



**UNIVERSIDADE CHRISTUS**

**MESTRADO EM CIÊNCIAS ODONTOLÓGICAS**

**CORRELAÇÃO ENTRE A IMUNO-EXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIOIDES  
COM A SOBREVIDA DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS DE OROFARINGE**

**ANA MIRIAN DA SILVA CAVALCANTE**

**FORTALEZA**

**2026**

ANA MIRIAN DA SIVA CAVALCANTE

CORRELAÇÃO ENTRE A IMUNO-EXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIOIDES COM A  
SOBREVIDA DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE  
OROFARINGE

Dissertação do curso de Mestrado em Ciências  
Odontológicas apresentado a Universidade Christus  
como requisito parcial para obtenção do título de  
mestra em odontologia  
Orientadora: Dra. Thinali Sousa Dantas

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)

C376c Cavalcante, Ana Mirian da Silva.  
Correlação entre a imuno-expressão de receptores opioides com a  
sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas de  
orofaringe / Ana Mirian da Silva Cavalcante. - 2026.  
38 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) - Centro Universitário Christus -  
Unichristus, Mestrado em Ciências Odontológicas, Fortaleza, 2026.  
Orientação: Profa. Dra. Thinali Sousa Dantas.  
Área de concentração: Ciências Odontológicas.

1. Carcinoma de células escamosas de orofaringe. 2. Receptores  
opíoides. 3. Sobrevida. 4. Imuno-histoquímica. I. Título.

CDD 617.6

ANA MIRIAN DA SIVA CAVALCANTE

CORRELAÇÃO ENTRE A IMUNO-EXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIOIDES COM A  
SOBREVIDA DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE  
OROFARINGE

Dissertação do curso de Mestrado em Ciências  
Odontológicas apresentado a Universidade Christus  
(Unichristus) como requisito parcial para obtenção  
do título de mestra em odontologia  
Área de concentração: Patologia Oral e  
Estomatologia  
Orientadora: Dra. Thinali Sousa Dantas

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

---

Prof.Dra Thinali Sousa Dantas  
Universidade Christus (Unichristus)

---

Prof. Dr. Paulo Goberlânio Barros Silva  
Universidade Christus (Unichristus)

---

Prof. Dra. Maria Júlia Barbosa Bezerra  
Instituto do Câncer do Ceará/Hospital Haroldo Juaçaba (ICC)

Dedico este trabalho, primeiramente, a Deus, por me conceder força, sabedoria e perseverança ao longo de toda essa jornada. Aos meus pais e meu irmão, pelo amor, apoio e incentivo constantes. Aos professores, pela orientação, ensinamentos e contribuições fundamentais para minha formação. E aos amigos que estiveram ao meu lado, tornando esse caminho mais leve e possível

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por seu infinito amor e por me conceder força, saúde e perseverança para superar os desafios e concluir esta etapa.

Aos meus pais, Nilton e Edna Cavalcante, pelo amor, apoio e cuidado constantes, e ao meu irmão, Natanael Cavalcante, pelo amor expresso em gestos diários de cuidado e incentivo ao longo dessa jornada. Sou profundamente grata pela família amorosa que sempre me ofereceu suporte e tranquilidade para que eu pudesse me dedicar aos estudos. Esta conquista é nossa.

Aos amigos que caminharam comigo em diferentes fases da vida, pelo incentivo, orações, apoio e amizade, tornando essa trajetória mais leve. Meu carinho especial a Renan Pessoa, Gabriel Carvalho, Thayla Marla, Géssica Ponciano, Tayane Gonçalves, Suely Bezerra, bem como a todos os colegas de turma, pela parceria e pelos momentos compartilhados.

Aos alunos de iniciação científica do grupo da professora Thinali, especialmente Erick Ibrahim, Cássia Fernandes, Wesley Nilson, Antônio Lucas e Isabelle Frota, pela convivência e pela troca de aprendizados, que contribuíram também para meu crescimento como docente.

Agradeço à doutoranda Maria Clara Aragão, ao mestrando Isaac Muller e à doutoranda Liova Chabot pela colaboração fundamental na etapa final deste trabalho, tornando possível sua conclusão dentro do prazo.

À minha orientadora, Dra. Thinali Dantas, pela confiança, orientação e pelas oportunidades acadêmicas e profissionais que contribuíram significativamente para meu crescimento pessoal e profissional.

Aos professores da banca examinadora, Paulo Goberlânio e Maria Júlia Bezerra, pelas valiosas contribuições e disponibilidade para avaliação deste trabalho.

Agradeço ainda à Universidade Christus, aos professores e coordenação do programa de mestrado e à FUNCAP pela bolsa concedida, que possibilitou maior dedicação à pesquisa. Meus sinceros agradecimentos!

## EPÍGRAFE

“Todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus, daqueles que são chamados segundo o seu propósito.”

(Romanos 8:28)

## RESUMO

O carcinoma de orofaringe apresenta comportamento biológico heterogêneo, influenciado por fatores moleculares e pelo status viral, frequentemente determinado pela expressão de p16, marcador substituto da infecção pelo HPV. Este estudo teve como objetivo avaliar a expressão de receptores opioides e sua associação com o prognóstico e características clínico-patológicas do carcinoma de células escamosas de orofaringe. Foram analisadas 85 amostras tumorais por imunohistoquímica, investigando-se a expressão de receptores opioides, Ki-67 e NFkB, com posterior correlação com dados clínicos e status p16. A análise estatística foi realizada no software SPSS, aplicando-se os testes de Kolmogorov-Smirnov, Mann-Whitney, Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunn e correlação de Spearman. Os resultados demonstraram índices de positividade para receptores opioides nas amostras avaliadas, além de diferenças nas interações entre os marcadores conforme o status viral. Observou-se correlação positiva entre a expressão dos receptores opioides e o índice proliferativo avaliado pelo Ki-67, sugerindo associação com maior atividade celular. Também foram identificadas correlações entre receptores opioides e NFkB, indicando interação com vias inflamatórias relacionadas à progressão tumoral. A análise conforme o status p16 evidenciou padrões distintos de associação entre proliferação e inflamação, indicando diferenças biológicas entre tumores HPV-positivo e negativo. Fatores clínicos como uso de álcool, modalidade de tratamento e estadiamento não apresentaram impacto significativo na sobrevida livre de recorrência. Os achados sugerem que receptores opioides, proliferação celular e vias inflamatórias atuam de forma integrada na biologia do carcinoma de orofaringe, contribuindo para a compreensão da progressão tumoral e para a identificação de potenciais alvos prognósticos e terapêuticos.

**Palavras-chave:** carcinoma de células escamosas de orofaringe; receptores opioides; sobrevida; imuno-histoquímica.

## ABSTRACT

Oropharyngeal carcinoma exhibits heterogeneous biological behavior influenced by molecular factors and viral status, commonly determined by p16 expression, a surrogate marker of HPV infection. This study aimed to evaluate opioid receptor expression and its association with prognosis and clinicopathological characteristics of oropharyngeal squamous cell carcinoma. A total of 85 tumor samples were analyzed by immunohistochemistry to assess the expression of opioid receptors, Ki-67, and NF- $\kappa$ B, followed by correlation with clinical data and p16 status. Statistical analysis was performed using SPSS software, applying Kolmogorov–Smirnov, Mann–Whitney, Kruskal–Wallis with Dunn’s post hoc test, and Spearman correlation tests. The results demonstrated positivity indices for opioid receptors in the analyzed samples, as well as differences in marker interactions according to viral status. A positive correlation was observed between opioid receptor expression and the proliferative index assessed by Ki-67, suggesting an association with increased cellular activity. Correlations were also identified between opioid receptors and NF- $\kappa$ B, indicating interaction with inflammatory pathways related to tumor progression. Analysis according to p16 status revealed distinct patterns of association between proliferation and inflammation, indicating biological differences between HPV-positive and HPV-negative tumors. Clinical factors such as alcohol consumption, treatment modality, and tumor stage showed no significant impact on recurrence-free survival. These findings suggest that opioid receptors, cellular proliferation, and inflammatory pathways act in an integrated manner in the biology of oropharyngeal carcinoma, contributing to the understanding of tumor progression and to the identification of potential prognostic and therapeutic targets.

**Key words:** oropharyngeal squamous cell carcinoma; opioid receptors; survival; immunohistochemistry.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

CCEO: Carcinoma de células escamosas de orofaringe

HPV: Papiloma Vírus Humano

SNC: Sistema Nervoso Central

SNP: Sistema Nervoso periférico

RO: Receptores opioides

OGRF: Fator de crescimento de receptor opioide

HHJ/ICC: Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
<b>1.1</b>	<b>Carcinoma de células escamosas oral e de orofaringe.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2</b>	<b>Receptores opioides.....</b>	<b>15</b>
<b>1.3</b>	<b>Receptores opioides e progressão tumoral.....</b>	<b>15</b>
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>16</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>16</b>
<b>3.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>21</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>31</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>35</b>

## INTRODUÇÃO

### 1.1 Carcinoma de Células Escamosas de Orofaringe

O câncer ainda se constitui como um dos principais desafios de saúde em todo o mundo e levanta grandes preocupações, uma vez que apresenta altas taxas de incidência e mortalidade. A doença é a segunda causa que mais leva ao óbito, ultrapassada somente pelas doenças cardiovasculares, e foi responsável, em 2020, por cerca de 10 milhões de mortes (OMS, 2022).

