



**UNIVERSIDADE CHRISTUS CURSO  
DE ODONTOLOGIA**

**GLADYSON LUCAS RODRIGUES AGUIAR**

**INFLUÊNCIA DA IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO COMPLEXO  
MISMATCH REPAIR NO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA B (NFkB)  
NOS CÂNCERES DE BOCA E DE OROFARINGE**

**FORTALEZA**

**2026**

GLADYSON LUCAS RODRIGUES AGUIAR

INFLUÊNCIA DA IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO COMPLEXO  
MISMATCH REPAIR NO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA B (NFkB)  
NOS CÂNCERES DE BOCA E DE OROFARINGE

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

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)

A282i

Aguiar, Gladyson Lucas Rodrigues.

Influência da imunexpressão das proteínas do complexo mismatch repair no fator de transcrição nuclear kappa b (nfb) nos cânceres de boca e de orofaringe / Gladyson Lucas Rodrigues Aguiar. - 2026.

59 f. : il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Centro Universitário Christus - Unichristus, Curso de Odontologia, Fortaleza, 2026.

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

1. Neoplasias orofaríngeas. 2. Neoplasias bucais. 3. DNA Mismatch Repair. 4. Proteínas MutS. 5. Proteínas MutL. I. Título.

CDD 617.6

GLADYSON LUCAS RODRIGUES AGUIAR

INFLUÊNCIA DA IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO COMPLEXO  
MISMATCH REPAIR NO FATOR DE TRANSCRIÇÃO NUCLEAR KAPPA B (NFkB)  
NOS CÂNCERES DE BOCA E DE OROFARINGE

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

Orientador Prof. Dr. Paulo Goberlânio  
de Barros Silva.

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva (Orientador)

Universidade Christus

---

Prof. Dr. Dayrine Silveira de Paula

Universidade Christus

---

Prof. Dr. Edson Luiz Cetira Filho

Universidade Christus

## RESUMO

Os cânceres de boca e de orofaringe representam a predominante maioria dos tumores malignos de cabeça e pescoço e tendo em vista que vias inflamatórias podem exercer importante papel no seu prognóstico, Avaliar a associação entre a imunexpressão de proteínas do complexo Mismatch Repair nos Fatores de Transcrição NFkB nos cânceres de boca (CEC-b) e de orofaringe (CRC-o) .Foram selecionados 76 CEC-b e 52 CRC-o peças cirúrgicas cujos dados sociodemográficos como idade, sexo, grau de instrução, estado civil, profissão, raça/cor, tipo de entrada no hospital, religião, consumo de álcool e fumo foram levantados. As amostras foram submetidas a imuno-histoquímica para NF-kB p65 MSH2, MSH6, PMS2 e MLH1 em seguida contagem de células imunopositivas em núcleo e/ou citoplasma. Testes qui-quadrado, Log-Rank Mantel-Cox e regressão de Cox foram usados ( $p < 0,05$ ). Os tumores pT3-pT4 apresentaram perda de expressão de MLH1 ( $p = 0,031$ ) comparado com os tumores pT1-pT2 e os tumores com metástase nodal apresentaram perda de expressão de p53 ( $p = 0,010$ ) (Tabela 2) .Nos tumores de orofaringe p16+ os pacientes com idade  $< 60$  anos ( $82.77 \pm 21.11\%$ ) apresentaram perda de expressão de MLH1 que os pacientes com idade superior a 60 anos ( $82.77 \pm 21.11\%$ ,  $p = 0,042$ ) e os pacientes com tumores pT3-pT4 ( $21.89 \pm 31.74\%$ ) apresentaram menor expressão de MSH6 que os pacientes com tumores pT1-pT2 ( $67.09 \pm 21.30$ ,  $p = 0,002$ ) (Material Suplementar 2). A perda de expressão de MMR está associada com progressão tumoral e prognóstico em tumores de cabeça e pescoço e p53, p16 e NFkB parecem ser intermediários importantes.

**Palavras-chave:** Neoplasias orofaríngeas; Neoplasias bucais; DNA Mismatch Repair; Proteínas MutS; Proteínas MutL.

## ABSTRACT

Oral and oropharyngeal cancers represent the predominant majority of malignant head and neck tumors, and considering that inflammatory pathways can play an important role in their prognosis, this study aimed to evaluate the association between the immunoexpression of Mismatch Repair complex proteins in NF- $\kappa$ B transcription factors in oral (b-squamous cell carcinoma - SCC) and oropharyngeal (o-squamous cell carcinoma - O-squamous cell carcinoma) cancers. Seventy-six b-squamous cell carcinomas and fifty-two o-squamous cell carcinomas were selected, and sociodemographic data such as age, sex, education level, marital status, profession, race/color, type of hospital admission, religion, alcohol consumption, and smoking habits were collected. The samples were subjected to immunohistochemistry for NF- $\kappa$ B p65, MSH2, MSH6, PMS2, and MLH1, followed by counting of immunopositive cells in the nucleus and/or cytoplasm. Chi-square, Log-Rank Mantel-Cox, and Cox regression tests were used ( $p < 0.05$ ). pT3-pT4 tumors showed loss of MLH1 expression ( $p = 0.031$ ) compared to pT1-pT2 tumors, and tumors with nodal metastasis showed loss of p53 expression ( $p = 0.010$ ) (Table 2). In p16+ oropharyngeal tumors, patients under 60 years of age ( $82.77 \pm 21.11\%$ ) showed less loss of MLH1 expression than patients over 60 years of age ( $82.77 \pm 21.11\%$ ,  $p = 0.042$ ), and patients with pT3-pT4 tumors ( $21.89 \pm 31.74\%$ ) showed lower MSH6 expression than patients with pT1-pT2 tumors ( $67.09 \pm 21.30$ ,  $p = 0.002$ ) (Supplementary Material 2). Loss of MMR expression is associated with tumor progression and prognosis in head and neck tumors, and p53, p16, and NF $\kappa$ B appear to be important intermediaries.

**Keywords:** Oropharyngeal neoplasms; Oral neoplasms; DNA mismatch repair; MutS proteins; MutL proteins.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 CÂNCER</b> .....	<b>9</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>11</b>
<b>2.1 CÂNCER DE BOCA E OROFARINGE E SEUS MARCADORES BIOLÓGICOS</b> .....	<b>11</b>
<b>2.2 COMPLEXO PROTEICO MISMATCH REPAIR</b> .....	<b>13</b>
<b>3 PROBLEMA DE PESQUISA, JUSTIFICA E RELEVÂNCIA DO PROJETO</b> .....	<b>17</b>
<b>4 HIPÓTESES</b> .....	<b>19</b>
<b>5 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>5.1 OBJETIVO GERAL:</b> .....	<b>20</b>
<b>5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:</b> .....	<b>20</b>
<b>6 METODOLOGIA</b> .....	<b>21</b>
<b>6.1 CENÁRIO DO ESTUDO</b> .....	<b>21</b>
<b>6.2 DELINEAMENTO AMOSTRAL</b> .....	<b>21</b>
<b>6.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO E COLETA DE DADOS</b> .....	<b>21</b>
<b>6.4 COLETA DE DADOS SOCIODEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS</b> .....	<b>22</b>
<b>6.5 PROCESSAMENTO E ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA</b> .....	<b>23</b>
<b>6.6 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA</b> .....	<b>24</b>
<b>6.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>24</b>
<b>7 RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
<b>7.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA DE PACIENTES COM CEC DE BOCA E OROFARINGE SUBMETIDOS A ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO EIXO MMR-NFkB</b> .....	<b>26</b>
<b>7.2 INFLUÊNCIA DA LOCALIZAÇÃO E DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS NA IMUNOEXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DO EIXO MMR-NFkB EM PACIENTES COM CEC DE BOCA E OROFARINGE</b> .....	<b>26</b>
<b>7.3 INFLUÊNCIA DA LOCALIZAÇÃO, DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E DA IMUNOEXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DO EIXO MMR-NFkB NA SOBREVIDA GLOBAL DE PACIENTES COM CEC DE BOCA E OROFARINGE</b> .....	<b>28</b>

<b>8 DISCUSSÃO .....</b>	<b>30</b>
<b>8.1 FATORES AMBIENTAIS .....</b>	<b>30</b>
<b>8.2 INFLUÊNCIA DA LOCALIZAÇÃO E DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS NA     IMUNOEXPRESSION DE PROTEÍNAS DO EIXO NFkB-P53-P16 E KI-67 EM PACIENTES COM     CEC DE BOCA E OROFARINGE .....</b>	<b>30</b>
<b>8.3 INFLUÊNCIA DO CONSUMO DO ÁLCOOL E FUMO ASSOCIADO A LOCALIZAÇÃO E AS     CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS TUMORES .....</b>	<b>32</b>
<b>8.4 INFLUÊNCIA DAS PROTEÍNAS DO COMPLEXO MISMATCH REPAIR COM A PROGRESSÃO     TUMORAL.....</b>	<b>32</b>
<b>8.5 INFLUÊNCIA DA IMUNOEXPRESSION DE PROTEÍNAS DO EIXO MMR-NFkB NOS     PACIENTES COM CEC DE BOCA E OROFARINGE .....</b>	<b>34</b>
<b>8.6 INFLUÊNCIA DA IMUNOEXPRESSION DE PROTEÍNAS DO EIXO MMR-NFkB-P53-KI-67     NOS PACIENTES COM CEC DE BOCA E OROFARINGE .....</b>	<b>35</b>
<b>9 CONCLUSÃO .....</b>	<b>37</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>38</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

O câncer representa uma doença de grande preocupação, devido sua alta incidência e elevada mortalidade sendo, atualmente, considerado como a segunda maior causa de morte no mundo, sendo ultrapassado apenas pelas doenças coronarianas (Scully, 2005). Devido a isso, apresenta grande relevância em pesquisas científicas e tem sido grande alvo de inúmeros estudos e investigações. Espera-se para o ano de 2020, 15 milhões de novos casos de câncer, com cerca de 10 milhões de mortes (Warnakulasuria, 2009) e a Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de novos casos, 17 milhões de mortes relacionadas e 75 milhões de pessoas vivendo com câncer, anualmente, com a doença. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de média e baixa renda (Souza *et al.*, 2011; Petersen, 2008).

Em países com grande volume de recursos financeiros, predominam os cânceres de pulmão, mama, próstata e cólon. Em países de baixo e médio recursos, os cânceres predominantes são os de estômago, fígado, cavidade oral e colo do útero. Mesmo na tentativa de se criar padrões mais característicos de países ricos em relação aos de baixa e média renda, o padrão está mudando rapidamente, e vem-se observando um aumento progressivo nos cânceres de pulmão, mama, cólon e reto, os quais, historicamente, não apresentavam essa importância e magnitude (Scully, 2005).

O câncer oral e de orofaringe, agrupados, são o sexto tipo de câncer mais comum no mundo e em países de alto risco, como Sri Lanka, Índia, Paquistão e Bangladesh, o câncer bucal é o câncer mais comum em homens, contribuindo com até 25% de todos os novos casos. Em uma visita a um centro de tratamento de neoplasias em qualquer um desses países de alto risco no sul da Ásia, pode-se achar até um quarto dos pacientes com câncer sendo estes de boca (Warnakulasuria, 2009; Petersen, 2008).

No Brasil, o câncer gera enormes gastos ao Sistema Único de Saúde (SUS). Esse tema ganha relevância pelo perfil epidemiológico que essa doença vem

apresentando, e, com isso, conquista espaço nas agendas políticas e técnicas de todas as esferas de governo. O conhecimento sobre a situação dessa doença permite estabelecer prioridades e alocar recursos de forma direcionada para a modificação positiva desse cenário na população brasileira, visto que o câncer tem representado quase 17% dos óbitos de causa conhecida notificados em 2007 no sistema de informações sobre mortalidade e que o contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, pode afetar de forma significativa o impacto do câncer no mundo (Scully, 2005).

O câncer oral é uma doença grave e de incidência crescente. Essas lesões, muitas vezes, são diagnosticadas tardiamente o que leva a um prognóstico pobre. Por conseguinte, o tratamento é mutilante, gerando sequelas estéticas e funcionais, com grande impacto sobre a qualidade de vida e saúde psicológica dos pacientes acometidos. Isso faz do diagnóstico precoce um fator determinante na sobrevida e qualidade de vida da população com essa condição (Lambert *et al.*, 2011).

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Câncer de boca e orofaringe e seus marcadores biológicos

O tipo histológico mais prevalente no câncer de boca e de orofaringe é o Carcinoma de Células Escamosas (CCE), que representa aproximadamente 95% das neoplasias malignas desta região e cerca de 38% dos tumores malignos da cabeça e pescoço, sendo o subtipo histológico moderadamente diferenciado o mais frequente. O risco de desenvolvimento desta lesão aumenta com a idade e a maioria dos casos ocorrem em indivíduos acima de 50 anos (Zini *et al.*, 2010).

A etiologia do câncer de boca é razoavelmente bem definida, vários agentes têm sido implicados no seu desenvolvimento, na qual a combinação de fatores extrínsecos e intrínsecos parecem ampliar o seu potencial de estimulação na divisão celular, a qual de maneira desgovernada dá origem ao tumor. São fatores etiológicos que podem ser associados a essa neoplasia o tabaco, o álcool, a susceptibilidade genética, os agentes infecciosos, radiação, lesões potencialmente malignas (LPM), má nutrição e alguns fatores ocupacionais. Os principais fatores de risco o tabagismo e o consumo de álcool, que quando associados podem aumentar o efeito carcinogênico (Durazzo *et al.*, 2005). Lábio, língua, soalho bucal são as localizações comuns, tendo o câncer de lábio um melhor prognóstico (mais de 90% dos pacientes vivendo por 5 anos) em comparação aos tumores de outros sítios (Lydiatt *et al.*, 2017).

O câncer de orofaringe possui etiologia delineada. O fumo de tabaco associado a álcool é o mais importante fator de risco para o desenvolvimento desses tumores, porém, já é bem definida a relação de causalidade com o papiloma virus humano (HPV) (Lydiatt *et al.*, 2017). Práticas de sexo desprotegido e aumento da idade elevam também a incidência do câncer de orofaringe (Nguyen *et al.*, 2016). As principais localizações são base da língua, tonsilas linguais e paredes laterais/posteriores da orofaringe (Dedivitis *et al.*, 2016). Além disso a idade atua como importante predisponente e quando há associação ao HPV o prognóstico mostra-se significativamente melhor que os casos não associados ao HPV (Lydiatt *et al.*, 2017).

