoral e do perfil imune-inflamatório na carcinogênese e prognóstico dos cânceres de boca e orofaringe

Pesquisador: Paulo Goberlânio de Barros Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 53182521.3.0000.5528

Instituição Proponente: Instituto do Cancer do Ceara

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.100.277

Apresentação do Projeto:

O câncer oral é uma neoplasia maligna que ocorre no lábio ou cavidade oral e mais de 90% dessas lesões têm origem nas células escamosas, sendo então diagnosticado como Carcinoma de Células Escamosas (CCE) ou Carcinoma Epidermóide. A etiologia é multifatorial e altamente complexa em que as células epiteliais sofrem diversas modificações. Alterações genéticas e epigenéticas são os principais eventos que estão relacionados ao processo de carcinogênese. Mas, uma vez que o tumor inicial estabelece sua relação com os tecidos adjacentes, aumenta a agressividade da doença. Consequentemente há extrema necessidade de uma melhor compreensão acerca dos componentes imunes a progressão da doença, prognóstico ou estratificação. Uma descrição detalhada acerca do microambiente tumoral (MT) e suas diversas interações, incluindo a heterogeneidade potencial de composição e distribuição espacial de seus diferentes componentes é fundamental para a escolha e resposta eficaz ao tratamento. Para isso, serão selecionadas 48 amostras de epitélio intraorais sem alterações microscópicas, 48 amostras de displasia oral e 240 amostras de CCE intraoral.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a influência do perfil de imunoexpressão de células do microambiente tumoral e imune-inflamatório no prognóstico de pacientes com carcinoma de células escamosas oral.

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222		
Bairro: RODOLFO TEÓFILO		CEP: 60.430-230
UF: CE	Município: FORTALEZA	
Telefone: (85)3022-1650	Fax: (85)3022-1650	E-mail: cep.icc@fjf.edu.br



INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 5.100.277

Objetivo Secundário:

• Caracterizar retrospectivamente o perfil sociodemográfico e clínico-prognóstico de pacientes com carcinoma de células escamosas oral, diagnosticados e tratados em uma instituição terciária de referência nacional. • Caracterizar o perfil de imunomarcagem para o fenótipo macrófágico (CD68, CD64, CD23) em tecidos de carcinoma de células escamosas oral, lesões potencialmente malignas e tecido oral sem alterações microscópicas. • Caracterizar o perfil de imunomarcagem para o fenótipo linfocítico (CD3, CD8, Fas, FasL, Granzima B e FoxP3) em tecidos de carcinoma de células escamosas oral, lesões potencialmente malignas e tecido oral sem alterações microscópicas. • Caracterizar o perfil de imunomarcagem para a via JAK/STAT/IL6 tecidos de carcinoma de células escamosas oral, lesões potencialmente malignas e tecido oral sem alterações microscópicas. • Caracterizar o perfil de imunomarcagem de morte/proliferação tumorais (Ki67, Caspase-3) em tecidos de carcinoma de células escamosas oral, lesões potencialmente malignas e tecido oral sem alterações microscópicas. • Avaliar a influência da imunexpressão de marcadores fenotípicos de macrófagos, linfócitos e de morte/proliferação tumorais em características clínico-patológicas e na sobrevida global de pacientes com carcinoma de células escamosas oral. • Avaliar a interassociação entre a imunexpressão de CD68, CD64, CD23, CD3, CD8, Fas, FasL, Granzima B, Ki67, Caspase-3, FoxP3, JAK/STAT/IL6.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos são pertinentes ao manuseio de prontuários e informações que devem ser resguardadas, uma vez que, o acesso a essas informações pode consistir em divulgação dos dados de pacientes sem autorização. Entretanto, todas as metodologias aplicadas serão supervisionadas pela chefe de serviço do biobanco, bem como os pesquisadores assumem total compromisso de seguir as normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos do Conselho Nacional de Saúde de acordo com a resolução 466/12.

Benefícios:

A imunocaracterização de doenças malignas humanas tem proporcionado uma melhor compreensão acerca da progressão da doença, prognóstico e possibilidade de tratamento. Dessa forma, o presente estudo estima ampliar e especificar o conhecimento a respeito do desempenho do microambiente tumoral e do perfil imune-inflamatório. A vista disso, seus achados podem auxiliar no desenvolvimento de alvos terapêuticos, inibindo a progressão tumoral ou até mesmo estimulando a resposta imune do hospedeiro, proporcionando assim, uma maior sobrevida ao

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222
Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.430-230
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3022-1650 Fax: (85)3022-1650 E-mail: cep.icc@frit.edu.br



INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 5.100.277

paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo quantitativo, observacional, de corte longitudinal, e de natureza retrospectiva no qual serão selecionados os dados dos pacientes diagnosticados/tratados com carcinoma de células escamosas oral, no período de 1º de janeiro de 2015 a 31 de dezembro de 2020 no Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), um Centro de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (CACON) no Nordeste Brasileiro.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Cronograma e Parecer de Apreciação de Projeto de Pesquisa - Comitê Técnico Científico - FRT/HHJ/ICC adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Folha de rosto não está assinada pela instituição proponente.

Termo de depositário fiel também não está com assinaturas corretamente.

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado deste CEP acompanha o parecer do relator mantendo o projeto pendente até que as pendências sejam corrigidas.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P ROJETO_1841038.pdf	09/11/2021 18:02:46		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_Pesquisa.pdf	09/11/2021 18:01:38	Dayrine de Paula	Aceito
Outros	PARECER_TECNICO_aprovado.pdf	09/11/2021 18:00:11	Dayrine de Paula	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	09/11/2021 17:58:18	Dayrine de Paula	Aceito
Outros	TERMO_FIEL_DEPOSITARIO.pdf	09/11/2021 17:57:45	Dayrine de Paula	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	09/11/2021 17:53:33	Dayrine de Paula	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto_Assinado.pdf	09/11/2021 17:44:45	Dayrine de Paula	Aceito

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222
 Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.430-230
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3022-1650 Fax: (85)3022-1650 E-mail: cep.icc@frrt.edu.br



INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 5.100.277

Situação do Parecer:

Pendente

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FORTALEZA, 11 de Novembro de 2021

Assinado por:

Marcelo Gurgel Carlos da Silva
(Coordenador(a))

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222

Bairro: RODOLFO TEÓFILO

CEP: 60.430-230

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (85)3022-1650

Fax: (85)3022-1650

E-mail: cep.icc@frr.edu.br