No Brasil, estima-se que, para o triênio 2026 a 2028, ocorram cerca de 781 mil novos casos de câncer por ano. Quando excluídos os tumores de pele não melanoma, são estimados aproximadamente 518 mil casos anuais. Dentre esses, o câncer de cavidade oral e orofaringe figura entre as neoplasias mais frequentes, com cerca de 17 mil novos casos por ano no país. (INCA, 2026).

O Carcinoma de Células Escamosas de Orofaringe (CCEO) é o tumor maligno mais recorrente na orofaringe. O tabagismo e o etilismo são importantes fatores de risco para o desenvolvimento dessa neoplasia (MACHIELS *et al.*, 2020; LECHNER *et al.*, 2022; SHINOMIYA; NIBU, 2023). Além disso, a infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) foi identificada como um fator carcinogênico significativo para o CCEO (MORK *et al.*, 2001). Os principais sítios de infecção do CCEO são a base da língua, tonsilas palatinas e linguais, úvula e paredes da orofaringe (PANARESE *et al.*, 2019; LECHNER *et al.*, 2022; LIM *et al.*, 2023). No CCEO relacionado ao HPV, os principais locais anatômicos são as tonsilas palatinas e base da língua (LECHNER *et al.*, 2022; SHINOMIYA; NIBU, 2023).

O HPV-16 representa cerca de 85% dos casos de CCEO relacionados ao HPV, tendo alta predileção por queratinócitos. A infecção pelo vírus se estabelece na camada basal do epitélio, facilitada por microabrasões teciduais ou pela natureza reticulada do epitélio das criptas tonsilares (LECHNER *et al.*, 2022). Os oncogenes virais E6 e E7 inativam proteínas reguladoras do ciclo celular, como p53 e pRb, promovendo a proliferação descontrolada e a imortalização dos queratinócitos (LECHNER *et al.*, 2022; SHINOMIYA; NIBU, 2023; LIM *et al.*, 2023).

A etiologia do câncer é multifatorial, com tabaco e álcool sendo os principais fatores associados. Outros fatores incluem dieta pobre em frutas e verduras, infecção por HPV, imunossupressão, exposição solar (para câncer de lábio) e lesões potencialmente malignas (NEVILLE, 2025). No caso do CCEO, a prática de sexo oral desprotegido aumenta o risco de infecção por HPV. A doença é mais prevalente em homens, mas recentemente tem-se observado um aumento significativo em mulheres (LECHNER *et al.*, 2022).

O diagnóstico do CCEO é realizado por análise histopatológica através de biópsia. Microscopicamente, as células escamosas epiteliais malignas formam ilhas e cordões invasivos que invadem o epitélio e o tecido conjuntivo, induzindo uma intensa resposta inflamatória e destruição de células saudáveis e vasos sanguíneos (NEVILLE, 2025). A classificação histopatológica do CCEO varia de graus I a IV, dependendo da diferenciação celular, sendo o grau mais elevado associado a pior prognóstico (NEVILLE, 2026; LOURENÇO *et al.*, 2007). O sistema de classificação TNM é amplamente utilizado para descrever a extensão anatômica dos tumores, ajudando no diagnóstico, tratamento e prognóstico (INCA, 2022; SANTOS *et al.*, 2022).

Clinicamente, o CCEO apresenta lesões variadas, como ulceradas, exofíticas, endofíticas, leucoplásicas, eritroplásicas, leucoeritroplásicas e verrucosas (SANTOS *et al.*, 2022). No CCEO, massas no pescoço e dor de garganta são sintomas comuns, especialmente em casos associados ao HPV, onde as massas cervicais císticas são frequentes devido a metástases linfonodais (MACHIELS *et al.*, 2020; SHINOMIYA; NIBU, 2023).

O CCEO é frequentemente diagnosticado em estágios avançados e apresenta elevado potencial metastático cervical. Entretanto, tumores associados ao HPV demonstram melhor resposta ao tratamento e prognóstico mais favorável quando comparados aos tumores HPV negativos (NEVILLE, *et al* 2025). O diagnóstico tardio e a pior evolução clínica têm sido associados a barreiras de acesso aos serviços de saúde, baixa conscientização populacional sobre o câncer bucal e limitações no reconhecimento precoce de lesões potencialmente malignas por profissionais de saúde (MENDES *et al.*, 2020).

## 1.2 Receptores Opioides

O ópio é uma substância extraída da planta papoula *Papaver somniferum* e interage com os receptores opioides presentes no Sistema Nervoso Central (SNC) e no Sistema Nervoso Periférico (SNP). Os opioides podem ser naturais ou sintéticos. Eles apresentam ações analgésicas, supressora de tosse, sedativas e reduz a motilidade gastrointestinal, no entanto, podem apresentar efeitos adversos tais como a dependência (vício) e depressão respiratória que pode causar a morte. (VEARRIER *et al* 2021)

Os opioides são analgésicos potentes usados para tratamento de dor aguda e crônica, a morfina foi o primeiro opióide a ser isolado em 1809 por Friedrich Sertürner. Atualmente, a morfina e o fentanil, ambos opioides sintéticos são amplamente prescritos (ZHUANG *et al* 2022)

Os opioides interagem com os receptores opioides (RO) endógenos presentes no SNC e no SNP e estão acoplados à proteína G. Os receptores são nomeados com letras

gregas, sendo os receptores considerados clássicos: Mu ( $\mu$ ), Kappa ( $\kappa$ ), Delta ( $\delta$ ) e os receptores não clássicos: sigma ( $\sigma$ ), épsilon ( $\epsilon$ ) e Nociceptina também chamada de Orfanina. Esses receptores são normalmente estimulados por peptídeos endógenos (endorfinas, encefalinas e dinorfinas) produzidos em resposta à estimulação nociva. (STEIN, 2016)

Os receptores Mu estão localizados principalmente no tronco cerebral e no tálamo medial. Eles são responsáveis por vários efeitos, incluindo analgesia supraespinhal, depressão respiratória, euforia, sedação, diminuição da motilidade gastrointestinal e dependência física. Existem dois subtipos principais de receptores Mu: Mu1 e Mu2. O subtipo Mu1 está relacionado à analgesia, euforia e serenidade, enquanto o Mu2 está associado à depressão respiratória, prurido, liberação de prolactina, dependência, anorexia e sedação. Esses receptores também são conhecidos como OP3 ou MOR (receptores opioides de morfina). (PAUL *et al* 2021)

Os receptores Kappa ( $\gamma$ ) são encontrados nas áreas límbica e diencefálica, no tronco encefálico e na medula espinhal e são responsáveis pela analgesia espinhal, sedação, dispneia, dependência, disforia e depressão respiratória. Estes também são conhecidos como OP2 ou KOR (receptores opioides kappa) (BRACE TUTT *et al* 2020).

Já os receptores Delta ( $\delta$ ) estão localizados principalmente nos núcleos pontinos, amígdalas, bulbo olfatório, córtex cerebral profundo e neurônios sensitivos periféricos. São responsáveis pela analgesia, humor, motilidade gastrointestinal, comportamento e regulação cardiovascular. (PAUL *et al* 2021)

Os receptores Sigma ( $\gamma$ ) também estão amplamente distribuídos pelo SNC e SNP, com vários subtipos e são responsáveis por efeitos psicomiméticos. (GUITART *et al* 2004). O receptor nociceptina/orfanina, também conhecido como receptor ORL-1 ou NOP, difere estrutural e funcionalmente dos receptores opioides clássicos. Suas funções podem ser tanto antinociceptivas (alívio da dor) quanto pronociceptivas (aumento da dor), dependendo da localização e do contexto de sua ativação. Além disso, regula o humor e desempenha um papel crucial no aprendizado, na memória e no comportamento alimentar, influenciando a ingestão de alimentos e a regulação do peso corporal (LAMBERT *et al* 2008)

### **1.3 Receptores Opioides e Progressão tumoral**

A relação entre a imunexpressão de receptores opioides e a carcinogênese ainda não foi completamente elucidado, bem como a literatura ainda carece de estudos que analisa a relação da imunexpressão de ROs e o prognóstico e sobrevida de pacientes com câncer de orofaringe. Por conseguinte, tem se observado grande interesse da comunidade científica a

estudar mais sobre os mecanismos de ação dos opioides na progressão tumoral (DANTAS, 2021; DANTAS *et al.*, 2023).

Há diversos relatos na literatura de expressão de MOR e KOR em diversas linhagens de cânceres, no entanto, as implicações na carcinogênese e no prognóstico tumoral é controversa, principalmente relacionados aos efeitos da morfina na carcinogênese e no microambiente tumoral. Há relatos que os receptores MOR e KOR tem funções antagônicas de indução de resposta mais pró-inflamatória e anti-inflamatória, respectivamente (DE SOUSA *et al.*, 2021).