Em ambos os tipos, o CCE evolui a partir de um complexo processo resultante da exposição a agentes carcinogênicos que inclui várias etapas constituídas de mudanças genéticas, epigenéticas e metabólicas. Exposição crônica a esses agentes levam a instabilidade genética nas células epiteliais, com desenvolvimento de LPM e, posteriormente, ao carcinoma invasivo. Muitos estudos têm revelado o importante papel desempenhado por proto-oncogenes e genes supressores tumorais durante o curso de evolução do câncer oral (Jadotte, 2012). As LPM estão associadas ao processo de carcinogênese, por conta de suas alterações displásicas. As leucoplasias e eritroplasias, são as principais desordens envolvidas no surgimento de lesões malignas intraorais e de orofaringe e a queilite actínica em lábio (Bombeccari *et al.*, 2011; Lodi *et al.*, 2005).

O prognóstico do câncer de boca e de orofaringe são significativamente distintos o que se deve provavelmente aos seus diferentes comportamentos biológicos. Chen *et al.* (2007) observou que a sobrevida de pacientes com câncer de boca é quase duas vezes menor que a sobrevida dos pacientes com câncer de orofaringe e que, inclusive, a resposta a radioterapia é diferente, apresentando melhor resposta terapêutica e, por conseguinte, melhor prognóstico em lesões de orofaringe.

Apesar de um prognóstico nitidamente diferente, a diferença entre o comportamento biológico dos tumores nas diferentes localizações ainda não é bem definida. A expressão de proteínas de proliferação celular convencionais como o Ki-67 e a p53 não mostra diferença significativa entre esses dois tipos de cânceres. Proteínas associadas a degradação do microambiente tumoral como colágeno tipo IV e alfa-actina de músculo liso também não mostram comportamento diferente entre ambos (Rivera *et al.*, 2014). Todavia, perspectivas distintas surgem quando proteínas afetadas pelo HPV são estudadas: a proteína de proliferação p16 (Lydiatt *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm demonstrado que em se tratando de orofaringe a ausência da proteína p16 exerce importante papel preditor de um pobre prognóstico (Lydiatt *et al.*, 2017). A proteína p16 é uma importante moduladora negativa do ciclo celular, participando através do bloqueio da ciclina D1 inativando parcialmente a fosforilação da pRb (proteína do retinoblastoma) que faz com que a célula entre em atividade de mitose. Além de ser um importante preditor da infecção pelo HPV em

orofaringe e de ter pouca importância como marcador de prognóstico no câncer intra-oral (Silgley *et al.*, 2017), sua identificação por técnicas de imuno-histoquímica está associada a uma sobrevida cinco vezes maior, independente da presença ou não do HPV (Lydiatt *et al.*, 2017).

Anormalidades de p16 estão associadas a uma série de proteínas de correção do genoma humano. Os genes MMR (DNA mismatch repair) codificam uma série de proteínas de correção de mutações do material genético, das quais as mais importantes são as MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. Tendo sido demonstrado que a redução da imunexpressão dessas proteínas de correção está associada a aumento da frequência de perda de heterozigosidade da p16 e acúmulo de uma série de mutações genéticas, o que ocorre paralelamente à carcinogênese e ao aumento do grau de desdiferenciação microscópica em carcinomas gástricos, por exemplo (Lu *et al.*, 2014).

Alterações afetando proteínas de controle do ciclo celular e enzimas de correção de falhas no material genético têm sido estudadas e relacionadas com o prognóstico de uma série de tumores apresentando um importante perspectiva (Brinkman e Wong, *et al.*, 2006; Jadotte, 2012). No entanto, estudos relacionados ao prognóstico e carcinogênese dos cânceres de boca e orofaringe são ainda inconclusivos.

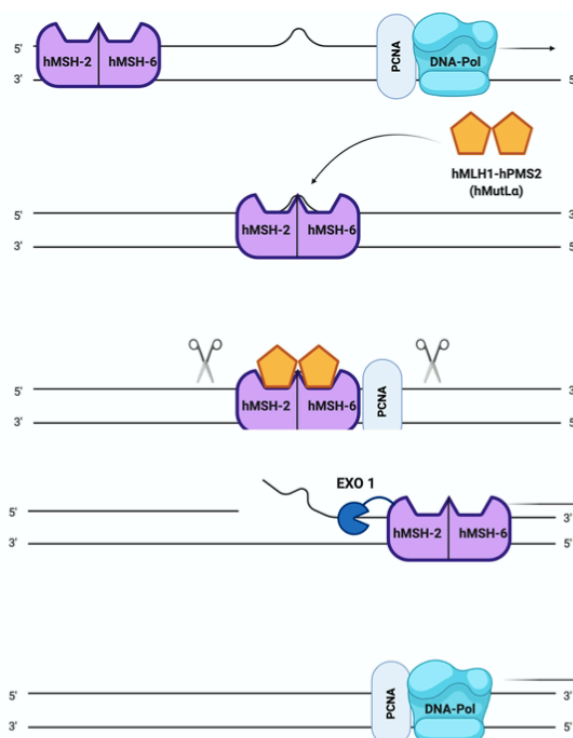
## **2.2 Complexo proteico mismatch repair**

O genoma de cada célula do corpo humano está em constante ameaça de fatores epigenéticos que podem vir a causar instabilidades, sendo a preservação da integridade genômica um mecanismo crucial para a sobrevivência e perpetuação das espécies (Reinhardt *et al.*, 2012). Erros no reparo dessas mutações podem levar a alterações genéticas que, por sua vez, podem ser o elemento chave para o desenvolvimento de diversos cânceres (Christmann *et al.*, 2003).

O complexo sistema *mismatch repair* (MMR), formado por diversos genes, codifica uma série de proteínas de correção de mutações do material genético (Kinsella, 2009). Essas proteínas atuam de maneira conjunta, formando complexos

que são chamados *MutL homologues* e *MutS homologues*. Esses complexos são formados por dímeros proteicos, e cada um deles desempenha diferentes funções. De maneira geral, o complexo MMR é formado por quatro grupos ou subunidades: MutS $\alpha$  (hMSH2+hMSH6), MutS $\beta$  (hMSH2+hMSH3), MutL $\alpha$  (hMLH1+hPMS2) e MutL $\beta$  (hMLH1+hMLH3) (Wagner *et al.*, 2016; Christmann *et al.*, 2003).

Figura 1- Representação esquemática do funcionamento da via MMR.



Fonte: Cilona *et al.*, 2020.

A via MMR é responsável pela remoção de incompatibilidades de base causadas por erros espontâneos e erros induzidos de desaminação, oxidação, metilação e de replicação de bases (Christmann *et al.*, 2003). Os subprocessos por eles desenvolvidos se iniciam pelo reconhecimento de danos do DNA por parte do MutS $\alpha$  (hMSH2+hMSH6) ou MutS $\beta$  (hMSH2+hMSH3), seguido de excisão do erro, que é iniciada pela ligação de MutL $\alpha$  (hMLH1+hPMS2) ou MutL $\beta$  (hMLH1+hMLH3) ao MutS, ocorrendo, subsequentemente, um recrutamento da exonuclease 1 (EXO 1). Esta remove a fita de DNA contendo a base incorreta, sendo feita uma ressíntese do DNA através do DNA polimerase. O processo é então finalizado pela interação das

proteínas: proteína de replicação A (PRA) e antígeno de proliferação celular (PCNA), com selamento pela DNA ligase (Kinsella *et al.*, 2009) (Figura 1).

Uma relação entre a disfunção dessas proteínas e o desenvolvimento de diversos cânceres foi apresentado por vários autores (Friedrich *et al.*, 1999; Hamid *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2008; Kinsella *et al.*, 2009; Aronson *et al.*, 2015; Wagner *et al.*, 2016; Vasan *et al.*, 2019). O silenciamento epigenético de proteínas chaves do sistema MMR foi relacionado com progressão tumoral em carcinomas de colo retal (Aronson *et al.*, 2015), carcinomas gástricos (Li *et al.*, 2008), tumores endometriais (Hamid *et al.*, 2002), câncer de ovário (Friedrich *et al.*, 1999), câncer de pulmão (Li *et al.*, 2013), tumores malignos de glândulas salivares (Castrilli *et al.*, 2002), cânceres de cabeça e pescoço (Ghosh *et al.*, 2010) e câncer de boca (Wagner *et al.*, 2016; Vasan *et al.*, 2019).

A não eficiência desse sistema tem como produto a instabilidade de microsatélites (MSI). No carcinoma de colorretal, quando há perda de heterozigose na região promotora dos genes MMR, a predisposição para o desenvolvimento das neoplasias se mostra associada à perda do alelo nativo, resultando em deficiência no sistema MMR. Como consequência, o paciente apresenta uma maior suscetibilidade à MSI, e conseqüentemente, o acúmulo de mutações gênicas, decorrentes de todo o processo, pode favorecer a progressão tumoral (Liu *et al.*, 2015; Nunn *et al.*, 2003). Níveis aumentados de instabilidade genômica são um marco das deficiências do sistema MMR, fato este demonstrado com estudos em fungos (Shcherbakova e Kunkel, 1999), em ratos (Fukuhara *et al.*, 2015) e em humanos (Li *et al.*, 2008; Czerninski *et al.*, 2009; Amaral-Silva *et al.*, 2017).

A literatura atual traz achados sólidos com relação ao carcinoma de colorretal. Em estudos com tumores benignos, observou-se que metilação de MLH1 é diretamente associada à perda de sua expressão e ao surgimento de adenomas (Beggs *et al.*, 2013) e de polipose intestinal (Patel *et al.*, 2017), as quais são importantes lesões pré-malignas para o carcinoma colorretal. Em pacientes com carcinoma colorretal já estabelecido, a mutação de genes da família MMR (MSH2, MSH6, MLH1) levou à redução do tempo livre de doença após início do tratamento (Li *et al.*, 2008).

Com relação a cânceres de cabeça e de pescoço, alguns poucos trabalhos deram início ao estudo da via MMR. A grande maioria trouxe evidência do papel das proteínas MMR na carcinogênese oral através de estudos com lesões potencialmente malignas (Caldeira, *et al.*, 2011a; 2011b; Jessri *et al.*, 2015a, 2015b; Chaudhari *et al.*, 2016). Entretanto, poucos são os estudos que avaliaram a expressão dessas proteínas em tecidos tumorais de câncer de boca (Jessri *et al.*, 2015<sup>a</sup>, 2015b; Wagner *et al.*, 2016b; Vasan *et al.*, 2019; Decker *et al.*, 2020), não havendo estudos evidenciando seu papel nos tumores de orofaringe.

Recentemente estudos demonstraram que a ativação de proteínas do complexo MMR são capazes de ativar fatores de transcrição de citocinas e fatores de crescimento como o fator nuclear kappa B (NFkB) (Fonseca *et al.*, 2020). O NFkB é um heterodímero formado por duas subunidades a p65 e a p50 que se encontram inativas no citoplasma celular. Uma vez ativada, a subunidade p65 transloca para o interior do núcleo onde proteínas como NOD1 e NOD2 levam a oligomerização, isto é acoplagem do NF-kB em filamentos de DNA no qual serão ativados a produção de citocinas, fatores de crescimento e estimulados a ativação do ciclo celular e bloqueio de vias de apoptose 1 (Correa *et al.*, 2012).

A oligomerização de NFkB leva a ativação de diversas vias paralelas que culminam na ativação de fatores de transcrição, como p38-MAPK, pJNK, ERK, que por sua vez estão associadas a internalização nuclear de c-JUN e c-FOS, culminando com a ativação da síntese de citocinas mediadas por AP-1, e inativação de ikBa, com internalização da fracção p65 do NFkB. Por vias não canônicas, ainda há produção dos interferons por meio de fosforilação de TRAF, que culminam com internalização nuclear e heterodimerização de IRF3 e IRF7 e produção de interferon. A ativação de NFkB leva a produção de uma série de citocinas da resposta imune inata, que são importantes durante a carcinogênese (Correa *et al.*, 2012).

Uma vez que o NFkB está diretamente associado a carcinogênese, bem como as proteínas do complexo MMR, e que diversos estudos tem demonstrado que em cabeça e pescoço a superexpressão de ambas as pode estar associada a pior sobrevida, esse estudo objetiva avaliar a relação.

### 3 PROBLEMA DE PESQUISA, JUSTIFICA E RELEVÂNCIA DO PROJETO

O Câncer por se tratar de uma doença de grande incidência e elevada mortalidade, um dos 10 cânceres mais comuns do mundo é o câncer em cavidade oral que tem um diagnóstico tardio e mau prognóstico, um dos cânceres mais presentes em cavidade oral se trata do carcinoma epidermoide (carcinoma espinocelular) que representa mais de 90% das neoplasias malignas orais. A taxa estimada de sobrevivência varia de 54% a 88% a depender do sítio do câncer.

Vários estudos vêm sendo desenvolvidos no intuito de compreender e elucidar os mecanismos de ação dos cânceres para que seja possível utilizar de terapias que resultem em um melhor prognóstico para os pacientes acometidos. Fisiologicamente o nosso organismo utiliza do complexo *Mismatch Repair* (MMR) para solucionar problemas na fita de DNA impedindo assim a proliferação de células com a falha no DNA.

O complexo *Mismatch Repair* (MMR) é um conjunto de genes que codificam proteínas no intuito de realizar um reparo na dupla fita de DNA através dos seus subprocessos sendo eles os MutS $\alpha$  (hMSH2+hMSH6) ou MutS $\beta$  (hMSH2+hMSH3) responsáveis pela identificação do erro, e em seguida a ligação de MutL $\alpha$  (hMLH1+hPMS2) ou MutL $\beta$  (hMLH1+hMLH3) ao MutS, o que iniciará o recrutamento de enzimas que realizarão o reparo na fita de DNA.

Alguns agentes químicos como quimiocinas e citocina podem estar diretamente associadas com pior prognóstico para o câncer tendo em vista que estes podem agir diretamente na angiogênese e na mutação tumoral. Parte da transcrição de genes que modulam a liberação desses agentes químicos é mediada pelo fator de transcrição nuclear Kappa B (NF $\kappa$ B).