Em carcinomas escamosos da cavidade oral e lesões potencialmente malignas, foi observada associação entre expressão de receptores opioides e atividade proliferativa celular, incluindo correlação entre MOR e Ki67, além de associação entre suprarregulação citoplasmática de KOR e pior sobrevida global (DANTAS, 2021). Considerando a semelhança histopatológica entre carcinomas orais e de orofaringe, esses achados sugerem possível participação dos receptores opioides também na progressão do CCEO.

Estudos experimentais indicam que a ativação do receptor  $\mu$ -opioide pode estimular proliferação celular, angiogênese e sobrevivência tumoral, enquanto a ativação do receptor  $\kappa$ -opioide pode apresentar efeitos antiproliferativos em determinados contextos (ZHOU *et al.*, 2022). Em carcinomas de cabeça e pescoço, incluindo tumores de orofaringe, a ativação de MOR também tem sido associada a mecanismos relacionados à progressão tumoral e possível interferência na resposta terapêutica (LEVI *et al.*, 2023).

Apesar desses achados, ainda são limitados os estudos especificamente direcionados ao papel dos receptores opioides no carcinoma de células escamosas de orofaringe, reforçando a necessidade de investigações adicionais para melhor compreensão de sua influência na progressão tumoral e no prognóstico desses pacientes.

Em conjunto, as evidências disponíveis sugerem que a sinalização mediada por receptores opioides pode influenciar processos como proliferação celular, angiogênese, invasão tumoral e resistência à apoptose. Contudo, o impacto específico desses mecanismos no CCEO ainda não está totalmente estabelecido. A melhor compreensão dessa interação poderá contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais seguras e individualizadas no manejo desses pacientes.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar a correlação entre a imuno-expressão de receptores opioides com a sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas de orofaringe

### **2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS**

- Avaliar a influência da imuno-expressão dos receptores Kappa, Mu e Delta opioides
- Avaliar a influência da imuno-expressão do fator de crescimento de receptor opioide (OGFR).
- Avaliar a imuno-expressão de NFkB e Ki67 no Carcinoma de Células Escamosas de Orofaringe
- Correlacionar a imunoexpressão com fatores clínicos e histopatológicos, bem como entre os próprios marcadores.
- Associar os resultados das análises imuno-histoquímicas com prognóstico, incluindo estadiamento tumoral e sobrevida livre de recorrência de pacientes com CCEO.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Tipo do estudo e considerações éticas**

Trata-se de um estudo observacional, quantitativo, retrospectivo e de coorte transversal que foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa de seres humanos do Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC). Respeitando os aspectos éticos da Resolução nº 466 de 2012, com o número de aprovação 7.672.520.

### **3.2 População do Estudo e Delineamento amostral**

Tendo em vista que DANTAS et al demonstrou que tumores de orofaringe p16- apresentam maior expressão média de mu opioide receptor citoplasmático que tumores p16+ (90.43±18.37 vs 66.50±42.61), estima-se necessário avaliar 84 casos a fim de obter uma amostra que represente com 90% de poder e 95% de confiança a hipótese alternativa deste estudo (test t de Student).

Dessa forma, foram avaliadas 85 amostras teciduais provenientes de biópsias incisoriais de CCEO.

### **3.3 Critérios de inclusão e exclusão**

Foram incluídos pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas de orofaringe (CCEO), acompanhados no Hospital Haroldo Juaçaba (HHJ/ICC) nos últimos 10 anos (2013–2023), cujos blocos e lâminas de biópsias incisoriais estivessem disponíveis para análise.

Como critérios de exclusão, foram descartados os casos com material danificado, inconclusivo ou insuficiente, bem como aqueles com amostras fragilizadas que impossibilitassem análises futuras, além de casos com dados clínicos indisponíveis.

### **3.4 Coleta de dados clínico-patológicos**

O estudo também avaliou dados sociodemográficos, como idade, sexo, consumo antecedente de álcool e tabagismo esses dados foram obtidos por meio do sistema de prontuário eletrônico do HHJ/ICC.

Para as lâminas de biópsias incisoriais, realizou-se o estadiamento clínico com base nos critérios estabelecidos pelo Comitê Conjunto Americano de Estadiamento do Câncer (DANTAS, 2021; LYDIATT et al., 2017). Todos os dados foram obtidos a partir dos prontuários e dos laudos histopatológicos dos pacientes.

Ademais, calculou-se a sobrevida livre de recorrência a partir do intervalo entre a data de início do tratamento e a data da recorrência ou progressão da doença, ou, na ausência desses eventos, a data do último acompanhamento (follow-up), sendo utilizado, para análise estatística, o tempo em meses entre essas datas (DANTAS et al., 2021; DANTAS et al., 2016). Após a seleção da amostra, foram coletadas as lâminas histológicas provenientes das biópsias incisoriais.

### **3.5 Confeção de lâminas e Reação imuno-histoquímica**

Os blocos de parafina correspondentes de biópsias incisoriais foram submetidos a cortes seriados com espessura de aproximadamente 3 µm, os quais foram posteriormente montados em lâminas de vidro silanizadas. As lâminas foram destinadas à coloração por hematoxilina-eosina e à análise imuno-histoquímica

Foi realizada imuno-histoquímica por meio da técnica da estreptavidinabiotina-peroxidase. Posteriormente à desparifinização e reidratação, foi realizada a recuperação antigênica por meio da técnica de banho-maria a 97°C com duração de 45 minutos em solução de citrato (pH=6), bloqueio da peroxidase endógena utilizando peróxido de hidrogênio 3%, lavagem com solução tampão fosfato (PBS) e incubação overnight com os anticorpos primários antirreceptor OGFr (PA 5-96570, 1:300, Ph baixo, Thermofisher®), antirreceptor Mu opioide (A16939, ABclonal®, 1:300, Ph alto), antirreceptor Kappa opioide (NFkB p65 PA5-27617, Thermofisher®, 1:750, Ph baixo) , antirreceptor Delta opioide (clone OPRD1 PA5-86357 Thermofisher®, 1:300, Ph baixo) e NFkB (OPRK PA1- 24534 Thermofisher®, 1:400, Ph baixo) e KI67 puro, Ph baixo)

Posteriormente à incubação com o anticorpo primário, seguindo o tempo determinado pelo fabricante, as lâminas foram lavadas (PBS) e incubadas com anticorpo secundário biotilato por 30 minutos e, após a lavagem, incubadas com conjugado de peroxidase avidina-biotina ou sistema Envision® por 30 min. A revelação foi realizada por meio da utilização de e 3,3'-Diamino-benzidina (DAB) (DAKO®) e a contracoloração com hematoxilina de Harris.

Para o controle positivo da reação imuno-histoquímica, foram coletadas amostras, por cortes convencionais, de cérebro humano e linfonodos, conforme sugerido pelo fabricante e, para controle negativo, utilizando-se da mesma técnica imuno-histoquímica supracitada, entretanto, omitindo a etapa de incubação com o anticorpo primário.

### **3.6 Análise imuno-histoquímica**

As lâminas foram escaneadas utilizando o scanner do modelo MoticEasyScan em um aumento de 40x, após serão confeccionadas imagens de 10 campos nesse aumento que representará a área tumoral, as imagens serão exportadas para o formato TIF a fim de realizar uma avaliação quantitativa dos marcadores.

A análise de imunomarcção foi realizada quantitativamente. Para os marcadores Mu, Kappa, Delta, OGFR, e NFkB p65 será realizada uma contagem de células sem marcação e com marcação citoplasmática e nuclear dos 10 campos selecionados e para ki-67 apenas marcação nuclear para cálculo do percentual de células positivas. (DANTAS et al., 2019).

Foi feita a exportação das imagens para o software QuPath®, após a digitalização das lâminas, foi realizada a deconvolução de cores para separação da marcação em DAB e hematoxilina. As áreas tumorais foram selecionadas, e a identificação e contagem das células positivas foram realizadas manualmente com auxílio das ferramentas do software, garantindo

maior controle na distinção entre células tumorais e estruturas não neoplásicas. Os dados obtidos foram posteriormente utilizados nas análises estatísticas.

### 3.9 Análise Estatística

Os dados clínicos foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual associados por meio do teste exato de Fisher ou qui-quadrado de Pearson e os dados de imunexpressão em forma de média e desvio-padrão, submetidos ao teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, comparados por meio do teste de Mann-Whitney e correlacionados por meio da correlação de Spearman (dados não matamétricos). Curvas de Kaplan-Meier de sobrevida livre de recorrência foram comparadas usando o teste de Log-Rank Mantel-Cox e pelo 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

A amostra foi composta por 85 pacientes, dos quais 17 apresentaram positividade para P16 e 68 foram negativos para esse marcador. Observou-se predomínio do sexo masculino, correspondendo a 62 indivíduos (72,9%), bem como maior frequência de pacientes com idade superior a 60 anos ( $n = 33$ ; 66%). Em relação ao estadiamento tumoral, os estágios mais prevalentes foram T3 e T4, identificados em 47 casos (55,3%), e a presença de metástase linfonodal foi observada na maioria dos pacientes ( $n = 52$ ; 61,2%).

Quanto ao tratamento, a radioterapia foi empregada em 54 pacientes (63,5%), enquanto a associação entre radioterapia e quimioterapia foi utilizada em 31 casos (36,5%). Em relação aos hábitos de vida, 73 pacientes (85,9%) apresentavam histórico de tabagismo e 61 (71,8%) relataram consumo de álcool.

Ao correlacionar essas variáveis com a imunexpressão de P16, verificou-se associação inversa entre positividade para o marcador e histórico de tabagismo ( $p = 0,043$ ), ou seja, pacientes P16 positivos apresentaram menor frequência de tabagismo, conforme apresentado na tabela 1.

Tabela 1: Características epidemiológicas e sociodemográficas de pacientes com carcinoma espinocelular de orofaringe.

Variável	Categoria	Total	p16 (-)	p16 (+)	p-valor
Sexo	Feminino	23 (27,1%)	18 (26,5%)	5 (29,4%)	0,807
	Masculino	62 (72,9%)	50 (73,5%)	12 (70,6%)	
Idade	Até 60	17 (34,0%)	14 (35,9%)	3 (27,3%)	0,594
	>60	33 (66,0%)	25 (64,1%)	8 (72,7%)	
Fumo	Não	12 (14,1%)	7 (10,3%)	5 (29,4%)*	0,043
	Sim	73 (85,9%)	61 (89,7%)*	12 (70,6%)	
Álcool	Não	24 (28,2%)	19 (27,9%)	5 (29,4%)	0,904
	Sim	61 (71,8%)	49 (72,1%)	12 (70,6%)	
Tratamento	RT	54 (63,5%)	42 (61,8%)	12 (70,6%)	0,499
	RQT	31 (36,5%)	26 (38,2%)	5 (29,4%)	
T	T2/T3	38 (44,7%)	30 (44,1%)	8 (47,1%)	0,827
	T4	47 (55,3%)	38 (55,9%)	9 (52,9%)	
N	N0	33 (38,8%)	27 (39,7%)	6 (35,3%)	0,738
	N+	52 (61,2%)	41 (60,3%)	11 (64,7%)	

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

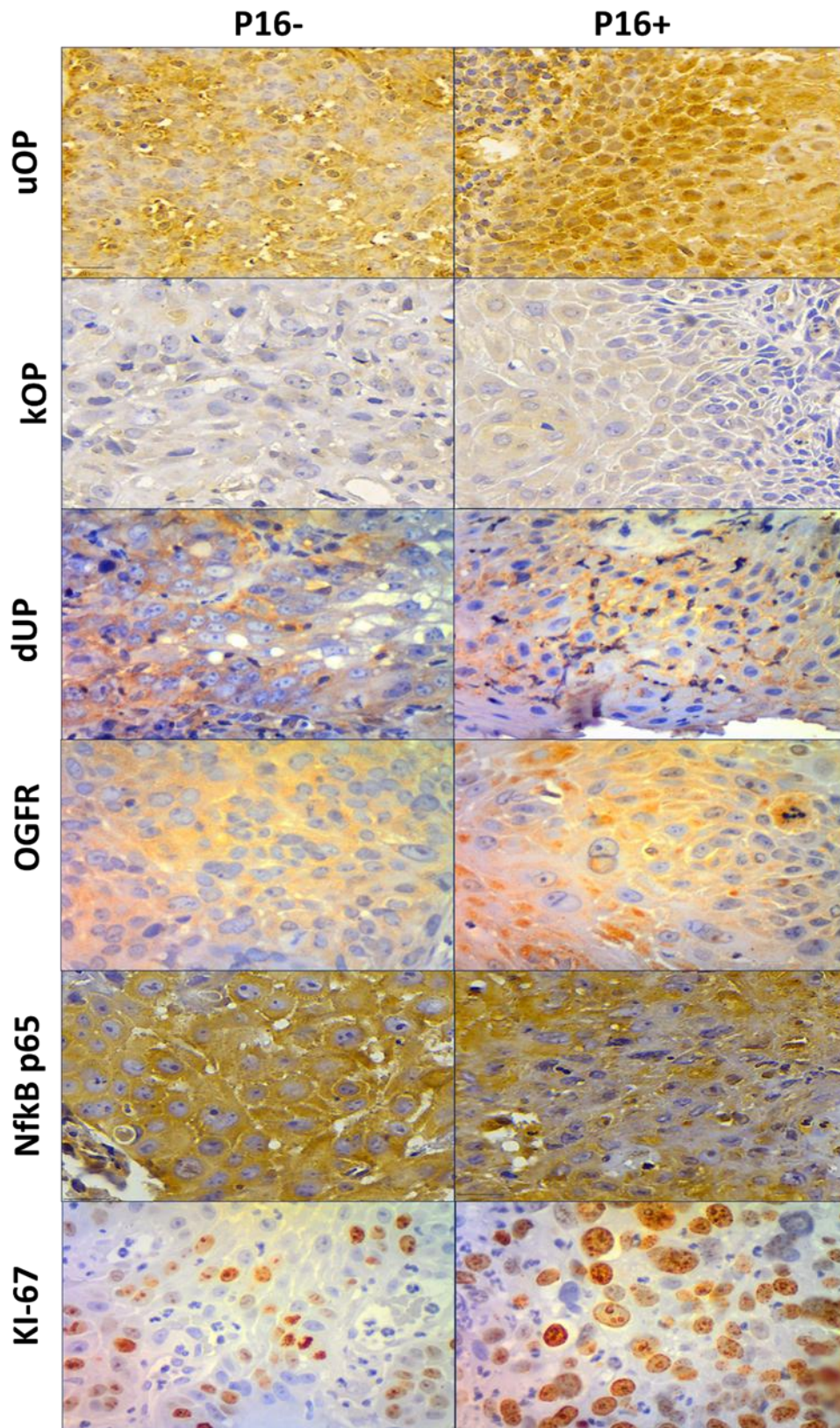
Dos tumores avaliados, a positividade nuclear média para Mu opioide foi 78.25±22.29% enquanto no citoplasma foi 79.80±20.40%. O kappa opioide apresentou positividade nuclear média 15.58±27.51%, enquanto no citoplasma 19.00±28.28%. Já o delta opioide a positividade nuclear foi 4.56±5.56% e no citoplasma 7.10±8.14%. O NfKb a positividade nuclear foi 13.18±13.52% e no citoplasma 30.26±18.19%. Para OGRF a positividade nuclear foi 8.22±10.63% e no citoplasma 37.48±15.00%. Já o marcador proliferativo Ki-67 a positividade nuclear foi de 23.36±21.93%. Pode se observar que não houve associação entre a imunexpressão desses marcadores com o p16, conforme apresentado na tabela 2 e figura 1.

tabela 2: Percentual de positividade nuclear e citoplasmática dos marcadores opioides na amostra analisada.

Marcador	Total	p16 (-)	p16 (+)	p-valor
uOP tumor núcleo	78,25±22,29	80,54±20,08	68,93±28,65	0,081
uOP tumor citoplasma	79,80±20,40	80,78±19,92	75,79±22,55	0,416
kOP tumor núcleo	15,58±27,51	14,68±26,26	19,09±32,63	0,571
kOP tumor citoplasma	19,00±28,28	18,31±27,40	21,67±32,31	0,674
dOP tumor núcleo	4,56±5,56	4,87±5,84	3,31±4,23	0,336
dOP tumor citoplasma	7,10±8,14	7,44±8,11	5,77±8,41	0,482
NF-κB p65 tumor núcleo	13,18±13,52	14,10±15,14	10,15±5,43	0,508
NF-κB p65 tumor citoplasma	30,26±18,19	29,92±20,46	31,38±7,94	0,856
OGFR tumor núcleo	8,22±10,63	8,63±11,59	6,56±5,27	0,587
OGFR tumor citoplasma	37,48±15,00	38,57±14,15	33,01±18,23	0,298
Ki-67	23,36±21,93	23,64±21,34	22,37±24,67	0,839

\*p < 0,05, teste de Mann-Whitney (média ± DP).

Figura 1: Expressão imuno-histoquímica dos receptores opioides em carcinoma de células escamosas de orofaringe, evidenciando marcação nas células tumorais. Aumento de 40x



A análise de correlação revelou diferenças no padrão de interação entre receptores opioides e marcadores tumorais de acordo com a expressão de p16. Nos tumores p16 negativos,

observou-se forte associação entre a expressão nuclear e citoplasmática dos receptores opioides, bem como correlação positiva entre uOP e NFkBp65, sugerindo interação entre vias opioides e inflamatórias. Além disso, a expressão de uOP associou-se positivamente ao índice proliferativo Ki67, indicando possível participação desses receptores na progressão tumoral mediada por inflamação. (tabela 3 e figura 2).