O NF $\kappa$ B é formado por um heterodímero p65 e p50, esses se encontram inativos no citoplasma devido a ligação do I $\kappa$ B, a fosforilação do I $\kappa$ B pelo proteossoma 26s libera NF $\kappa$ B permitindo que esse realize a sua função nuclear.

Tendo em vista a associação desses complexos o objetivo desse estudo é estudar e avaliar a associação entre a imunexpressão de proteínas do complexo *Mismatch Repair* nos Fatores de Transcrição NF $\kappa$ B nos cânceres de boca e de orofaringe. Em busca de evidenciar uma associação entre a expressão desses

mecanismos a um prognóstico positivo ou negativo, no intuito de oferecer de forma individualizada um melhor tratamento para todos os pacientes acometidos de câncer de orofaringe, conseqüentemente melhorando os seus prognósticos.

#### **4 HIPÓTESES**

H0: Não existe associação entre a imunexpressão de proteínas do complexo Mismatch Repair nos Fatores de Transcrição nuclear kappa B (NFkB) nos cânceres de boca e de orofaringe

H1: Existe associação entre a imunexpressão de proteínas do complexo Mismatch Repair nos Fatores de Transcrição nuclear kappa B (NFkB) nos cânceres de boca e de orofaringe

## **5 OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo geral:**

Avaliar a associação entre a imunexpressão de proteínas do complexo Mismatch Repair nos Fatores de Transcrição NFkB nos cânceres de boca e de orofaringe.

### **5.2 Objetivos específicos:**

- Avaliar a imunexpressão de proteínas do complexo Mismatch Repair nos cânceres de boca e orofaringe
- Avaliar a imunexpressão dos fatores de transcrição NFkB nos cânceres de boca e orofaringe
- Correlacionar a imunexpressão de proteínas do complexo Mismatch Repair e dos fatores de transcrição NFkB nos cânceres de boca e orofaringe
- Avaliar o impacto da imunexpressão proteínas do complexo Mismatch Repair e dos fatores de transcrição NFkB na sobrevida global de pacientes com cânceres de boca e orofaringe

## **6 METODOLOGIA**

### **6.1 Cenário do estudo**

Trata-se de um estudo quantitativo, observacional, de corte longitudinal, e de natureza retrospectiva no qual foram selecionados os dados dos pacientes diagnosticados/tratados com carcinomas de boca e orofaringe adenoide, no período de 1º de janeiro de 2017 a 31 de dezembro de 2012 (cinco anos) no Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), um Centro de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (CACON) no Nordeste Brasileiro.

Esse estudo apresentado foi construído com base no delineamento proposto pela STROBE-checklist (Malta *et al.*, 2010), um guia internacional de condução de estudos observacionais e foi aprovada pelo Comitê de Ética do Hospital Haroldo Juaçaba fazendo parte de um projeto que contempla a análise de fatores de risco para efeitos adversos do tratamento oncológico em cavidade oral, cujo número de protocolo é 1.618.057 (ANEXO I). Todas as fases do estudo foram realizadas em consonância com a lei 466/12 da legislação de ética em pesquisa, sendo garantido o sigilo das informações oriundas dos prontuários dos pacientes e guarda delas até o fim do estudo.

### **6.2 Delineamento amostral**

Nesta fase do estudo foram selecionadas amostras de CEC de boca e orofaringe e para isso, um cálculo amostral foi realizado com base no estudo de Visioli *et al.* (2022) que mostrou que em cânceres de cabeça e pescoço foi estimando a necessidade de 50 amostras de cada sítio tumoral para obter 80% de poder e 95% de confiança (teste t de Student).

### **6.3 Critérios de inclusão e exclusão e coleta de dados**

Selecionamos lâminas histológicas de CEC de boca e orofaringe do Laboratório de Patologia do ICC e após revisão das lâminas, incluímos no grupo controle apenas amostras oriundas de ressecções de CCE de cabeça e pescoço.

Após avaliação dos blocos parafinados, foram excluídos os blocos que não apresentaram material suficiente imunohistoquímica e após revisão dos prontuários clínicos, foram excluídos os casos de pacientes que não foram tratados no ICC (biópsias externas) e pacientes que receberam terapias neoadjuvantes. O período de inclusão do material foram de 2017 à 2022.

Os blocos e lâminas selecionados, foram levantados os dados demográficos e clínicos dos prontuários médicos dos pacientes a qual pertencerem. As lâminas histológicas das biópsias excisionais foram avaliadas para reclassificação dos CEC por um patologista com experiência (>10 anos de patologia oral), após avaliação do grau de concordância intraexaminador (coeficiente kappa). Sendo adotada a classificação com base nas recentes sugestões da OMS.

#### **6.4 Coleta de dados sociodemográficos e clínicos**

Dados sociodemográficos como idade, sexo, grau de instrução, estado civil, profissão, raça/cor, tipo de entrada no hospital (convênio/particular ou SUS) e religião foram levantados, assim como dados clínico-patológicos como variante histológica do tumor, localização primária, TNM, estadiamento tumoral e tratamento realizado, dados estes fornecidos através dos prontuários dos pacientes.

O tipo histológico do tumor primário foi reclassificado de acordo com a nova classificação proposta por Lydiatt e seus colaboradores em 2017 (Lydiatt *et al.*, 2017). A localização do tumor primário foi classificada conforme recomendado pela OMS pela classificação internacional das doenças CID-0 em: glândulas salivares maiores: glândula parótida, glândula submandibular, glândula sublingual e outras glândulas salivares maiores, glândulas salivares menores, lábio, língua, palato, assoalho de boca e outras partes e partes não identificadas na boca (Brasil, 2005). O TNM do tumor foi definido conforme as novas diretrizes propostas pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC), que determina TNM sendo T referente ao tamanho do tumor, N ao acometimento linfonodal e M relacionado a metástases a distância (Lydiatt *et al.*, 2017), levando em consideração as especificidades de cada patologia.

Adicionalmente as lesões foram classificadas conforme os estádios propostos pela mesma entidade: estágio I; estágio II; estágio III; e estágio IV, que engloba os

estádios IVA, IVB e IVC (Lydiatt *et al.*, 2017). Também foi calculada a sobrevida global, obtida através da diferença entre a data do início do tratamento (dia, mês e ano) e a data do óbito (dia, mês e ano) ou final do *follow up*, utilizando para fins de análise estatística a quantidade de meses entre essas datas (Dantas *et al.*, 2016). Da mesma forma, foi calculada a sobrevida livre de doença através da diferença entre a data do início do tratamento (dia, mês e ano) e a data da recidiva local ou desfecho do *follow up* (dia, mês e ano).

### **6.5 Processamento e análise Imuno-histoquímica**

Os blocos das lâminas selecionados foram submetidos a cortes sequenciais de 4 µm de espessura depositados em lâminas silanizadas de vidro, para realização de coloração convencional por hematoxilina-eosina e para reações de imuno-histoquímica.

Foram feitos 7 cortes para reação de imuno-histoquímica e um para coloração por hematoxilina-eosina, e a reação de imuno-histoquímica será realizada através da técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Após desparafinização e reidratação, será realizada recuperação antigênica com solução de 0,1M de tris-EDTA pH 9,0 em banho maria a 97°C durante 30 minutos.

Após resfriamento das lâminas à temperatura ambiente e duas lavagens de cinco minutos cada com solução tampão de fosfato 0,1M pH7,3 (PBS), foram realizados: bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% diluído em PBS por 30 minutos em ambiente escuro, novas lavagens na solução tampão e incubação overnight com os anticorpos primários de acordo com as diluições determinadas na literatura ou por reações em estudo piloto: MSH2 (Clone FE11, Envision, Dako®), MSH6 (Clone EP49, Envision, Dako®), PMS2 (Clone EP51, Envision, Dako®), MLH1 (Clone ES05, Envision, Dako®), NF-kB (ab16502, Abcam®).

Após incubação com o anticorpo primário por tempo determinado pelo fabricante, as lâminas foram lavadas (PBS) e incubadas com anticorpo biotilado por 30 minutos e, após lavagem, incubadas com conjugado de peroxidase avidina-biotina ou sistema Envision® por 30 minutos. A revelação será realizada por meio de incubação com 3,3'-Diamino-benzidina (DAB) (Abcam®) e a contracoloração com hematoxilina de

Harris 7% por 10 segundos. Após coloração e contracoloração, as lâminas foram lavadas em água corrente, desidratadas, diafanizadas e montadas com Entellam®.

Ainda foram feitos controles negativos, lâminas de TMA utilizando a mesma técnica de imuno-histoquímica descrita anteriormente, porém omitindo a etapa de incubação com o anticorpo primário. Assim como controles positivos em tecidos indicados pela bula dos anticorpos utilizados.

## 6.6 Análise imuno-histoquímica

A presença da cor marrom acastanhado foi utilizada como parâmetro de marcação de antígeno em todas as amostras. Para avaliação microscópica, foram fotografados dez campos (*hot spots*) por corte histológico (Leica DM 2000®) (Zhang *et al.*, 2015).

A análise da imunocoloração foi realizada de maneira quantitativa. Foi feita uma contagem das células com núcleos (nucleoplasma ou nucléolos) corados em marrom acastanhado, em valores absolutos e percentual, nos dez campos (Dantas *et al.*, 2018) usando o comando *cell conter* no *software* Image J (Análise de Imagem e Processamento em Java - Rasband, WS, ImageJ, Institutos Nacionais de Saúde, Bethesda, Maryland, EUA).

## 6.7 Análise estatística

Os dados foram transcritos em uma planilha base no Microsoft Excel e exportados para o *software* Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 17.0. Foi adotada uma confiança de 95% na análise estatística. Foi calculada a sobrevida livre de doença pela diferença entre a data do início do tratamento (dia, mês e ano) e a data da progressão de doença (dia, mês e ano) ou último follow up.

Os dados categóricos foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e analisados dicotomicamente através do teste do qui-quadrado ou exato de Fisher. Os dados quantitativos foram analisados por meio do teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov, expressos em forma de média e desvio-padrão, comparados

por meio do teste de Mann-Whitney ou Kurskal-Wallis/Dunn e associados por meio da correlação de Spearman.

Para análise de sobrevida, além destes, foi utilizado o teste de Long-Rank Mantel-Cox (comparação das curvas de sobrevida de Kaplan-Meier). Adicionalmente, o modelo de regressão de Cox foi utilizado para análise multivariada.

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Caracterização da amostra de pacientes com CEC de boca e orofaringe submetidos a análise da expressão do eixo MMR-NFkB

A amostra total foi composta por 128 pacientes, dos quais 52 (40.6%) com CEC de orofaringe e 76 (59.4%) com CEC de boca. Dos pacientes com CEC de orofaringe 31 (24.5%) eram p16- e 21 (16.4%) eram p16+.

O sexo mais frequente foi o sexo masculino (n=88, 68.8%) e a idade mais frequente de pacientes entre 51-60 anos (n=43, 33.6%) em todos os tumores (p=0.488 e p=0.462, respectivamente). O grau de instrução mais frequentemente relatado foi o ensino fundamental com 119 (93.0%) dos pacientes. Os pacientes com câncer de boca apresentaram menor escolaridade que os pacientes com cânceres de orofaringe (p=0.027). O fumo foi descrito em metade da amostra (n=64, 50.0%) e os pacientes com câncer de boca apresentaram maior frequência de fumo que os pacientes com cânceres de orofaringe (p<0.001). O consumo de álcool foi descrito em 35 (27.3%) da amostra, mas não houve diferença significativa entre a localização dos tumores dos pacientes avaliados (p=0.329) (Tabela 1).

O estadiamento patológico mais frequente foi o pT4 (N=39, 30.5%) pN0 (n=58, 45.3%). Os pacientes com cânceres de orofaringe p16+ apresentaram maior frequência de pN1 que os pacientes com tumores de orofaringe p16- e os pacientes com câncer de boca maior frequência de pN2 que os demais grupos (p<0.001). Por consequência, RT adjuvante (p=0.036) e QT adjuvante (p=0.016) foram significativamente mais utilizados nos tumores de orofaringe p16+ e de boca que nos pacientes com tumores p16- (Tabela 1).

### 7.2 Influência da localização e de características clínico-patológicas na imunexpressão de proteínas do eixo MMR-NFkB em pacientes com CEC de boca e orofaringe

A expressão média para MSH2 (27,37±28,92%) foi significativamente menor que para MSH6 (34,08±31,86%) (p<0,001), mas a expressão de MLH1 (7,68±17,16%) não mostrou diferença significativa da expressão de PMS2 (6,46±16,61%) (p=0,539). A imunexpressão nuclear para NFkB p65 (6,37±11,39%)

foi significativamente menor que em citoplasma ( $75,51 \pm 24,86\%$ ) ( $p < 0,001$ ) gerando uma relação de expressão núcleo/citoplasma de  $0,12 \pm 0,29$ . A expressão média de ki67 ( $54,05 \pm 42,58\%$ ) também foi significativamente maior que a expressão de p53 ( $20,35 \pm 17,23\%$ ) ( $p < 0,001$ ) (Tabela 2).

Os tumores de boca e orofaringe p16+ apresentaram maior imunexpressão para NFkB p65 em núcleo ( $p = 0,044$ ) e p53 ( $p = 0,029$ ) que os tumores de orofaringe p16-. Os tumores de boca apresentaram maior imunexpressão para ki67 que os tumores de orofaringe ( $p < 0,001$ ). Sexo, idade e escolaridade não influenciaram significativamente na imunexpressão dos marcadores estudados, mas os tumores relacionados a fumo apresentaram perda de expressão citoplasmática de NFkB p65 ( $p = 0,031$ ) e aumento da imunexpressão de ki67 ( $p = 0,007$ ). Já os tumores associados à álcool mostraram perda de expressão de p53 ( $p = 0,032$ ) (Tabela 2).

Os tumores pT3-pT4 apresentaram perda de expressão de MLH1 ( $p = 0,031$ ) comparado com os tumores pT1-pT2 e os tumores com metástase nodal apresentaram perda de expressão de p53 ( $p = 0,010$ ) (Tabela 2). Nos tumores de orofaringe p16- apenas o fumo (presente =  $63,47 \pm 23,11$ ; ausente =  $82,77 \pm 21,11\%$ ) levou a perda de expressão citoplasmática de NFkB p65 ( $p = 0,043$ ) (Material suplementar 1). Nos tumores de orofaringe p16+ os pacientes com idade <60 anos ( $82,77 \pm 21,11\%$ ) apresentaram perda de expressão de MLH1 que os pacientes com idade superior a 60 anos ( $82,77 \pm 21,11\%$ ,  $p = 0,042$ ) e os pacientes com tumores pT3-pT4 ( $21,89 \pm 31,74\%$ ) apresentaram menor expressão de MSH6 que os pacientes com tumores pT1-pT2 ( $67,09 \pm 21,30$ ,  $p = 0,002$ ) (Material Suplementar 2). Em boca os tumores pT3-pT4 ( $3,93 \pm 10,64\%$ ) apresentaram menor expressão que os tumores pT1-pT2 ( $15,08 \pm 24,81\%$ ,  $p = 0,013$ ) e os tumores com metástase nodal ( $26,44 \pm 17,55\%$ ) apresentaram maior média de imunexpressão para ki67 que os tumores pN0 ( $15,98 \pm 16,13\%$ ,  $p = 0,014$ ) (Material Suplementar 3).

Houve correlação positiva significativa entre todas as proteínas do complexo MMR ( $p < 0,05$ ), exceto PMS2 e MSH6 ( $p = 0,141$ ). A imunexpressão nuclear de NFkB p65 foi diretamente correlacionada com a imunexpressão de MLH1 e PMS2 ( $p = 0,005$  e  $p = 0,006$ , respectivamente) e a relação núcleo/citoplasma de NFkB p65 mostrou correlação direta com MLH1 ( $p = 0,004$ ) (Tabela 3).

Nos tumores de orofaringe p16- MSH2 apenas se correlacionou com MSH6 ( $p < 0.001$ ) e PMS2 ( $p = 0.032$ ) e MPS2 se correlacionou com MLH1 ( $p = 0.048$ ). A expressão de ki67 foi diretamente inversamente associada com a expressão citoplasmática de NFkB p65 ( $p = 0.041$ ) e diretamente com relação núcleo/citoplasma desse marcador ( $p = 0.049$ ). Nos tumores de orofaringe p16+ apenas MSH2 se correlacionou diretamente com MSH6 ( $p < 0.001$ ) e MLH1 ( $p = 0.026$ ) e p53 mostrou correlação positiva com a expressão nuclear de NFkB p65 ( $p = 0.025$ ) e com a relação núcleo/citoplasma desse marcador ( $p = 0.028$ ) (Tabela 3).

Já nos tumores de boca houve correlação positiva significativa entre todas as proteínas do complexo MMR ( $p < 0.05$ ), exceto PMS2 e MSH2 ( $p = 0.061$ ) ou MSH6 ( $p = 0.219$ ). A expressão nuclear de NFkB p65 e a relação núcleo citoplasma desses marcadores se correlacionaram positivamente com a expressão de MLH1 ( $p = 0.008$  e  $p = 0.025$ , respectivamente) e PMS2 ( $p < 0.001$  e  $p = 0.001$ , respectivamente) (Tabela 3).

### **7.3 Influência da localização, de características clínico-patológicas e da imunexpressão de proteínas do eixo MMR-NFkB na sobrevida global de pacientes com CEC de boca e orofaringe**

Os pacientes com cânceres de boca e de orofaringe apresentaram medianas de sobrevida global (mediana = 74 e 70, respectivamente) maiores que os pacientes com tumores de orofaringe p16-, embora não tenha havido diferença significativa ( $p = 0,053$ ) (Figura 1, Tabela 5). Nos tumores de boca os homens apresentaram menor sobrevida que as mulheres ( $p = 0.033$ ) e os tumores pT3-pT4 menor sobrevida que os tumores pT1-pT3 ( $p = 0.006$ ). A radioterapia adjuvante aumentou significativamente a sobrevida em pacientes com tumores de orofaringe p16- ( $p = 0.024$ ) e a QT foi inversamente relacionada a sobrevida de pacientes com câncer de boca ( $p < 0.001$ ). Nos tumores de orofaringe p16- a perda de expressão de p53 foi associada a menor sobrevida global ( $p = 0.017$ ) (Tabela 4).

Em análise multivariada a localização do tumor primário não impactou na sobrevida global ( $p = 0.822$ ), porém os homens ( $p = 0.009$ ) apresentaram um aumento do risco de morte de 4,139 (CI95% = 1,434-11,947) vezes maior que as mulheres, bem como os pacientes com baixa escolaridade ( $p = 0.004$ ) que mostraram um aumento no risco de morte de 21,158 (CI95% = 2,664-168,024) vezes maior e os

fumantes ( $p=0.024$ ) que apresentaram um risco aumentado em 2,774 (CI95% = 1,143-6,735) vezes (Tabela 5).

A radioterapia adjuvante ( $p=0,010$ ) reduziu o risco de morte em 0,204 (CI95% = 0,061-0,681) vezes e alta expressão de MSH2 ( $p=0,006$ ) em 0,968 (CI95% = 0,946-0,991) vezes (Tabela 5).

## 8 DISCUSSÃO

### 8.1 Fatores ambientais

O câncer de boca está fortemente associado com fatores ambientais dentre eles podemos citar o fumo como um dos principais fatores de riscos associados com o início da carcinogênese (Andrade *et al.*, 2019). Estudos citam que a cessação do uso do tabaco pode reduzir os riscos de desenvolvimento do câncer em 30% para aqueles que cessarem entre 1 e 9 anos e uma redução de 50% para os que pararem a mais de 9 anos (Macfarlane *et al.*, 1995). A utilização do tabaco está diretamente associada com o nível de escolaridade tendo em vista que a maior prevalência de tabagismo está associada as pessoas com menor nível de escolaridade (Silva *et al.*, 2009) esses estudos estão diretamente associados com a maior incidência dos canceres em pacientes de escolaridade menor (Tabela 1) além disso ajuda a compreender que o uso do tabaco aumenta em 2,7x as taxas de mortalidade (Tabela 5) e o baixo grau de instrução aumenta em 21,1x as taxas de mortalidade (Tabela 5).

Nosso estudo elucidou o risco aumentado dos pacientes do sexo masculino com base nos resultados da tabela 6, onde foi possível observar que os pacientes do sexo masculino têm 4,1x mais chances de morte.

Foi possível observar que os tumores p16- foram os tumores que menos utilizaram de terapias adjuvantes como radioterapia e quimioterapia. Isso se dá pelo fato de que os tumores p16- se mostraram em sua maioria N0 (Tabela 1). Os estudos de (Amorim *et al.*, 2019) indicam que a ressecção cirúrgica é a abordagem mais comum e eficaz para esse tipo de tumor, justificando também o fato de tumores p16+ e de boca que se mostraram predominantemente N1 e N2, respectivamente necessitaram de mais abordagens terapêuticas como quimioterapia e radioterapia (Tabela 1).

### 8.2 Influência da localização e de características clínico-patológicas na imunoexpressão de proteínas do eixo NFkB-P53-P16 e KI-67 em pacientes com CEC de boca e orofaringe

Foi possível notar que em tumores p16- tivemos uma menor expressão de p53 (Tabela 2) o estudo de (Al-khalaf, Aboussekhra., 2018) elucida a associação das proteínas p16 e p53 citando um mediador, a proteína MDM2 essa proteína promove a degradação dependente de ubiquitina de p53, ou seja, quanto maior os níveis de MDM2 menor a expressão de p53. Nesse mesmo estudo Al-khalaf, Aboussekhra citam que a proteína p16 é responsável pelo controle negativo da expressão de MDM2 isso indica que a proteína p16 estabiliza a proteína p53 através da repressão de MDM2, ou seja, quando há a uma redução de p16, a proteína MDM2 tem seus níveis elevados e reprime a expressão de p53.

Outro resultado que foi observado foi a redução da expressão de NFkB em núcleo em pacientes p16- (Tabela 2) o estudo de (Cheney *et al.*, 2008) traz uma associação do aumento da proteína MDM2 com a supressão da via ativa de NFkB em células de rabdomyosarcomas, resultado esse que se assemelha com os resultados expressos no nosso estudo.

Na tabela 2 e no material suplementar 3 onde abrange os tumores de boca, também podemos verificar a presença de níveis diminuídos de P53 em tumores com metástase linfonodal e tumores que foram submetidos a quimioterapia, esses resultados estão dentro do esperado, tendo em vista que p53 é um regulador negativo do ciclo celular e ambos esses dados indicam uma maior proliferação tumoral, logo um nível menor de p53 indica tanto uma maior possibilidade de metástase como elucida a necessidade de realizar o tratamento quimioterápico.

Podemos observar uma maior expressão do marcador ki-67 em tumores de boca, indicando que esse tipo de tumor tende a ser mais agressivo (Tabela 2) essa informação se válida através dos resultados expressos na (Tabela 4) que indica que os tumores de boca maiores tiveram uma sobrevida significativamente menor. Estudos como o de (Voltolini, dos Santos *et al.*, 2021) indicam que essa associação pode ser indicada pelo fato de que a etiologia dos canceres de orofaringe ser mais diversificada tendo em vista que infecções por HPV indicam um melhor prognostico, já o câncer de boca é mais associado aos riscos convencionais como o consumo e excesso de álcool e o tabagismo. Além disso, o marcador foi mais presente em tumores de boca com acometimento linfonodal (Material suplementar 3), reafirmando assim a relação desse marcador com a proliferação tumoral.

### **8.3 Influência do consumo do álcool e fumo associado a localização e as características clínico-patológicas dos tumores**

Foi possível verificar que os pacientes fumantes apresentaram uma menor expressão citoplasmática de NFkB (Tabela 2) e pacientes p16- também (Material suplementar 1) no estudo de (Pace *et al.*, 2012) eles realizaram uma inoculação de apenas 10% do extrato do cigarro em células epiteliais brônquicas e isso foi suficiente para uma redução da expressão de NFkB que avia sido ativado anteriormente por IL-1, sendo assim esse estudo demonstrou que o extrato do cigarro é capaz de realizar essa depleção nas proteínas do complexo NFkB, assim como observado em nosso estudo.

Também notamos no nosso estudo uma maior expressão do marcador de proliferação tumoral ki-67 em pacientes fumantes (Tabela 2) diversos estudos já relataram essa associação entre o consumo do cigarro com o aumento da expressão desse marcador o estudo de (Alharbi, Rouabhia., 2016) associa o consumo do cigarro com a proliferação celular no epitélio gengival aumentando assim a expressão de ki-67 se assemelhando com os resultados do nosso estudo.

Os nossos resultados também indicaram uma menor expressão de p53 em pacientes com o consumo de álcool indicando um pior prognóstico (Tabela 2) o consumo de álcool está diretamente associado a um aumento na quantidade de radicais livres. Esse aumento do estresse oxidativo traz um pior prognóstico em diversos tipos de canceres (Maia, Santos, Reis., 2014).

### **8.4 Influência das proteínas do complexo mismatch repair com a progressão tumoral**

(Karlberg *et al.*, 2018) realizou um estudo no qual conseguiu comprovar que a proliferação tumoral estava diretamente associada a depressão das proteínas do complexo MMR em tumores metastáticos outros estudos trazem o silenciamento

epigenético de proteínas chaves do sistema MMR relacionando elas com progressão tumoral em carcinomas de colo retal (Aronson *et al.*, 2015), carcinomas gástricos (Li *et al.*, 2008), tumores endometriais (Hamid *et al.*, 2002), câncer de ovário (Friedrich *et al.*, 1999), câncer de pulmão (Li *et al.*, 2013), tumores malignos de glândulas salivares (Castrilli *et al.*, 2002), cânceres de cabeça e pescoço (Ghosh *et al.*, 2010) e câncer de boca (Wagner *et al.*, 2016; Vasan *et al.*, 2019). Isso nos ajuda a justificar os resultados presentes na tabela 2, onde comprovamos que a redução da expressão de MLH1 estava diretamente associado a tumores maiores (pT3-pT4) indicando assim que tumores maiores expressem menos MLH1.

PMS2 por sua vez estava menos presente em pacientes que necessitaram de quimioterapia. E como (Amorim *et al.*, 2019) indica que a ressecção cirúrgica é a melhor abordagem para tumores menores, podemos deduzir que a presença da necessidade de quimioterapia está associada a tumores maiores essa associação também pode ser comprovada através das taxas de sobrevida (Tabela 5) que mostrou que pacientes com câncer de boca que realizaram quimioterapia tiveram uma taxa de sobrevida menor (P) indicando assim que se tratam de tumores maiores, dito isso, temos uma comprovação indireta de que os níveis de PMS2 também podem estar associados a proliferação tumoral. Além disso também foi possível observar a redução na expressão de PMS2 em tumores de boca em estágios mais avançados (pT3-pT4) (Material suplementar 3), indicando também uma associação direta correlacionado a redução da expressão com a proliferação tumoral.

MSH2 por sua vez também se mostrou reduzido em tumores maiores (pT3-pT4) em pacientes p16+ (Material suplementar 2) indicando assim que a redução da expressão da proteína MSH2 está diretamente associada com a proliferação tumoral assim como (Karlberg *et al.*, 2018) elucidou em seu estudo.

MLH1 se mostrou reduzido em pacientes com idade inferior a 60 anos nos tumores de orofaringe p16+ (Material suplementar 2) isso indica que a possível presença de tumores em pacientes mais jovens pode estar associada a alguma deficiência na expressão de proteínas do complexo mismatch repair associada a alguma característica genética ou familiar não estudada.