Nos tumores p16 positivos, observou-se manutenção entre os padrões de expressão nuclear e citoplasmática dos receptores opioides, porém com um padrão distinto de interação biológica. Nesses casos, uOP e kOP correlacionaram-se positivamente com Ki67, enquanto kOP citoplasmático apresentou correlação negativa com NFkB p65, sugerindo possível papel modulador da via inflamatória. Observou-se ainda correlação inversa entre dUP citoplasmático e OGFR nuclear, indicando possíveis interações regulatórias adicionais na progressão tumoral associada ao HPV conforme apresentado na tabela 3 e figura 2

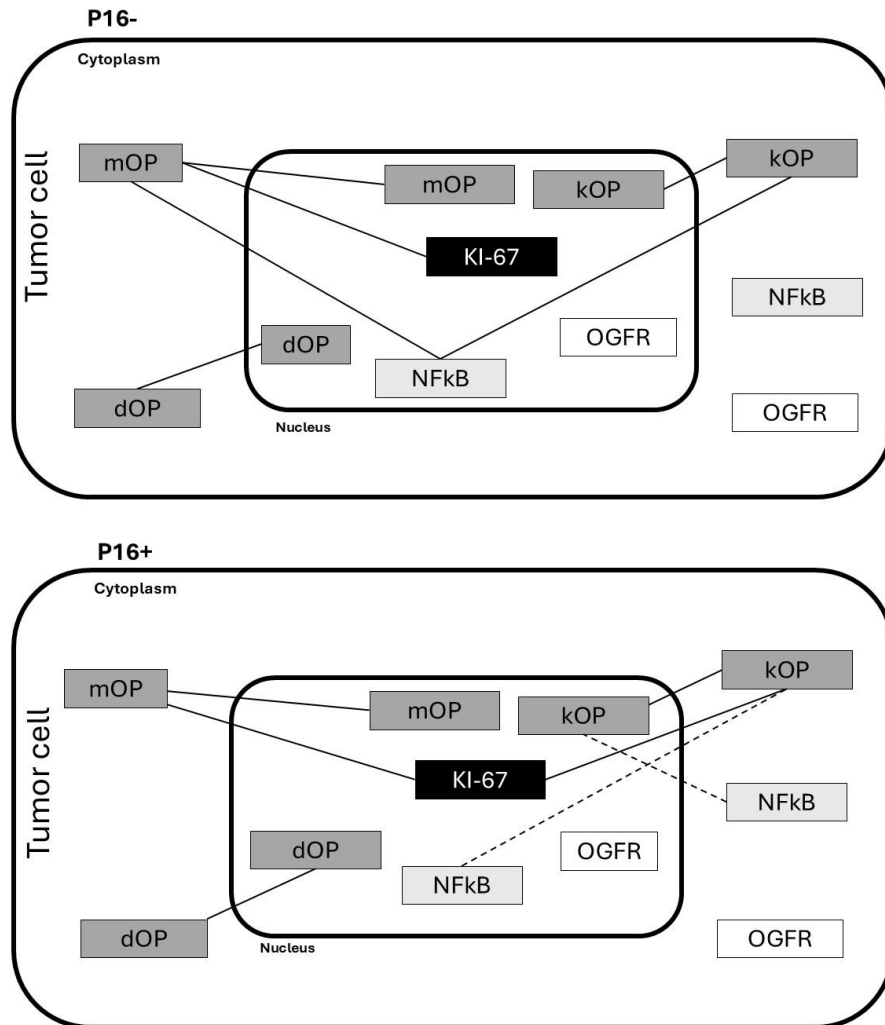
Esses achados reforçam que a participação das vias opioides na biologia do carcinoma de orofaringe pode variar conforme a presença de infecção viral no tumor.

Tabela 3: Análise de correlação entre os marcadores opioides

		kOP		dOP		NFkB p65		OGFR		ki67		
		Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	Núcleo	Citoplasma	
<b>p16 = p16-</b>												
uOP tumor nucleio	r=	-	<b>0.999*</b>	0.178	0.182	-0.050	-0.041	<b>0.431*</b>	0.332	-0.040	0.163	<b>0.423*</b>
	p-Valor	-	<b>&lt;0.001</b>	0.202	0.191	0.731	0.778	<b>0.045</b>	0.131	0.816	0.335	<b>0.002</b>
uOP tumor citoplasma	r=	-	-	0.188	0.195	-0.048	-0.035	<b>0.446*</b>	0.366	-0.043	0.155	<b>0.410*</b>
	p-Valor	-	-	0.178	0.162	0.739	0.809	<b>0.037</b>	0.094	0.802	0.361	<b>0.003</b>
kOP tumor nucleio	r=	-	-	-	<b>0.935*</b>	0.059	-0.077	<b>0.431*</b>	0.173	-0.061	-0.036	0.049
	p-Valor	-	-	-	<b>&lt;0.001</b>	0.670	0.582	<b>0.040</b>	0.429	0.714	0.827	0.730
kOP tumor citoplasma	r=	-	-	-	-	0.100	-0.037	<b>0.449*</b>	0.209	-0.046	0.002	0.096
	p-Valor	-	-	-	-	0.471	0.791	<b>0.032</b>	0.337	0.781	0.992	0.493
dOP tumor nucleio	r=	-	-	-	-	-	<b>0.646*</b>	-0.307	-0.069	-0.181	0.140	-0.226
	p-Valor	-	-	-	-	-	<b>&lt;0.001</b>	0.176	0.765	0.307	0.430	0.118
dOP tumor citoplasma	r=	-	-	-	-	-	-	-0.101	0.021	-0.226	0.142	-0.085
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	0.662	0.930	0.199	0.423	0.563
NFkbp65 tumor nucleio	r=	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.545*</b>	0.047	-0.153	<b>0.510*</b>
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	<b>0.007</b>	0.838	0.507	<b>0.037</b>
NFkbp65 tumor citoplasma	r=	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.157	-0.079	0.466
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	0.498	0.733	0.059
OGFR tumor nucleio	r=	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.184	0.048
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.249	0.780
OGFR tumor citoplasma	r=	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.307
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.068
ki67	r=	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>p16 = p16+</b>												
uOP tumor nucleio	r=	-	<b>0.709*</b>	0.292	-0.006	-0.388	-0.554	0.486	0.143	0.119	0.048	<b>0.616*</b>
	p-Valor	-	<b>0.005</b>	0.333	0.986	0.213	0.062	0.329	0.787	0.779	0.911	<b>0.025</b>
uOP tumor citoplasma	r=	-	-	0.143	-0.116	-0.473	<b>-0.617*</b>	0.486	0.143	0.119	0.048	0.337
	p-Valor	-	-	0.641	0.707	0.121	<b>0.032</b>	0.329	0.787	0.779	0.911	0.260
kOP tumor nucleio	r=	-	-	-	<b>0.908*</b>	0.036	0.025	-0.257	-0.486	0.122	0.365	<b>0.606*</b>
	p-Valor	-	-	-	<b>&lt;0.001</b>	0.904	0.933	0.623	0.329	0.738	0.300	<b>0.017</b>
kOP tumor citoplasma	r=	-	-	-	-	0.015	0.020	<b>-0.829*</b>	<b>-0.829*</b>	-0.049	0.401	0.387
	p-Valor	-	-	-	-	0.960	0.945	<b>0.042</b>	<b>0.042</b>	0.894	0.250	0.154
dOP tumor nucleio	r=	-	-	-	-	-	<b>0.695*</b>	-0.377	-0.319	-0.522	0.087	-0.120
	p-Valor	-	-	-	-	-	<b>0.004</b>	0.461	0.538	0.149	0.824	0.684
dOP tumor citoplasma	r=	-	-	-	-	-	-	0.145	0.609	-	-0.087	0.237
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	0.784	0.200	<b>0.731*</b>	0.824	0.415
NFkbp65 tumor nucleio	r=	-	-	-	-	-	-	-	0.429	0.029	-0.657	0.414
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	0.337	0.957	0.156	0.355
NFkbp65 tumor citoplasma	r=	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.314	-0.143	0.559
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	0.544	0.787	0.192
OGFR tumor nucleio	r=	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.200	0.043
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.580	0.906
OGFR tumor citoplasma	r=	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.288
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.419
ki67	r=	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p-Valor	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*p&lt;0,05, correlação de Spearman.

Figura 2: Principais correlações entre os receptores opioides



Legenda: Correlações entre marcadores opioides, NFκB p65 e Ki-67 em tumores p16 negativos e positivos, evidenciando interações entre vias inflamatórias e proliferativas.

A sobrevida livre de recorrência, definida como o intervalo entre o término da radioterapia e o aparecimento da primeira recorrência tumoral, foi analisada nos diferentes grupos do estudo. Entre os pacientes p16 negativos, 46 (67,6%) permaneceram sem recorrência ao final do período de acompanhamento. De forma semelhante, no grupo p16 positivo, 15 dos 17 pacientes encontravam-se livres de recorrência ao término do follow-up (Tabela 4).

O tempo médio de sobrevida livre de recorrência foi  $28.64 \pm 4.08$  (20.64-36.63) para pacientes p16- e de  $22.43 \pm 1.89$  (18.71-26.14) para pacientes p16+. Não foi observada diferença estatisticamente significativa no tempo de sobrevida livre de recorrência em função da imunoe expressão de p16 ( $p=0,096$ ).

O sexo e a idade não influenciaram no tempo de sobrevida livre de recorrência da doença em ambos os grupos. Entretanto nos pacientes p16-, o histórico de tabagismo mostrou associação significativa com maior sobrevida livre de recorrência ( $p = 0,011$ ).

Uso de álcool, forma de tratamento e estadiamento não impactaram na sobrevida livre de recorrência. Da mesma forma, a expressão dos marcadores Mu, Kappa e delta opioide não apresentou impacto nesse desfecho. Por outro lado, os pacientes com baixa expressão nuclear e citoplasmática de Nfkb, apresentaram maior tempo de sobrevida livre de recorrência, tanto no grupo p16- quanto no p16+ ( $p=0,003$  e  $p=0,013$  respectivamente).

Em relação ao OGFR, observou-se que nos tumores p16 negativo a baixa expressão desse marcador foi relacionada ao melhor prognóstico, enquanto nos tumores p16 positivo não houve associação significativa. Dessa forma, o OGRF se configura como um marcador prognóstico nos tumores p16 negativo.

tabela 4: Sobrevida livre de recorrência

	SLR (meses) p16-		p-Valor	SLR (meses) p16+		p-Valor
	n/N (%)	Média±DP (IC95%)		n/N (%)	Média±DP (IC95%)	
Total	46/68 (67.6%)	28.64±4.08 (20.64-36.63)	-	15/17 (88.2%)	22.43±1.89 (18.71-26.14)	0,096
Sexo						
Feminino	14/18 (77.8%)	32.96±7.95 (17.38-48.54)	0,207	4/5 (80.0%)	16.43±3.64 (9.31-23.56)	0,404
Masculino	32/50 (64.0%)	28.93±4.47 (20.16-37.69)		11/12 (91.7%)	23.43±1.71 (20.07-26.78)	
Idade						
Até 60	10/14 (71.4%)	38.17±6.41 (25.61-50.74)	0,455	3/3 (100.0%)	-	0,414
>60	15/25 (60.0%)	25.09±5.50 (14.30-35.88)		7/8 (87.5%)	-	
Fumo						
Não	2/7 (28.6%)	7.25±2.06 (3.21-11.28)	0,011	4/5 (80.0%)	20.35±4.51 (11.51-29.20)	0,648
Sim	44/61 (72.1%)	31.28±4.34 (22.77-39.80)		11/12 (91.7%)	22.77±2.15 (18.55-26.98)	

Alcool						
Não	13/19 (68.4%)	25.28±6.73 (12.10-38.47)	0,601	4/5 (80.0%)	16.43±3.64 (9.31-23.56)	0,404
Sim	33/49 (67.3%)	30.54±4.46 (21.80-39.29)		11/12 (91.7%)	23.43±1.71 (20.07-26.78)	
Tratamento						
RT	33/42 (78.6%)	34.09±6.17 (21.99-46.20)	0,125	11/12 (91.7%)	19.26±1.66 (16.01-22.52)	0,874
RQT	13/26 (50.0%)	21.79±5.12 (11.76-31.83)		4/5 (80.0%)	22.77±2.15 (18.55-26.98)	
T						
T2/T3	20/30 (66.7%)	30.83±5.61 (19.83-41.82)	0,741	7/8 (87.5%)	22.77±2.15 (18.55-26.98)	0,920
T4	26/38 (68.4%)	24.49±5.44 (13.82-35.15)		8/9 (88.9%)	18.69±2.18 (14.41-22.96)	
N						
N0	20/27 (74.1%)	33.28±5.87 (21.77-44.79)	0,292	5/6 (83.3%)	17.50±0.00 (17.50-17.50)	0,473
N+	26/41 (63.4%)	27.36±5.04 (17.48-37.24)		10/11 (90.9%)	23.11±2.19 (18.82-27.39)	
uOP_tumor_nucleo						
Até 75%	16/26 (61.5%)	17.56±3.05 (11.58-23.53)	0,499	6/7 (85.7%)	23.43±1.71 (20.07-26.78)	0,709
>75%	30/42 (71.4%)	34.00±4.84 (24.51-43.49)		8/9 (88.9%)	22.60±2.64 (17.42-27.78)	
uOP_tumor_citoplasma						
Até 75%	18/25 (72.0%)	27.50±6.65 (14.47-40.53)	0,291	6/7 (85.7%)	23.43±1.71 (20.07-26.78)	0,738
>75%	28/43 (65.1%)	28.95±4.74 (19.65-38.25)		9/10 (90.0%)	22.88±2.39 (18.19-27.57)	
kOP_tumor_nucleo						
Até 5%	29/39 (74.4%)	29.79±5.91 (18.20-41.38)	0,299	6/8 (75.0%)	-	0,254
>5%	17/29 (58.6%)	26.80±5.36 (16.29-37.31)		9/9 (100.0%)	-	
kOP_tumor_citoplasma						
<100%	26/36 (72.2%)	31.92±5.51 (21.13-42.72)	0,432	7/9 (77.8%)	-	0,213
=100%	20/32 (62.5%)	25.88±5.43 (15.23-36.53)		8/8 (100.0%)	-	
dOP_tumor_nucleo						
0%	7/7 (100.0%)	-	0,093	1/1 (100.0%)	-	0,577

>0%	39/61 (63.9%)	-		14/16 (87.5%)	-	
<b>p16-</b>						
Até 5%	28/35 (80.0%)	36.91±5.44 (26.25-47.57)	0,158	10/10 (100.0%)	-	0,087
>5%	18/33 (54.5%)	23.65±4.84 (14.16-33.15)		5/7 (71.4%)	-	
<b>NFkbp65_tumor_nucleo</b>						
<100%	40/48 (83.3%)	38.71±5.03 (28.85-48.57)	0,001	14/14 (100.0%)	-	0,003
=100%	6/20 (30.0%)	15.62±4.53 (6.74-24.49)		1/3 (33.3%)	-	
<b>NFkbp65_tumor_citoplasma</b>						
0%	41/48 (85.4%)	40.74±4.79 (31.35-50.14)	0,000	12/12 (100.0%)	-	0,013
>0%	5/20 (25.0%)	13.24±4.04 (5.32-21.16)		3/5 (60.0%)	-	
<b>OGFR_tumor_nucleo</b>						
Até 5%	28/34 (82.4%)	38.77±5.81 (27.38-50.15)	0,013	10/11 (90.9%)	23.11±2.19 (18.82-27.39)	0,718
>5%	18/34	18.65±3.89		5/6 (83.3%)	19.00±1.06	
<b>OGFR_tumor_citoplasma</b>						
0%	23/26 (88.5%)	42.47±6.20 (30.33-54.62)	0,039	10/11 (90.9%)	23.11±2.19 (18.82-27.39)	0,945
>0%	23/42 (54.8%)	23.60±4.32 (15.13-32.06)		5/6 (83.3%)	19.83±0.95 (17.97-21.70)	
<b>ki67</b>						
Até 75%	16/20 (80.0%)	41.35±5.90 (29.78-52.92)	0,055	5/6 (83.3%)	19.83±0.95 (17.97-21.70)	0,945
>75%	30/48 (62.5%)	22.76±3.80 (15.31-30.21)		10/11 (90.9%)	23.11±2.19 (18.82-27.39)	

\*p<0,05, teste Log-Rank Mantel-Cox (Média±DP).

## 5. DISCUSSÃO

O carcinoma de células escamosas de orofaringe (CCEO) é uma neoplasia maligna pertencente ao grupo dos cânceres de cabeça e pescoço e ocupa atualmente a sexta posição em incidência mundial. A doença acomete principalmente estruturas como base da língua, tonsilas palatinas e linguais, úvula e paredes da orofaringe. Entre os principais fatores de risco destacam-se o tabagismo, o consumo de álcool e a infecção pelo papilomavírus humano (HPV), sendo este último associado ao aumento progressivo do número de casos nas últimas décadas (CHEN, 2025, CHIOREANU et al 2024)

O CCEO apresenta maior prevalência no sexo masculino, especialmente entre a sexta e a sétima década de vida. Além disso, o diagnóstico frequentemente ocorre em estágios avançados da doença, com predominância de tumores classificados como T3 e T4 e presença de metástase linfonodal (CHEN, 2025, CHIOREANU et al 2024), padrão igualmente observado na amostra do presente estudo.

A infecção pelo papilomavírus humano (HPV) desempenha um papel central na carcinogênese da orofaringe e tem contribuído para mudanças no perfil epidemiológico da doença. Diferentemente dos carcinomas associados ao tabagismo e ao etilismo, os tumores relacionados ao HPV tendem a acometer pacientes mais jovens. Nesse contexto, a superexpressão da proteína p16 é amplamente utilizada como marcador substituto da infecção pelo HPV, permitindo diferenciar tumores com características biológicas distintas. Em geral, os tumores HPV/p16 positivos apresentam melhor resposta ao tratamento e prognóstico mais favorável quando comparados aos tumores HPV/p16 negativos. (AL FADEL et al 2025, CHEN 2025)

Enquanto o tabagismo e o consumo de álcool permanecem fatores de risco importantes para tumores não associados ao p16 negativos, pacientes com tumores p16 positivos tendem a apresentar menor exposição a esses hábitos (CHEN 2025, CHIOREANU 2024), de forma semelhante, no presente estudo, observou-se menor frequência de tabagismo e menor proporção de abuso de álcool entre os casos p16 positivos, reforçando as diferenças epidemiológicas entre os subgrupos tumorais.