### 8.5 Influência da imunexpressão de proteínas do eixo MMR-NFkB nos pacientes com CEC de boca e orofaringe

As proteínas do complexo mismatch repair estiveram diretamente associadas a seu dímeros, tanto o complexo MULTL $\alpha$  (MLH1 – PMS2) como o complexo MULTS $\alpha$  (MSH2 – MSH6) tiveram as suas proteínas em expressão sinérgica (Tabela 3) indicando assim um bom funcionamento do complexo mismatch repair

Em tumores p16- essa sinergia se perdeu (Tabela 3), não tivemos uma associação positiva entre as proteínas entre os complexos, indicando assim uma desregulação, o que indica que a via mismatch repair não conseguiu exercer a sua função. Diversos estudos elucidam a presença da proteína p16 com um melhor prognóstico (Sritippho *et al.*, 2015) dito isso somente a falta de expressão desse marcador já indicaria um mal prognóstico, mas esse resultado também precisa ser associado ao fato de que pacientes p16- reduziram a expressão de p53 (Tabela 2) uma proteína chamada de guardião do genoma que também indica um prognóstico favorável tendo em vista os resultados obtidos na (tabela 4) que indicaram que os pacientes com redução de p53 tiveram menores taxas de sobrevida. A redução dessas duas proteínas é indício de um prognóstico menos favorável ainda. Mas ainda vale ressaltar que tumores que tiveram a redução da expressão das proteínas do complexo mismatch repair foram tumores maiores (Material suplementar 3, 2 e Tabela 2) também verificamos que a expressão de MSH2 reduz em 0,9x as taxas de mortalidade (Tabela 5). Sendo assim a associação entre a falta de expressão de p16, associada a redução de expressão de p53 e a proliferação tumoral associada a perda de expressão das proteínas do complexo mismatch repair indica um mal prognóstico nesses tumores, resultado esse que foi possível observar na (Tabela 4) que mesmo sem notar uma diferença estatística significativa foi notório que pacientes p16- tiveram uma taxa de sobrevida bem menor quando comparado a outros tipos de tumor, reafirmando o que é encontrado na literatura (Sritippho *et al.* 2015).

Conseguimos elucidar que mesmo com um prognóstico desfavorável em pacientes p16- a realização de radioterapia reduziu as taxas de mortalidade em 0,2x (Tabela 5) aumentando assim as taxas de sobrevida dos pacientes (Tabela 4). Vale lembrar que os tumores p16- foram os tumores que menos tiveram metástase

linfonodal, nossos resultados favorecem a indicação de realização da radioterapia mesmo em casos de ausência de metástase linfonodal, tendo em vista a agressividade desse tumor e a redução das taxas de mortalidade.

Foi possível observar uma relação sinérgica entre a expressão de NFkB nuclear com MLH1 e PMS2 (Tabela 3) essa associação pode indicar que o complexo MULTL $\alpha$  pode ter uma relação direta com a translocação de NFkB para o núcleo, tendo em vista que a relação N/C também se mostrou maior na presença de maiores expressões dessas proteínas, isso valida o que (Fonseca *et al.* 2020) relata em seu estudo deixando claro que a ativação do sistema MMR depende de uma via inflamatória.

### **8.6 Influência da imunexpressão de proteínas do eixo MMR-NFkB-P53-KI-67 nos pacientes com CEC de boca e orofaringe**

Nos tumores p16+ foi possível observar uma relação positiva entre a expressão de NFkB nuclear com a expressão de MLH1 e p53 (Tabela 3) isso pode ser indicado por conta de uma correlação positiva entre o MLH1 e p53 (Lu, Lin, Lin., 2004), realça essa relação indicando que o MLH1 age aumentando a resposta de p53, a forma que essas proteínas se relacionam ainda não foi completamente estabelecido, sabemos que MLH1 não consegue estimular p53 em um perfil adverso, onde essa proteína está sendo deprimida, mas de alguma o MLH1 aumenta a capacidade de ação de p53 quando expresso no meio. Isso se valida nos nossos resultados, onde tanto os pacientes p16- como os pacientes p16+ não tiveram diferença estatística para a expressão de MLH1 (Tabela 2) no entanto a relação de NFkB nuclear e MLH1 só está presente nos tumores p16+, indicando assim uma relação de tentativa de reparo nessas células. Resultado essa que já era esperado, tendo em vista que os tumores p16+ são mais susceptíveis aos reparos e a melhores prognósticos.

Já os tumores p16- onde tivemos uma menor expressão de p53 (Tabela 2) a relação de MLH1 e NFkB não existiu, ao invés disso o fator de transcrição estimulou a proliferação celular elucidado pelo aumento de expressão de KI-67 (Tabela 3). Indicando que a ausência de p53 pode estar diretamente associada com um pior prognostico, resultado esse já esperado, tendo em vista que diversos estudos

elucidam que a proteína p53 é uma proteína de bons prognósticos (Fett-Conte, Sales *et al.*, 2002). Sendo assim a redução da expressão de p53 associado a redução de p16 e aumento de KI-67 indica um mal prognostico para os tumores p16-.

Nos tumores de boca foi onde tivemos uma maior relação entre a expressão das proteínas do complexo mismatch repair, além disso ambas as proteínas do dímero MULL $\alpha$  tiveram relação direta com a expressão de NFkB nuclear (Tabela 3). Podemos associar esse resultado com o fato de que dentre os tumores o tumor de boca, mesmo que mais agressivo pela maior expressão de KI-67 (Tabela 2), foi o tumor com as taxas maiores de sobrevida. Ou seja, mesmo com um cenário desfavorável as proteínas do complexo mismatch repair conseguiram reverter o cenário (Thomas *et al.*, 2019).

## 9 CONCLUSÃO

A perda de expressão de MMR está associada com progressão tumoral e pior prognóstico em tumores de cabeça e pescoço e p53, p16 e NFkB parecem ser intermediários importantes.

## REFERÊNCIAS

- ALHARBI, I. A.; ROUABHIA, M. Repeated exposure to whole cigarette smoke promotes primary human gingival epithelial cell growth and modulates keratin expression. **Journal of periodontal research**, v. 51, n. 5, p. 630-638, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26740170/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.
- AL-KHALAF, Huda H.; ABOUSSEKHRA, Abdelilah. p16 controla a expressão da proteína p53 por meio da desestabilização dependente de miR de MDM2. **Molecular Cancer Research**, v. 16, n. 8, p. 1299-1308, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29739873/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.
- AMARAL-SILVA, G. K. *et al.* Mismatch repair system proteins in oral benign and malignant lesions. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 46, n. 4, p. 241-245, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27509575/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.
- ANDRADE, Giovana Frazon de; LOCH, Mathias Roberto; SILVA, Ana Maria Rigo. Mudanças de comportamentos relacionados à saúde como preditores de mudanças na autopercepção de saúde: estudo longitudinal (2011-2015). **Cadernos de Saúde Pública**, v. 35, n. 4, p. e00151418, 2019. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/Z6yS8MdywQVgyBQsBL5wtyn/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.
- BEGGS, A. D. *et al.* A study of genomic instability in early preneoplastic colonic lesions. **Oncogenesis**, v.32, n. 46, p. 5333-5337, 2013. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/onc2012584>. Acesso em: 17 Dez. 2023.
- BOING, Antonio Fernando; ANTUNES, José Leopoldo Ferreira. Condições socioeconômicas e câncer de cabeça e pescoço: uma revisão sistemática de literatura. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 16, p. 615-622, 2011. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csc/a/b5P38NWqdNtnCkPmpNRv9SS/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 17 Dez. 2023.
- BOMBECCARI, G. P. *et al.* Oral lichen planus and malignant transformation: a longitudinal cohort study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 112, p. 328-334, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21782485/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.
- BRINKMAN, B.M., WONG, D.T. Disease mechanism and biomarkers of oral squamous cell carcinoma. **Current Opinion in Oncology**, v.18, p. 228-233, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16552233/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.
- CALDEIRA, P. C. *et al.* hMLH1 immunoexpression is related to the degree of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. **Journal of oral pathology & medicine**, v.

40, n. 2, p. 153-159, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20969633/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

CALDEIRA, P. C. *et al.* Oral leukoplakias with different degrees of dysplasia: comparative study of hMLH1, p53, and AgNOR. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 40, n. 4, p. 305-311, 2011. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-0714.2010.01000.x>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

CASTRILLI, G. *et al.* Expression of hMSH2 and hMLH1 proteins of the human DNA mismatch repair system in salivary gland tumors. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 31, n. 4, p. 234-238, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12076327/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

CHAUDHARI, N. T. *et al.* Human MutL homolog 1 immunoeexpression in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: A prospective study in Indian population. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 20, n. 3, p. 453, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27721611/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

CHENEY, Misty D. *et al.* MDM2 displays differential activities dependent upon the activation status of NFκB. **Cancer biology & therapy**, v. 7, n. 1, p. 38-44, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17938575/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

CHRISTMANN, M. *et al.* Mechanisms of human DNA repair: an update. **Toxicology**, v. 193, n. 1-2, p. 3-34, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14599765/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

CORREA, Ricardo G.; MILUTINOVIC, Snezana; REED, John C. Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. **Bioscience reports**, v. 32, n. 6, p. 597-608, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22908883/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

CZERNINSKI, R. *et al.* Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma. **Oral diseases**, v. 15, n. 3, p. 206-213, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19207881/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

DANTAS, T.S. *et al.* Influence of Educational Level, Stage, and Histological Type on Survival of Oral Cancer in a Brazilian Population: A Retrospective Study of 10 Years Observation. **Medicine**, v.95, n.3, p. 2314, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26817864/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

DE MATOS AMORIM, Marília *et al.* Survival of young adults with oral squamous cell carcinoma in a brazilian population. **Revista de Salud Pública**, v. 21, n. 5, p. 534-540, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36753205/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

DECKER, J. M. *et al.* PMS2: a potential prognostic protein marker in oral squamous cell carcinoma. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8254887/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

DURAZZO, M.D. *et al.* Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: increasing incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastases. **Clinics**, v.60, p.293-298, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16138235/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

FETT-CONTE, Agnes C.; SALLES, Andréa BCF. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 24, p. 85-89, 2002. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbhh/a/5GdfhSzd7sTWNBbrWsr8Mh/?lang=pt>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

FONSECA, Alexandre *et al.* Expression of MMR system genes is correlated to NF-κB in patients with oral squamous cell carcinoma. **Journal of clinical pathology**, v. 73, n. 5, p. 273-277, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31662440/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

FRIEDRICH, M. *et al.* Immunohistochemical analysis of DNA 'mismatch-repair' enzyme human Mut-S-Homologon-2 in ovarian carcinomas. **The Histochemical Journal**, v. 31, n. 11, p. 717-722, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10646836/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

FUKUHARA, S. *et al.* Functional role of DNA mismatch repair gene PMS2 in prostate cancer cells. **Oncotarget**, v. 6, n. 18, p. 16341, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4599273/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

GHOSH, A. *et al.* Frequent alterations of the candidate genes hMLH1, ITGA9 and RBSP3 in early dysplastic lesions of head and neck: clinical and prognostic significance. **Cancer science**, v. 101, n. 6, p. 1511-1520, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20412120/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

GOEL, Ajay *et al.* Low frequency of Lynch syndrome among young patients with non-familial colorectal cancer. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, n. 11, p. 966-971, e1, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20655395/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

HAMID, A. *et al.* Cyclical change of hMSH2 protein expression in normal endometrium during the menstrual cycle and its overexpression in endometrial hyperplasia and sporadic endometrial carcinoma. **Cancer**, v. 94, n. 4, p. 997-1005, 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11920468/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

JADOTTE Y.T., SCHWARTZ, R.A. Solar cheilosis: An ominous precursor: Part I.

Diagnostic insights. **Journal American of Academy of Dermatology**, v.66, p.173-84, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22243721/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

JESSRI, M.; DALLEY, A. J.; FARAH, C. S. hMSH6: a potential diagnostic marker for oral carcinoma in situ. **Journal of clinical pathology**, v. 68, n. 1, p. 86-90, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25352643/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

JESSRI, M.; DALLEY, A. J.; FARAH, C. S. MutS $\alpha$  and MutL $\alpha$  immunoexpression analysis in diagnostic grading of oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 119, n. 1, p. 74-82, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25446502/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

KARLBERG, Mia *et al.* Estado de brotamento tumoral versus reparo de incompatibilidade no câncer colorretal – uma análise exploratória. **Anticancer research**, v. 38, n. 8, p. 4713-4721, 2018. Disponível em: <https://www.sbp.org.br/suplementos-patologia/2024/detalhes.html?codigo=21>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

KINSELLA, T. J. Coordination of DNA mismatch repair and base excision repair processing of chemotherapy and radiation damage for targeting resistant cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 15, n. 6, p. 1853-1859, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19240165/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

LAMBERT, R.; SAUVAGET, C.; CANCELA, M.C.; SANKARANARAYANAN, R. Epidemiology of câncer from the oral cavity and oropharynx. **European Journal of Gastroenterology & Hepatology**, v. 23, n. 8, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21654320/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

LI, Mei *et al.* Overexpression of hMSH2 and hMLH1 protein in certain gastric cancers and their surrounding mucosae. **Oncology reports**, v. 19, n. 2, p. 401-406, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18202787/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

LIU, L., YANG, X., Implication of Reprimo and hMLH1 gene methylation in early diagnosis of gastric carcinoma. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 8, n. 11, p. 14977, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26823831/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

LODI, G. *et al.* Current controversies in oral lichen planus: Report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology Oral Radiology and Endodontics**, v. 100, p. 164-78, 2005. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16037774/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

LU. Y *et al.* Epigenetic silencing of the DNA mismatch repair gene, MLH1, induced by

hypoxic stress in a pathway dependent on the histone demethylase, LSD1. **Cell Reports**, v.8, n.2, p.501-513, 2014. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4111985/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

LUO, Yuhong; LIN, Fang-Tsy; LIN, Weei-Chin. A estabilização mediada por ATM de proteínas de reparo de incompatibilidade de DNA hMutL aumenta a ativação de p53 durante danos ao DNA. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 14, p. 6430-6444, 2004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15226443/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

LYDIATT, W.M. Head and Neck Cancers—Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. **A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, p. 122-137, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28128848/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

MACFARLANE, GJ *et al.* Álcool, tabaco, dieta e o risco de câncer oral: uma análise combinada de três estudos de caso-controle. **European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology**, v. 31, n. 3, p. 181-187, 1995. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7549758/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

MAIA, Fernanda Maria Machado; SANTOS, Emanuely Barbosa; REIS, Germana Elias. Estresse oxidativo e lipoproteínas plasmáticas em pacientes com câncer. **Einstein (São Paulo)**, v. 4, pág. 480-484, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/eins/a/bMGZWzNy8P7XJHJpsVWCjDP/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

MALTA, M., CARDOSO, L. O., BASTOS, F. I., MAGNANINI, M. M. F., SILVA, C. M. F. P. Iniciativa STROBE: subsídios para a comunicação de estudos observacionais. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, p. 559-565, 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/3gYcXJLzXksk6bLLpvTdnYf/abstract/?lang=pt>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

NUNN, J. *et al.* Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 and hMSH3, in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral oncology**, v. 39, n. 2, p. 115-129, 2003. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12509964/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

PACE, Elisabetta *et al.* Beta defensin-2 is reduced in central but not in distal airways of smoker COPD patients. **PloS one**, v. 7, n. 3, p. e33601, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22438960/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

PATEL, T. N.; ROY, S.; RAVI, R. Gastric cancer and related epigenetic alterations. **Ecancermedicalscience**, n. 11, p. 714, 2017. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5243136/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

PETERSEN, P. E. Oral cancer prevention and control – The approach of the World Health Organization. **Oral Oncology**, v. 45, p. 454-460, 2008. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18804412/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

REINHARDT, H. C.; SCHUMACHER, B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. **Trends in Genetics**, v. 28, n. 3, p. 128-136, 2012. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22265392/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

RIVERA, C. *et al.* Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in Chilean population. **Int J Clin Exp Pathol**, v.7, n.9, p.5968-5977, 2014. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4203212/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

SCULLY, C. Oral cancer; evidence for sexual transmission. **British Dental Journal**, v.199, n.4, p.203-207, 2005. Disponível em: [https://exodontia.info/wp-content/uploads/2021/07/BDJ\\_2005.\\_Oral\\_Cancer.\\_The\\_Evidence\\_for\\_Sexual\\_Transmission.pdf](https://exodontia.info/wp-content/uploads/2021/07/BDJ_2005._Oral_Cancer._The_Evidence_for_Sexual_Transmission.pdf). Acesso em: 17 Dez. 2023.