Além das características epidemiológicas e clínicas, a biologia tumoral tem sido alvo crescente de investigação, especialmente no que se refere ao papel de vias relacionadas à sobrevivência e progressão celular. No presente estudo, observou-se a expressão dos receptores opioides, com destaque para o receptor uOP que apresentou maiores índices de positividade citoplasmática e nuclear, enquanto os demais receptores apresentaram níveis menores de

positividade. Estudos prévios demonstram que os receptores uOP encontra-se superexpresso em diferentes tipos de neoplasias, incluindo carcinomas escamosos de cabeça e pescoço. Embora existam evidências de que opioides possam influenciar o desenvolvimento e a progressão desses tumores, os efeitos da ativação ou do bloqueio do uOP ainda não estão completamente esclarecidos (LEVI et al 2023).

Outros estudos indicam que a ativação desse receptor pode estimular a proliferação e a migração celular, favorecendo o crescimento tumoral, o que sugere que o uOP pode representar um potencial alvo terapêutico em carcinomas escamosos de cabeça e pescoço (WANG et al 2024, SAH et al 2024, SANCHEZ et al 2023)

Na análise de correlação, observou-se que o padrão de interação entre receptores opioides e marcadores tumorais varia conforme a expressão de p16. Dantas et al. (2023) demonstraram que os receptores uOP e kOP estão presentes em carcinomas de orofaringe tanto p16 positivos quanto negativos, indicando que sua expressão independe do status viral, embora o prognóstico seja mais favorável em tumores p16 positivos, que tendem a apresentar melhor resposta ao tratamento quando comparados aos tumores p16 negativos.

Adicionalmente, estudos indicam que tumores HPV positivos e negativos apresentam diferenças no microambiente inflamatório e imunológico, com maior infiltração linfocitária e ativação imune nos tumores HPV positivos, enquanto os tumores HPV negativos exibem ambiente mais fibroso e imunossupressor. Essas diferenças podem influenciar a ativação de vias celulares e a expressão de receptores de membrana, incluindo receptores opioides, de modo que as distintas correlações observadas entre esses receptores e marcadores proliferativos nos grupos p16 positivo e p16 negativo podem refletir interações biológicas moduladas pelo status viral, reforçando a heterogeneidade molecular do CCEO (MARKOVITS et al 2025, TABATABAEIAN et al 2024)

No presente estudo, observou-se que o padrão de interação entre receptores opioides e marcadores tumorais variou conforme o status de p16. Nos tumores p16 negativos, foi identificada correlação entre o receptor uOP e o marcador proliferativo Ki-67, sugerindo participação da sinalização opioide em mecanismos relacionados ao crescimento tumoral. Em estudo conduzido por De Sousa (2021), em câncer de mama, demonstrou-se que a positividade para Ki-67 se associa a pior prognóstico, maior atividade mitótica e maior potencial invasivo. De forma semelhante, Dantas et al. (2023) observaram maior expressão de Ki-67 em tumores primários e em casos com metástase linfonodal. Assim, os achados do presente estudo sugerem que a associação entre uOP e Ki-67 pode refletir maior atividade proliferativa em tumores p16 negativos.

Nos tumores p16 positivos, observou-se associação entre os receptores uOP e kOP e o marcador proliferativo Ki-67, sugerindo que, nesse contexto biológico distinto, múltiplos receptores opioides podem participar da regulação da proliferação tumoral. Além disso, verificou-se correlação inversa entre a expressão do receptor kOP e a atividade de NFkB nesse grupo, enquanto nos tumores p16 negativos foi identificada correlação positiva entre uOP, kOP e NFkB, indicando padrões distintos de interação conforme o status viral.

Estudo de Gabr et al. (2021) demonstra que opioides podem tanto ativar quanto modular negativamente a sinalização de NFkB em diferentes tipos celulares, influenciando respostas inflamatórias e imunológicas. Considerando que tumores p16 positivos apresentam microambiente imunológico distinto, essa modulação pode justificar as correlações observadas, reforçando que o status viral influencia a interação entre vias inflamatórias e proliferativas no carcinoma de orofaringe.

Observou-se relação inversa entre a expressão citoplasmática do receptor delta e o OGFr nuclear, sugerindo mecanismos regulatórios distintos dentro do eixo opioide, reconhecido por sua participação no controle do ciclo celular e do crescimento tumoral. Embora não tenha sido identificada associação direta entre esses marcadores e o status de p16, a coexistência de sinalização opioide, atividade inflamatória e proliferação celular indica que esses mecanismos podem atuar independentemente da presença do HPV, contribuindo para a manutenção do crescimento tumoral e evidenciando a complexidade biológica do CCEO.

Quanto ao papel prognóstico do OGFr, a literatura apresenta resultados divergentes. Wang et al. (2025) associaram maior expressão do receptor a pior prognóstico, enquanto Ciwn et al. relataram que o eixo OGF–OGFr pode modular respostas imunológicas e favorecer atividade antitumoral. Esses achados sugerem que o impacto clínico do OGFr depende do contexto molecular e do microambiente tumoral, o que pode explicar as diferenças observadas entre os estudos. No presente trabalho, observou-se que a menor expressão de OGFr foi relacionada a um melhor prognóstico.

Do ponto de vista clínico, a sobrevida livre de recorrência permanece um importante indicador prognóstico no carcinoma de orofaringe. No presente estudo, elevada proporção de pacientes permaneceu sem recorrência ao término do acompanhamento, tanto em tumores p16 positivos quanto negativos, resultado compatível com estudos que demonstram melhor controle da doença em tumores associados ao HPV.

Contudo, a ocorrência de recorrência em ambos os grupos evidencia que o prognóstico não depende exclusivamente do status viral. Fatores clínicos, estadiamento tumoral e características moleculares relacionadas à proliferação e inflamação também influenciam a

evolução clínica. Assim, o comportamento do CCEO resulta da interação entre fatores epidemiológicos, status viral e vias celulares associadas à sinalização opioide e proliferação tumoral, o que pode auxiliar futuramente na definição de estratégias prognósticas e no desenvolvimento de terapias mais individualizadas.

## **6. CONCLUSÕES**

O carcinoma de orofaringe apresenta comportamento biológico heterogêneo, influenciado pelo status de p16 e por vias inflamatórias, proliferativas e pela sinalização opioide. Observou-se elevada expressão de receptores opioides e diferenças nas interações com Ki-67 e NFkB conforme o status viral, sugerindo participação dessas vias na dinâmica tumoral. A menor expressão de OGFr associou-se a melhor prognóstico, enquanto a sobrevida livre de recorrência foi favorável em ambos os grupos, indicando influência de fatores adicionais além do HPV. A integração entre status viral, inflamação e sinalização opioide pode contribuir para melhor estratificação prognóstica. Contudo, novos estudos são necessários para esclarecer os mecanismos biológicos envolvidos.

## REFERÊNCIAS

- AL FADEL, A. M. *et al.* The epidemiological trends and survival of HPV-related oropharyngeal cancer other than tonsils and base of tongue: a systematic review and meta-analysis. **Oral Oncology**, v. 165, p. 107311, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2025.107311>. Acesso em: 15 nov. 2025.
- BRICE-TUTT, A. C. *et al.* Phenylalanine stereoisomers of CJ-15,208 and [D-Trp]CJ-15,208 exhibit distinctly different opioid activity profiles. **Molecules**, Basel, v. 25, n. 17, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25173999>. Acesso em: 15 nov. 2025.
- CHEN, A. M. Epidemiological trends in the characterization of human papillomavirus-related oropharyngeal cancer: a global perspective. **Current Oncology Reports**, v. 27, p. 1395–1400, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11912-025-01656-4> Acesso em: 15 nov. 2025.
- CHIOREANU, A. *et al.* A retrospective analysis from Western Romania comparing the treatment and survivability of p16-positive versus p16-negative oropharyngeal cancer. **Cancers**, v. 16, p. 945, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers16050945>. Acesso em: 15 nov. 2025.
- CIWUN, M. *et al.* Low-dose naltrexone as an adjuvant in combined anticancer therapy. **Cancers**, Basel, v. 16, n. 6, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers16061240>. Acesso em: 15 nov. 2025.
- DANTAS, T. S. **Perfil da imunoexpressão de receptores opioides em lesões potencialmente malignas e no carcinoma de células escamosas de boca e orofaringe e correlação clínico-patológica com marcadores de proliferação e morte celular.** 2021. 94 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/60778>. Acesso em: 16 nov. 2025.
- DANTAS, T. S. *et al.* Influence of educational level, stage, and histological type on survival of oral cancer in a Brazilian population: a retrospective study of 10 years observation. **Medicine**, Baltimore, v. 95, n. 3, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002314> . Acesso em: 16 nov. 2025.
- DANTAS, T. S. *et al.* Mu and kappa opioid receptor immunolabeling indicates the prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma: a cross-sectional observational study. **Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery**, Paris, v. 124, n. 6S, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jormas.2023.101554>. Acesso em: 16 nov. 2025.
- DE SOUSA, A. M. *et al.* Analysis of the immunoexpression of opioid receptors and their correlation with markers of angiogenesis, cell proliferation and apoptosis in breast cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 22, n. 2, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.31557/APJCP.2021.22.2.633>. Acesso em: 16 nov. 2025.
- FRANCISCO, L. A. *et al.* Carcinoma de células escamosas oral: revisão de literatura. **Revista Fluminense de Extensão Universitária, Vassouras**, v. 11, n. 2, p. 18-23, 2021. Disponível

em: <https://editora.univassouras.edu.br/index.php/RFEU/article/view/3007>. Acesso em: 16 nov. 2025.