SHCHERBAKOVA, P. V.; KUNKEL, T.s A. Mutator Phenotypes Conferred by MLH1 Overexpression and by Heterozygosity for mlh1 Mutations. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 4, p. 3177-3183, 1999. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10082584/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

SILGLEY, J. *et al.* Diffusion and Binding of Mismatch Repair Protein, MSH2, in Breast Cancer Cells at Different Stages of Neoplastic Transformation. **Plos One**, v. 12, n. 1, 2017. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0170414>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

SILVA, Gulnar Azevedo *et al.* Tabagismo e escolaridade no Brasil, 2006. **Revista de saúde pública**, v. 43, p. 48-56, 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rsp/a/4yxrcztkTCqThjPT47XjSNF/?lang=pt>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

SOUZA, L; *et al.* Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: Epidemiological study and clinicopathological associations. **Medicina Oral, Patologia Oral e Cirurgia Bucal**, v. 16, n. 6, p. 757-62, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21196879/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

SPITZ, Margaret R. *et al.* Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. A case comparison analysis. **Cancer**, v. 61, n. 1, p. 203-208, 1988. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3334949/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

SRITIPPHO, Thanun; CHOTJUMLONG, Pareena; IAMAROON, Anak. Roles of human papillomaviruses and p16 in oral cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 15, p. 6193-6200, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26434816/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

THOMAS, Rachael *et al.* The polymorphic variant rs1800734 influences methylation acquisition and allele-specific TFAP4 binding in the MLH1 promoter leading to

differential mRNA expression. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 13463, 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41598-019-49952-x>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

VASAN, K. *et al.* Tumour mismatch repair protein loss is associated with advanced stage in oral cavity squamous cell carcinoma. **Pathology**, v. 51, n. 7, p. 688-695, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31630878/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

VISIOLI, F. *et al.* TLR4 Expression in Ex-Lichenoid Lesions—Oral Squamous Cell Carcinomas and Its Surrounding Epithelium: The Role of Tumor Inflammatory Microenvironment. **Biomolecules**, v. 12, n. 3, p. 385, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35327577/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

VOLTOLINI, Juliana Milioli; DOS SANTOS, Felipe Daniel Búrigo. HPV eo câncer de orofaringe. **Clinical and Laboratorial Research in Dentistry**, São Paulo, Brasil, 2021. Disponível em: <https://revistas.usp.br/clrd/article/view/184527>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

WAGNER, V. P. *et al.* Overexpression of MutS $\alpha$  complex proteins predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Medicine**, v. 95, n. 22, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27258499/>. Acesso em: 23 Jun. 2024.

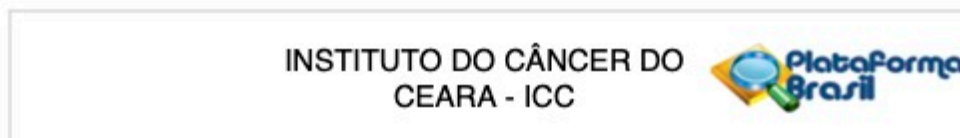
WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, v. 45, p. 309-316, 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18804401/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

ZHANG, J., MULLER, J.F., MCDONALD, A.J. mu opioid receptor localization in the basolateral amygdala: an ultrastructural analysis. **Neuroscience**, v.303, p. 352–363, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26164501/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

ZINI, A., CZERNINSKI, R., SGAN-COHEN, H.D. Oral cancer over four decades: Epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n.4, p. 299-305, 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20040019/>. Acesso em: 17 Dez. 2023.

## ANEXOS

### ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ESTUDO DA CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DE RECEPTORES OPIOIDES, VIAS INFLAMATÓRIAS E MARCADORES DE ANGIOGÊNESE NO CÂNCER DE BOCA E DE OROFARINGE

**Pesquisador:** Thinall Sousa Dantas

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 51871315.4.3001.5528

**Instituição Proponente:** Departamento de Clínica Odontológica

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.618.057

##### Apresentação do Projeto:

O câncer de boca e orofaringe é uma neoplasia de elevada incidência sendo o carcinoma de células escamosas o tipo histológico mais frequente. Trata-se de um projeto de pesquisa envolvendo seres humanos com dois momentos: um de desenho retrospectivo com base em prontuários e em análises de amostras arquivadas em blocos de parafina, e um segundo momento, prospectivo para avaliar a sobrevivência de participantes portadores de câncer de boca e orofaringe diagnosticados no hospital do câncer de Ceará e no serviço de odontologia do departamento de clínica odontológica da Ceará.

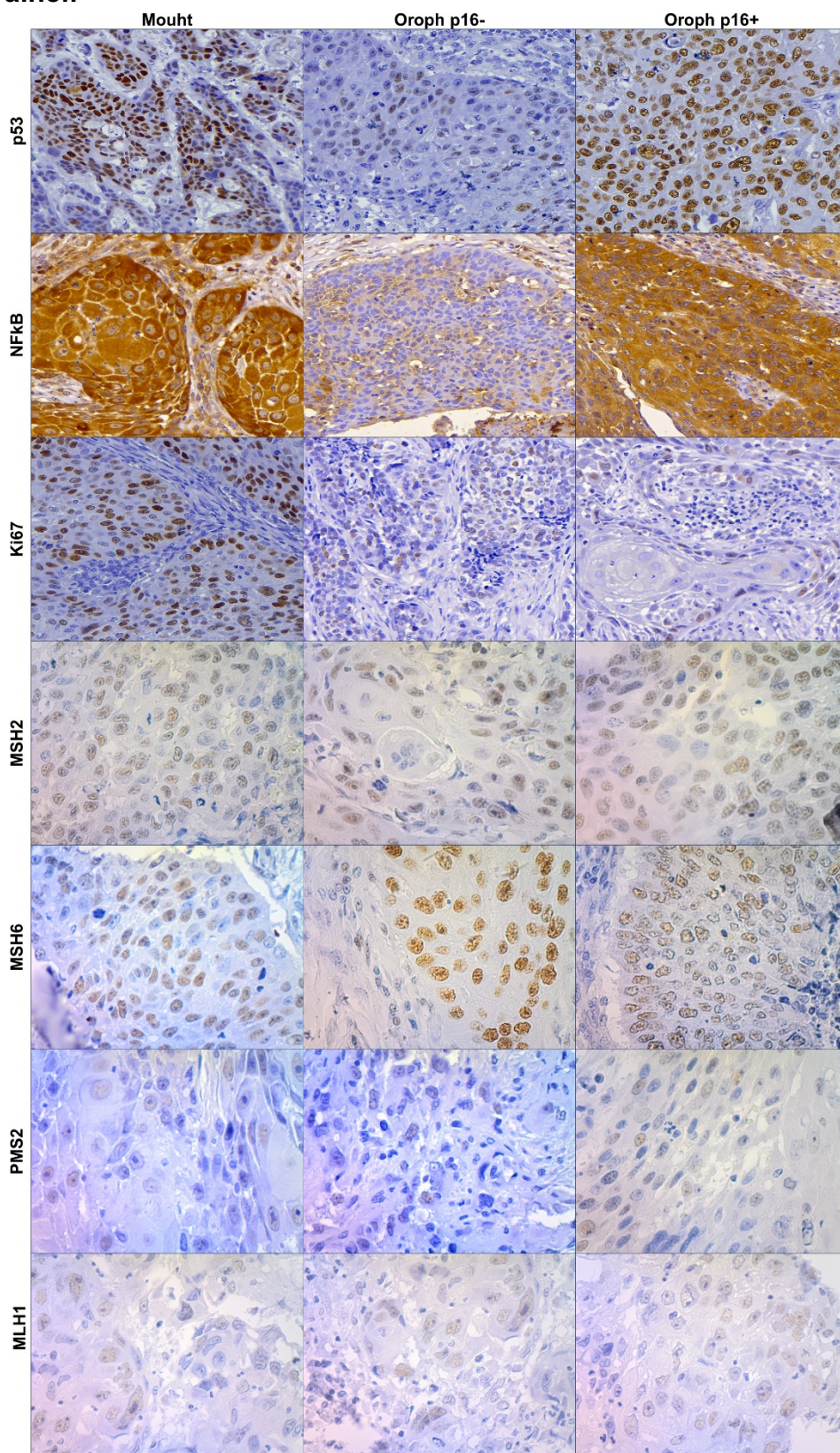
##### Objetivo da Pesquisa:

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

**Secundários** - Determinar em biópsias excisionais de carcinomas de boca e orofaringe, através de imunohistoquímica convencional e tissue microarray (TMA), a expressão de: 1. Receptores opioides Mu ( $\mu$ ), Kappa ( $\kappa$ ) e Delta ( $\delta$ ) (Anticorpos anti-Mu, anti-Kappa, anti-Delta e anti-Mu) 2. Marcadores de angiogênese (anticorpos anti-CD31 e anti-VEGF) e inflamação (anticorpos anti-IL-

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

## Painel:



**Tabela 1:** Caracterização da amostra de pacientes com CEC de boca e orofaringe submetidos a análise da expressão do eixo MMR-NFkB

	Total	Tumor primário		Boca	p-Valor
		Orofaringe p16-	Orofaringe p16+		
<b>Total</b>	<b>128</b>	<b>31(24.2%)</b>	<b>21(16.4%)</b>	<b>76(59.4%)</b>	
<b>Sexo</b>					
Feminino	40(31.3%)	7(22.6%)	7(33.3%)	26(34.2%)	0,488
Masculino	88(68.8%)	24(77.4%)	14(66.7%)	50(65.8%)	
<b>Idade_CAT</b>					
41-50	34(26.6%)	7(22.6%)	7(33.3%)	20(26.3%)	0,462
51-60	43(33.6%)	11(35.5%)	8(38.1%)	24(31.6%)	
61-70	31(24.2%)	10(32.3%)	5(23.8%)	16(21.1%)	
>70	20(15.6%)	3(9.7%)	1(4.8%)	16(21.1%)	
<b>Grau_instrução_CAT</b>					
Ens fundamental	119(93.0%)	28(90.3%)	17(81.0%)	74(97.4%)*	<b>0,027</b>
Ens médio	9(7.0%)	3(9.7%)*	4(19.0%)*	2(2.6%)	
<b>Fumo</b>					
Não	64(50.0%)	22(71.0%)*	17(81.0%)*	25(32.9%)	<b>0,000</b>
Sim	64(50.0%)	9(29.0%)	4(19.0%)	51(67.1%)*	
<b>Álcool</b>					
Não	93(72.7%)	25(80.6%)	13(61.9%)	55(72.4%)	0,329
Sim	35(27.3%)	6(19.4%)	8(38.1%)	21(27.6%)	
<b>pT</b>					
1	11(8.6%)	5(16.1%)	2(9.5%)	4(5.3%)	0,134
2	43(33.6%)	10(32.3%)	8(38.1%)	25(32.9%)	
3	35(27.3%)	12(38.7%)	5(23.8%)	18(23.7%)	
4	39(30.5%)	4(12.9%)	6(28.6%)	29(38.2%)	
<b>pN</b>					
0	58(45.3%)	16(51.6%)*	7(33.3%)	35(46.1%)	<b>0,000</b>
1	44(34.4%)	15(48.4%)	14(66.7%)*	15(19.7%)	
2	26(20.3%)	0(0.0%)	0(0.0%)	26(34.2%)*	
<b>RT</b>					
Não	25(19.5%)	11(35.5%)*	3(14.3%)	11(14.5%)	<b>0,036</b>
Sim	103(80.5%)	20(64.5%)	18(85.7%)*	65(85.5%)*	
<b>QT</b>					
Não	75(58.6%)	24(77.4%)*	8(38.1%)	43(56.6%)	<b>0,016</b>
Sim	53(41.4%)	7(22.6%)	13(61.9%)*	33(43.4%)*	

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

**Tabela 2:** Influência da localização e de características clínico-patológicas na imunoposição de proteínas do eixo MMR-NFkB em pacientes com CEC de boca e orofaringe

					NFkB				
	MSH2	MSH6	MLH1	PMS2	Núcleo	Citoplasma	Relação N/C	ki67	p53
<b>Tumor</b>									
Orofaringe p16-	23.35±29.58	40.25±33.92	7.67±17.27	9.44±17.37	1.98±2.82*	77.26±23.04	0.03±0.06	16.72±14.82	12.61±10.93*
Orofaringe p16+	30.44±33.47	43.30±35.26	5.11±12.23	6.26±15.11	6.24±13.07	79.26±25.50	0.18±0.54	11.49±14.57	39.50±14.63
Boca	28.26±27.32	29.06±29.43	8.36±18.34	5.30±16.77	8.49±12.79	73.41±25.66	0.13±0.22	73.01±38.31*	20.36±17.40
<b>p-Valor</b>	0,660	0,117	0,778	0,543	<b>0,044</b>	0,606	0,171	<b>0,000</b>	<b>0,029</b>
<b>Sexo</b>									
Feminino	27.64±31.78	30.61±30.97	7.69±17.22	6.61±16.73	7.46±13.40	76.39±22.83	0.11±0.24	63.22±43.44	19.16±16.97
Masculino	27.25±27.84	35.62±32.32	7.67±17.25	6.39±16.66	5.96±10.62	75.18±25.70	0.12±0.31	50.34±41.93	20.84±17.47
<b>p-Valor</b>	0,950	0,441	0,997	0,947	0,546	0,823	0,860	0,150	0,691
<b>Idade</b>									
Até 60	25.74±29.37	34.38±31.70	5.34±13.44	4.27±12.42	6.23±11.89	72.91±25.46	0.10±0.21	49.50±43.42	19.32±15.82
>60	29.94±28.36	33.62±32.48	11.60±21.67	9.92±21.35	6.58±10.71	79.54±23.62	0.14±0.38	60.98±40.77	21.76±19.18
<b>p-Valor</b>	0,459	0,903	0,068	0,074	0,876	0,179	0,517	0,165	0,532
<b>Escolaridade</b>									
Ens fundamental	28.62±29.23	34.17±32.60	7.80±17.58	6.73±17.07	6.69±11.65	75.10±25.04	0.12±0.30	54.58±42.58	20.34±16.94
Ens médio	11.22±19.38	32.97±21.14	6.15±11.35	3.16±9.47	0.92±1.12	82.33±22.26	0.01±0.01	44.78±45.45	20.48±25.56
<b>p-Valor</b>	0,101	0,919	0,795	0,537	0,230	0,492	0,364	0,586	0,988
<b>Fumo</b>									
Não	25.97±29.30	35.06±32.37	6.97±17.76	6.68±16.08	5.73±11.16	80.52±22.66	0.11±0.34	42.56±40.74	24.20±19.45
Sim	28.79±28.74	33.11±31.60	8.25±16.78	6.23±17.26	7.04±11.70	70.21±26.17*	0.12±0.23	63.81±41.97*	17.83±15.31
<b>p-Valor</b>	0,609	0,744	0,704	0,884	0,556	<b>0,031</b>	0,822	<b>0,008</b>	0,104
<b>Álcool</b>									
Não	28.01±28.71	34.90±31.98	9.03±18.89	7.22±17.22	6.63±10.99	76.92±24.91	0.12±0.29	55.64±42.69	22.92±18.04
Sim	25.78±29.85	32.08±31.97	4.35±11.48	4.63±15.12	5.66±12.58	71.72±24.75	0.11±0.28	50.12±42.70	13.84±13.23*
<b>p-Valor</b>	0,714	0,670	0,202	0,448	0,696	0,338	0,904	0,538	<b>0,032</b>
<b>pT</b>									
pT1-pT2	29.79±29.69	38.41±31.43	11.69±20.70	5.87±15.33	6.45±12.46	78.12±22.42	0.13±0.39	47.69±43.62	21.15±16.29
pT3-pT4	25.59±28.46	30.94±32.04	4.53±13.11*	6.90±17.61	6.30±10.59	73.46±26.62	0.10±0.17	58.22±41.68	19.82±17.97
<b>p-Valor</b>	0,452	0,218	<b>0,031</b>	0,742	0,945	0,339	0,548	0,204	0,738
<b>pN</b>									
pN0	25.17±27.97	31.31±31.37	9.69±19.53	7.18±16.98	7.62±13.66	79.61±20.76	0.15±0.40	57.64±43.11	25.43±17.13
pN+	29.05±29.75	36.26±32.32	5.91±14.72	5.89±16.42	5.46±9.43	72.54±27.23	0.09±0.16	51.10±42.26	15.63±16.13
<b>p-Valor</b>	0,486	0,413	0,258	0,681	0,334	0,147	0,300	0,423	<b>0,010</b>
<b>RT</b>									
Não	17.50±27.81	29.50±31.18	9.79±21.28	7.11±15.32	2.93±3.43	79.08±16.78	0.04±0.05	45.72±43.83	20.96±13.36
Sim	29.54±28.86	35.18±32.09	7.13±16.03	6.31±16.97	7.11±12.35	74.74±26.29	0.13±0.31	56.23±42.23	20.18±18.21
<b>p-Valor</b>	0,092	0,454	0,519	0,840	0,148	0,493	0,223	0,294	0,869
<b>QT</b>									
Não	25.51±27.77	31.97±31.25	9.94±19.24	9.21±19.90	6.25±11.78	76.25±24.30	0.10±0.19	50.62±42.69	24.55±18.69
Sim	30.09±30.66	37.09±32.81	4.31±12.98	2.42±8.73*	6.55±10.89	74.36±25.95	0.15±0.40	59.08±42.39	14.23±12.83*
<b>p-Valor</b>	0,415	0,401	0,097	<b>0,030</b>	0,895	0,702	0,376	0,307	<b>0,007</b>

\*p&lt;0,05, teste Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis/Dunn (média±DP).



	<b>p-Valor</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Orofaringe p16+</b>										
MSH2	<i>r</i>	-	<b>0.824*</b>	<b>0.522*</b>	-0.194	0.029	-0.232	0.270	0.198	-0.359
	<b>p-Valor</b>	-	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.026</b>	0.426	0.907	0.338	0.264	0.498	0.641
MSH6	<i>r</i>	-	-	0.455	-0.132	0.042	-0.165	0.297	0.256	-0.634
	<b>p-Valor</b>	-	-	0.067	0.601	0.869	0.513	0.232	0.377	0.366
MLH1	<i>r</i>	-	-	-	-0.081	0.264	-0.352	<b>0.678*</b>	-0.296	-0.036
	<b>p-Valor</b>	-	-	-	0.757	0.290	0.152	<b>0.002</b>	0.325	0.964
PMS2	<i>r</i>	-	-	-	-	-0.170	0.151	-0.139	0.168	-0.034
	<b>p-Valor</b>	-	-	-	-	0.499	0.549	0.582	0.583	0.966
NFkB (núcleo)	<i>r</i>	-	-	-	-	-	-0.289	<b>0.631*</b>	-0.160	<b>0.975*</b>
	<b>p-Valor</b>	-	-	-	-	-	0.216	<b>0.003</b>	0.585	<b>0.025</b>
NFkB (citoplasma)	<i>r</i>	-	-	-	-	-	-	<b>-0.629*</b>	0.246	0.707
	<b>p-Valor</b>	-	-	-	-	-	-	<b>0.003</b>	0.397	0.293
NFkB (relação N/C)	<i>r</i>	-	-	-	-	-	-	-	-0.140	<b>0.972*</b>
	<b>p-Valor</b>	-	-	-	-	-	-	-	0.633	<b>0.028</b>
ki67	<i>r</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-0.744
	<b>p-Valor</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.256
p53	<i>r</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>p-Valor</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Boca</b>										
MSH2	<i>r</i>	-	<b>0.881*</b>	<b>0.434*</b>	0.242	0.132	-0.034	0.078	-0.011	0.091
	<b>p-Valor</b>	-	<b>&lt;0.001</b>	<b>&lt;0.001</b>	0.061	0.328	0.801	0.565	0.934	0.490
MSH6	<i>r</i>	-	-	<b>0.429*</b>	0.153	-0.012	-0.162	0.017	0.021	0.111
	<b>p-Valor</b>	-	-	<b>&lt;0.001</b>	0.219	0.932	0.228	0.903	0.864	0.380
MLH1	<i>r</i>	-	-	-	<b>0.518*</b>	<b>0.345*</b>	0.063	<b>0.295*</b>	0.132	0.177
	<b>p-Valor</b>	-	-	-	<b>&lt;0.001</b>	<b>0.008</b>	0.638	<b>0.025</b>	0.288	0.157
PMS2	<i>r</i>	-	-	-	-	<b>0.492*</b>	0.054	<b>0.443*</b>	0.219	0.183
	<b>p-Valor</b>	-	-	-	-	<b>&lt;0.001</b>	0.687	<b>0.001</b>	0.072	0.144
NFkB (núcleo)	<i>r</i>	-	-	-	-	-	0.129	<b>0.874*</b>	0.080	0.062
	<b>p-Valor</b>	-	-	-	-	-	0.331	<b>&lt;0.001</b>	0.546	0.646
NFkB (citoplasma)	<i>r</i>	-	-	-	-	-	-	-0.199	0.064	0.120
	<b>p-Valor</b>	-	-	-	-	-	-	0.131	0.631	0.371
NFkB (relação N/C)	<i>r</i>	-	-	-	-	-	-	-	0.009	0.017
	<b>p-Valor</b>	-	-	-	-	-	-	-	0.947	0.897
ki67	<i>r</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.006
	<b>p-Valor</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	0.959
p53	<i>r</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<b>p-Valor</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*p<0,05, correlação de Spearman.

**Tabela 4:** Influência da localização, de características clínico-patológicas e da imunexpressão de proteínas do eixo MMR-NFkB na sobrevida global de pacientes com CEC de boca e orofaringe

	SG (%)	SG (meses)		p-Valor
		Mean±SD (CI95%)	Median (CI95%)	
<b>Tumor primário</b>				
Orofaringe p16-	11/31(35.5%)	59.75±11.63(36.94-82.55)	26(15.55-36.45)	0,053
Orofaringe p16+	10/21(47.6%)	88.56±15.14(58.88-118.24)	70	
Boca	41/76(53.9%)	73.47±5.51(62.68-84.27)	74(54.50-92.70)	
<b>Sexo</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Feminino	4/7(57.1%)	92.54±26.57(40.46-144.63)	NA	0,215
Masculino	7/24(29.2%)	39.00±7.27(24.76-53.24)	26(17.12-34.88)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Feminino	5/7(71.4%)	100.36±19.08(62.96-137.76)	NA	0,161
Masculino	5/14(35.7%)	72.45±17.74(37.68-107.21)	28(17.00-39.00)	
<b>Boca</b>				
Feminino	19/26(73.1%)	91.92±8.89(74.50-109.34)	115(55.67-174.53)	<b>0,033</b>
Masculino	22/50(44.0%)	65.42±6.62(52.44-78.39)	60(36.33-83.07)	
<b>Idade</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Até 60	8/18(44.4%)	75.64±16.14(44.00-107.28)	41(0.00-92.26)	0,142
>60	3/13(23.1%)	31.91±8.82(14.62-49.20)	15(1.62-28.78)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Até 60	8/15(53.3%)	96.37±17.90(61.29-131.45)	NA	0,407
>60	2/6(33.3%)	49.03±15.91(17.85-80.22)	27(18.60-35.40)	
<b>Boca</b>				
Até 60	24/44(54.5%)	70.84±7.06(57.00-84.69)	74(45.24-101.96)	0,832
>60	17/32(53.1%)	75.36±8.18(59.33-91.40)	74(38.02-109.18)	
<b>Escolaridade</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Ens fundamental	10/28(35.7%)	58.22±12.38(33.94-82.49)	26(11.74-40.26)	0,726
Ens médio	1/3(33.3%)	57.53±21.87(14.67-100.40)	67(0.00-164.06)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Ens fundamental	7/17(41.2%)	80.23±16.57(47.75-112.70)	40(0.00-93.78)	0,299
Ens médio	3/4(75.0%)	104.03±23.97(57.05-151.00)	NA	
<b>Boca</b>				
Ens fundamental	39/74(52.7%)	59.75±11.63(36.94-82.55)	26(15.55-36.45)	0,736
Ens médio	2/2(100.0%)	88.56±15.14(58.88-118.24)	70	
<b>Fumo</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Não	8/22(36.4%)	45.96±8.30(29.69-62.23)	27(0.00-57.60)	0,789
Sim	3/9(33.3%)	59.18±22.25(15.57-102.78)	15(6.43-23.97)	

<b>Orofaringe p16+</b>				
Não	8/17(47.1%)	88.83±16.64(56.23-121.44)	70	0,970
Sim	2/4(50.0%)	57.75±20.28(17.99-97.51)	33	
<b>Boca</b>				
Não	12/25(48.0%)	68.62±10.15(48.72-88.52)	74(13.22-133.98)	0,579
Sim	29/51(56.9%)	73.93±6.22(61.75-86.12)	74(53.30-93.90)	
<b>Álcool</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Não	9/25(36.0%)	58.80±12.70(33.92-83.68)	27(2.77-52.03)	0,789
Sim	2/6(33.3%)	40.10±16.92(6.94-73.26)	12(0.00-27.80)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Não	8/13(61.5%)	106.89±18.99(69.68-144.10)	NA	0,137
Sim	2/8(25.0%)	43.67±11.83(20.48-66.86)	28(11.37-44.63)	
<b>Boca</b>				
Não	31/55(56.4%)	74.91±6.56(62.06-87.76)	78(55.30-100.30)	0,723
Sim	10/21(47.6%)	68.62±9.63(49.75-87.49)	63(34.99-91.61)	
<b>pT</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
pT1-pT2	5/15(33.3%)	62.90±15.23(33.04-92.75)	41(8.84-73.16)	0,588
pT3-pT4	6/16(37.5%)	42.91±11.20(20.95-64.87)	13(7.34-18.66)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
pT1-pT2	5/10(50.0%)	75.55±18.00(40.27-110.83)	40	1,000
pT3-pT4	5/11(45.5%)	87.39±20.33(47.54-127.23)	70(6.36-133.44)	
<b>Boca</b>				
pT1-pT2	22/29(75.9%)	94.59±8.03(78.86-110.33)	NA	<b>0,006</b>
pT3-pT4	19/47(40.4%)	61.85±6.77(48.57-75.12)	56(33.22-78.38)	
<b>pN</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
pN0	5/16(31.3%)	56.32±15.65(25.65-86.98)	26(6.64-45.36)	0,683
pN+	6/15(40.0%)	47.39±10.18(27.44-67.34)	24(0.00-56.11)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
pN0	3/7(42.9%)	74.86±19.68(36.28-113.44)	70(0.00-179.99)	0,908
pN+	7/14(50.0%)	90.64±18.88(53.64-127.63)	40	
<b>Boca</b>				
pN0	22/35(62.9%)	81.05±7.96(65.45-96.65)	74(43.14-104.06)	0,257
pN+	19/41(46.3%)	67.89±7.49(53.20-82.57)	60(28.23-91.17)	
<b>RT</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Não	2/11(18.2%)	38.09±16.51(5.73-70.45)	12(7.47-16.53)	<b>0,024</b>
Sim	9/20(45.0%)	56.20±9.04(38.48-73.92)	45(7.16-82.84)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Não	1/3(33.3%)	47.67±27.69(0.00-101.93)	21(0.00-43.40)	0,409
Sim	9/18(50.0%)	92.69±16.15(61.04-124.35)	70	