GABR, M. M. *et al.* Interaction of opioids with TLR4-mechanisms and ramifications. **Cancers**, Basel, v. 13, n. 21, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/cancers13215274>. Acesso em: 17 nov. 2025.

GUITART, X.; CODONY, X.; MONROY, X. Sigma receptors: biology and therapeutic potential. **Psychopharmacology**, v. 174, p. 301–319, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00213-004-1920-9>. Acesso em: 17 nov. 2025.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **Estimativa 2026: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2026. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa>. Acesso em: 17 nov.2025.

LAMBERT, D. G. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 7, n. 8, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrd2572>. Acesso em: 17 nov. 2025.

LECHNER, M. *et al.* HPV-associated oropharyngeal cancer: epidemiology, molecular biology and clinical management. **Nature Reviews Clinical Oncology**, London, v. 19, n. 5, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41571-022-00603-7>. Acesso em: 16 nov. 2025.

LEVI, L. *et al.* Effect of opioid receptor activation and blockage on the progression and response to treatment of head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Clinical Medicine**, Basel, v. 12, n. 4, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/jcm12041277>. Acesso em: 16 nov. 2025.

LIM, Y. X. *et al.* Clinical, morphologic and molecular heterogeneity of HPV-associated oropharyngeal cancer. **Oncogene**, London, v. 42, n. 40, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41388-023-02819-y>. Acesso em: 16 nov. 2025.

LOURENÇO, S. de Q. C. *et al.* Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: revisão de sistemas propostos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 325-333, 2007. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/1800>. Acesso em: 16 nov. 2025.

LYDIATT, W. M. *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**, Hoboken, v. 67, n. 2, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21389>. Acesso em: 18 nov. 2025.

MACHIELS, J. P. *et al.* Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHSN-ESMO-ESTRO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, Oxford, v. 31, n. 11, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.07.011>. Acesso em: 18 nov. 2025.

MARKOVITS, E. *et al.* Spatial profiling of HPV-stratified head and neck squamous cell carcinoma reveals distinct immune niches and microenvironmental architectures. **Journal of**

**Translational Medicine**, London, v. 23, n. 1, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-025-07280-x>. Acesso em: 18 nov. 2025.

MENDES, B. *et al.* A importância do cirurgião-dentista no diagnóstico e acompanhamento do câncer de boca. **Journal of Multidisciplinary Dentistry**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 106-111, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.46875/jmd.v10i2.268>. Acesso em: 16 nov. 2025.

MORK, J. *et al.* Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 344, n. 15, 2001. Disponível em: <https://doi.org/10.1056/NEJM200104123441503>. Acesso em: 18 nov. 2025.

NEVILLE, B. W. *et al.* **Patologia oral e maxilofacial**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2024.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Câncer**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>. Acesso em: 27 nov. 2025.

PANARESE, I. *et al.* Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic and predictive parameters in the etiopathogenetic route. **Expert Review of Anticancer Therapy**, London, v. 19, n. 2, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14737140.2019.1561288>. Acesso em: 18 nov. 2025.

PAUL, A. K. *et al.* Opioid analgesia and opioid-induced adverse effects: a review. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 14, n. 11, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ph14111091>. Acesso em: 18 nov. 2025.

SAH, D. *et al.* Opioids and cancer: current understanding and clinical considerations. **Current Oncology**, Toronto, v. 31, n. 6, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/curroncol31060235>. Acesso em: 18 nov. 2025.

SÁNCHEZ, M. L. *et al.* Involvement of the opioid peptide family in cancer progression. **Biomedicines**, Basel, v. 11, n. 7, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomedicines11071993>. Acesso em: 18 nov. 2025.

SANTOS, J. C. S. *et al.* Avaliação clínico-epidemiológica de pacientes com carcinoma de células escamosas oral. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 68, n. 1, 2022. Disponível em: <https://rbc.inca.gov.br/index.php/revista/article/view/1584>. Acesso em: 15 nov. 2025.

SCHEFF, N. N. *et al.* The effect of opioids on the efficacy of immunotherapy in recurrent/metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncology**, Oxford, v. 140, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2023.106363>. Acesso em: 2 dez. 2025.

SHINOMIYA, H.; NIBU, K. I. Etiology, diagnosis, treatment, and prevention of human papilloma virus-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. **International Journal of Clinical Oncology**, Tokyo, v. 28, n. 8, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10147-023-02336-8>. Acesso em: 12 nov. 2025.

STEIN, C. Opioid receptors. **Annual Review of Medicine**, Palo Alto, v. 67, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev-med-062613-093100>. Acesso em: 16 nov. 2025.

TABATABAEIAN, H. *et al.* Navigating therapeutic strategies: HPV classification in head and neck cancer. **British Journal of Cancer**, London, v. 131, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41416-024-02655-1>. Acesso em: 20 nov. 2025.

VEARRIER, D.; GRUNDMANN, O. Clinical pharmacology, toxicity, and abuse potential of opioids. **Journal of Clinical Pharmacology, Hoboken**, v. 61, n. Suppl. 2, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcph.1923>. Acesso em: 5 dez. 2025.

WANG, R. *et al.* Impact of opioids and mu-opioid receptors on oncologic metastasis. **American Journal of Cancer Research**, Irvine, v. 14, n. 9, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.62347/SCLS3277>. Acesso em: 4 nov. 2025.

WANG, Z. Y. *et al.* Expression of opioid growth factor, opioid growth factor receptor, P16, and P21 and their correlations with clinicopathological characteristics in elderly patients with colorectal cancer. **Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao**, Beijing, v. 47, n. 6, 2025. Disponível em: <https://doi.org/10.3881/j.issn.1000-503X.16518>. Acesso em: 10 jan. 2026.

ZHUANG, Y. *et al.* Molecular recognition of morphine and fentanyl by the human  $\mu$ -opioid receptor. **Cell**, Cambridge, v. 185, n. 23, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.09.041>. Acesso em: 16 nov. 2025.

## ANEXOS

INSTITUTO DO CÂNCER DO  
CEARA - ICC



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** CORRELAÇÃO ENTRE A IMUNO-EXPRESSIONÃO DE RECEPTORES OPIOIDES COM A SOBREVÍDA DE PACIENTES COM CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

**Pesquisador:** Thinali Sousa Dantas

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 87533625.7.0000.5528

**Instituição Proponente:** Instituto do Cancer do Ceara

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 7.672.520

**Apresentação do Projeto:**

Projeto apreciado previamente por este CEP, sendo emitido parecer de número 7.532.296, com pendências a serem atendidas

**Objetivo da Pesquisa:**

Ver Comentários e Considerações sobre a Pesquisa

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Ver Comentários e Considerações sobre a Pesquisa

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

No dia 21/05/2025 foram submetidos os documentos:

1 Projeto\_mestrado\_CEP.pdf

2 PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_2456084.pdf

1) Riscos Pesquisador deve acrescentar aos riscos a possibilidade de esgotamento de material após realização da pesquisa e como pesquisador irá evitar este risco: PENDÊNCIA ATENDIDA

"Risco de dano ou perda das lâminas e blocos de biopsia [...] Também há a possibilidade de esgotamento de material após realização da pesquisa, assim, utilizaremos o mínimo de material necessário para as análises".

PÁGINA 8 DO ARQUIVO "PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_2456084.pdf" E

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222  
Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.430-230  
UF: CE Município: FORTALEZA  
Telefone: (85)3288-4478 Fax: (85)3288-4478 E-mail: cep.icc@ft.edu.br

**INSTITUTO DO CÂNCER DO  
CEARA - ICC**



Continuação do Parecer: 7.672.520

dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período mínimo de 5 (cinco) anos após o término da pesquisa; V - apresentar no relatório final que o projeto foi desenvolvido conforme delineado, justificando, quando ocorridas, a sua mudança ou interrupção. Este relatório final deverá ser protocolado via notificação na Plataforma Brasil.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_2456084.pdf	21/05/2025 20:42:49		Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto_mestrado_CEP.pdf	21/05/2025 20:41:48	ANA MIRIAN DA SILVA CAVALCANTE	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_cep.pdf	01/04/2025 21:42:28	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_CEP.pdf	01/04/2025 21:41:19	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_cep.pdf	01/04/2025 21:23:31	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Outros	Termo_fiel_depositario.pdf	01/04/2025 21:04:04	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Outros	PARECER_CTC_assinado.pdf	01/04/2025 21:01:52	Thinali Sousa Dantas	Aceito
Folha de Rosto	folha_derosto.pdf	01/04/2025 20:59:35	Thinali Sousa Dantas	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222  
 Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.430-230  
 UF: CE Município: FORTALEZA  
 Telefone: (85)3288-4478 Fax: (85)3288-4478 E-mail: cep.icc@ft.edu.br