<b>Boca</b>				
Não	10/11(90.9%)	89.22±5.80(77.86-100.58)	NA	0,057
Sim	31/65(47.7%)	69.32±5.86(57.84-80.79)	74(48.98-98.22)	
<b>QT</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Não	8/24(33.3%)	53.54±12.85(28.36-78.73)	26(17.12-34.88)	0,440
Sim	3/7(42.9%)	55.13±15.12(25.50-84.77)	67(0.00-174.47)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Não	2/8(25.0%)	42.51±14.27(14.54-70.48)	13(0.00-36.56)	0,059
Sim	8/13(61.5%)	109.66±17.95(74.47-144.85)	NA	
<b>Boca</b>				
Não	32/43(74.4%)	95.35±6.12(83.35-107.34)	115(54.92-175.28)	<b>0,000</b>
Sim	9/33(27.3%)	47.64±7.15(33.62-61.66)	26(11.69-40.31)	
<b>MSH2&gt; 5%</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
	Censored/Total N/(Percent)			
Não	5/16(31.3%)	56.96±15.38(26.81-87.11)	24(0.00-71.25)	0,910
Sim	6/15(40.0%)	46.65±11.09(24.91-68.38)	26(15.58-36.42)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Não	5/10(50.0%)	73.85±18.37(37.84-109.86)	28	0,858
Sim	5/11(45.5%)	90.58±19.82(51.73-129.44)	70	
<b>Boca</b>				
Não	20/36(55.6%)	67.88±7.63(52.93-82.82)	63(36.82-89.78)	0,660
Sim	21/40(52.5%)	75.81±7.30(61.49-90.12)	78(55.07-100.53)	
<b>MSH6&gt; 5%</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Não	4/12(33.3%)	55.48±18.84(18.55-92.41)	15(0.00-58.50)	0,722
Sim	7/19(36.8%)	47.42±9.42(28.95-65.88)	26(19.47-32.53)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Não	4/7(57.1%)	82.69±21.47(40.60-124.77)	NA	0,674
Sim	6/14(42.9%)	83.57±18.10(48.10-119.04)	40(0.00-102.45)	
<b>Boca</b>				
Não	18/34(52.9%)	73.35±8.32(57.04-89.66)	74(49.91-97.29)	0,995
Sim	23/42(54.8%)	73.81±7.37(59.36-88.26)	78(48.95-106.65)	
<b>MLH1&gt; 5%</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Não	10/25(40.0%)	64.00±13.61(37.31-90.68)	27(0.00-64.37)	0,547
Sim	1/6(16.7%)	32.50±9.65(13.58-51.42)	21(6.60-35.40)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Não	9/18(50.0%)	92.53±16.18(60.81-124.24)	70	0,422
Sim	1/3(33.3%)	44.87±24.58(0.00-93.05)	27(0.00-63.81)	
<b>Boca</b>				
Não	31/62(50.0%)	71.29±5.94(59.65-82.93)	74(49.60-97.60)	0,368
Sim	10/14(71.4%)	83.56±14.50(55.14-111.99)	NA	

<b>PMS2&gt; 5%</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Não	7/22(31.8%)	52.66±13.16(26.87-78.45)	26(8.65-43.35)	0,478
Sim	4/9(44.4%)	55.27±14.36(27.12-83.41)	62(0.00-125.89)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Não	9/16(56.3%)	101.84±16.81(68.89-134.80)	NA	0,064
Sim	1/5(20.0%)	34.12±15.84(3.07-65.17)	19(6.12-31.88)	
<b>Boca</b>				
Não	36/69(52.2%)	71.76±5.77(60.45-83.07)	74(48.63-98.57)	0,364
Sim	5/7(71.4%)	80.46±19.73(41.79-119.12)	60(22.20-97.20)	
<b>NFkB (núcleo) &gt; 5%</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Não	8/26(30.8%)	57.67±12.22(33.71-81.63)	24(9.51-38.49)	0,695
Sim	3/5(60.0%)	52.63±19.06(15.26-89.99)	41(0.00-90.40)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Não	8/17(47.1%)	75.34±13.23(49.41-101.27)	70	0,940
Sim	2/4(50.0%)	89.85±35.54(20.20-159.50)	27	
<b>Boca</b>				
Não	26/53(49.1%)	68.95±6.42(56.37-81.54)	74(52.63-94.57)	0,218
Sim	15/23(65.2%)	84.15±10.11(64.34-103.97)	NA	
<b>NFkB (citoplasma) &gt; 60%</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Não	6/11(54.5%)	56.64±13.69(29.81-83.47)	NA	0,365
Sim	5/20(25.0%)	47.66±11.92(24.29-71.03)	26(16.92-35.08)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Não	3/5(60.0%)	71.60±14.03(44.10-99.10)	NA	0,492
Sim	7/16(43.8%)	83.18±17.46(48.96-117.39)	33(0.00-115.12)	
<b>Boca</b>				
Não	14/33(42.4%)	62.93±7.96(47.34-78.53)	63(28.47-98.13)	0,084
Sim	27/43(62.8%)	81.71±7.38(67.25-96.16)	NA	
<b>NFkB (razão N:C &gt; 0.1)</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Não	9/28(32.1%)	56.98±11.77(33.92-80.04)	26(15.79-36.21)	0,570
Sim	2/3(66.7%)	65.33±23.41(19.46-111.21)	NA	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Não	8/18(44.4%)	71.77±12.97(46.35-97.18)	40(0.00-112.20)	0,533
Sim	2/3(66.7%)	116.13±36.39(44.81-187.45)	NA	
<b>Boca</b>				
Não	29/56(51.8%)	72.74±6.26(60.47-85.02)	74(47.72-99.48)	0,819
Sim	12/20(60.0%)	74.98±11.55(52.35-97.61)	78(38.72-116.88)	
<b>ki67&gt; 5%</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Não	6/18(33.3%)	45.72±9.14(27.81-63.63)	26(0.00-52.89)	0,924

Sim	5/13(38.5%)	61.56±19.13(24.07-99.06)	27(4.34-50.46)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Não	7/15(46.7%)	86.86±18.10(51.38-122.33)	70	0,777
Sim	3/6(50.0%)	73.67±18.97(36.49-110.85)	33	
<b>Boca</b>				
Não	6/13(46.2%)	69.57±8.81(52.30-86.84)	56(25.80-85.80)	0,873
Sim	35/63(55.6%)	74.10±6.24(61.87-86.33)	78(49.80-105.80)	
<b>p53&gt; 5%</b>				
<b>Orofaringe p16-</b>				
Não	10/23(43.5%)	70.67±13.89(43.45-97.88)	45(1.45-88.55)	<b>0,017</b>
Sim	1/8(12.5%)	18.40±6.92(4.84-31.96)	12(6.63-17.37)	
<b>Orofaringe p16+</b>				
Não	8/17(47.1%)	88.27±16.68(55.57-120.97)	70	0,969
Sim	2/4(50.0%)	59.80±21.97(16.74-102.86)	21	
<b>Boca</b>				
Não	16/28(57.1%)	73.33±9.88(53.96-92.70)	NA	0,929
Sim	25/48(52.1%)	73.54±6.49(60.82-86.27)	74(57.18-90.02)	

\*p<0,05, teste Log-Rank Mantel-Cox. SG = sobrevida global; CI95% = intervalo de confiança 95% da média ou mediana de SG.

**Tabela 5:** Análise multivariada de fatores prognósticosna sobrevida global de pacientes com CEC de boca e orofaringe

	<b>p-Valor</b>	<b>aHR</b>	<b>CI95%</b>	
<b>Hazard risk for dead</b>				
Tumor	0,822	0,941	0,552	1,603
Sexo M	<b>0,009</b>	<b>4,139</b>	<b>1,434</b>	<b>11,947</b>
Idade ↑	0,134	1,374	0,907	2,084
Grau de instrução ↓	<b>0,004</b>	<b>21,158</b>	<b>2,664</b>	<b>168,024</b>
Fumo	<b>0,024</b>	<b>2,774</b>	<b>1,143</b>	<b>6,735</b>
Álcool	0,059	2,287	0,970	5,390
pT	0,244	1,629	0,717	3,701
pN	0,056	2,230	0,981	5,070
RT	<b>0,010</b>	<b>0,204</b>	<b>0,061</b>	<b>0,681</b>
QT	0,130	1,882	0,829	4,273
MSH2 ↑	<b>0,006</b>	<b>0,968</b>	<b>0,946</b>	<b>0,991</b>
MSH6 ↑	0,051	1,021	1,000	1,043
MLH1 ↑	0,197	1,015	0,992	1,038
PMS2 ↑	0,273	0,985	0,957	1,012
NFkB (núcleo) ↑	0,080	0,963	0,923	1,004
NFkB (citoplasma) ↑	0,422	1,006	0,991	1,022
NFkB (razão N:C) ↑	0,323	2,022	0,500	8,180
p53 ↑	0,085	1,025	0,997	1,055
ki67 ↑	0,546	0,996	0,984	1,008

\*p<0,05, regressão de Cox (aHR = adjusted Hazard Risk; CI95% = intervalo de confiança 95% aHR).

**Material suplementar 1:** Influência da localização e de características clínico-patológicas na imunexpressão de proteínas do eixo MMR-NFkB em pacientes com CEC de orofaringe p16-

	NFkB								
	MSH2	MSH6	MLH1	PMS2	Núcleo	Citoplasma	Relação N/C	ki67	p53_média
<b>Sexo</b>									
Feminino	21.80±37.61	31.31±42.00	0.00±0.00	13.15±18.28	1.55±3.02	78.29±19.82	0.03±0.07	22.65±15.47	4.94±9.69
Masculino	23.75±28.13	41.81±33.20	9.47±18.83	8.63±17.49	2.08±2.84	77.03±24.08	0.03±0.05	16.10±15.05	14.77±15.90
<b>p-Valor</b>	0,888	0,578	0,337	0,608	0,714	0,914	0,990	0,566	0,231
<b>Idade</b>									
Até 60	16.79±25.36	30.62±31.54	1.77±3.43	5.94±13.44	1.95±2.77	70.98±24.35	0.04±0.06	18.16±15.98	15.28±13.34
>60	31.42±33.32	52.29±34.19	15.53±24.65	13.47±20.87	2.02±2.99	84.50±19.91	0.03±0.05	14.80±13.83	9.95±8.54
<b>p-Valor</b>	0,190	0,100	0,069	0,260	0,952	0,123	0,792	0,620	0,473
<b>Escolaridade</b>									
Ens fundamental	24.41±30.51	40.98±35.34	8.47±18.00	9.43±17.81	2.06±2.85	76.42±23.04	0.03±0.06	15.88±14.68	14.01±10.59
Ens médio	14.13±21.75	34.40±23.14	0.00±0.00	9.47±16.41	0.00±1.00	100.00±1.00	0.00±1.00	33.59±1.00	0.00±1.00
<b>p-Valor</b>	0,578	0,758	0,523	0,997	0,484	0,324	0,547	0,254	0,245
<b>Fumo</b>									
Não	25.54±32.96	38.44±35.64	8.17±20.38	10.57±19.58	1.93±2.42	82.77±21.11	0.03±0.04	15.09±14.31	13.98±11.97
Sim	17.60±18.56	46.58±28.96	6.84±11.77	6.62±10.55	2.11±3.85	63.47±23.11	0.04±0.08	19.98±16.44	10.56±10.48
<b>p-Valor</b>	0,528	0,614	0,868	0,596	0,884	<b>0,043</b>	0,560	0,490	0,656
<b>Álcool</b>									
Não	24.03±32.52	38.09±36.11	6.25±18.01	10.90±19.16	1.86±2.58	78.39±23.37	0.03±0.05	15.24±14.69	14.91±13.14
Sim	20.74±15.35	47.83±26.06	13.68±14.08	4.08±6.65	2.55±4.10	72.05±23.20	0.04±0.08	21.47±15.89	10.32±9.10
<b>p-Valor</b>	0,813	0,545	0,453	0,405	0,629	0,586	0,654	0,426	0,538
<b>pT</b>									
pT1-pT2	22.84±29.14	34.66±32.42	7.48±11.72	5.91±12.89	2.71±3.40	82.59±21.08	0.04±0.06	14.19±13.78	12.10±13.70
pT3-pT4	23.76±30.89	46.28±35.75	7.87±22.58	12.97±20.83	1.15±1.73	71.11±24.49	0.02±0.05	18.62±15.88	13.39±6.62
<b>p-Valor</b>	0,936	0,384	0,960	0,291	0,148	0,194	0,443	0,513	0,867
<b>pN</b>									
pN0	27.34±31.34	45.69±34.29	8.94±20.12	9.19±16.19	2.27±3.10	81.15±20.84	0.04±0.06	17.29±13.89	13.32±7.55
pN+	19.08±28.09	34.40±33.87	5.59±12.24	9.69±19.10	1.65±2.55	72.77±25.44	0.03±0.05	16.09±16.53	10.96±18.98
<b>p-Valor</b>	0,462	0,398	0,676	0,941	0,575	0,347	0,803	0,859	0,774
<b>RT</b>									
Não	23.97±29.83	36.62±29.64	10.57±23.33	15.72±21.20	2.73±3.03	78.38±19.49	0.04±0.06	15.05±12.77	15.65±10.76
Sim	23.07±30.24	42.07±36.55	5.48±11.58	6.46±14.96	1.63±2.73	76.73±25.03	0.03±0.06	17.98±16.64	8.06±10.92
<b>p-Valor</b>	0,941	0,702	0,518	0,193	0,344	0,863	0,585	0,666	0,309
<b>QT</b>									
Não	23.12±29.22	38.49±33.49	9.63±19.44	10.80±19.11	2.42±2.95	74.92±23.68	0.04±0.06	16.05±13.56	13.41±11.46
Sim	24.07±33.09	46.42±37.91	1.38±3.08	5.34±10.71	0.00±0.00	87.99±17.99	0.00±0.00	19.59±21.70	10.75±11.64
<b>p-Valor</b>	0,943	0,623	0,364	0,482	0,083	0,258	0,138	0,678	0,746

\*p<0,05, teste Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis/Dunn (média±DP).

**Material suplementar 2:** Influência da localização e de características clínico-patológicas na imunexpressão de proteínas do eixo MMR-NFkB em pacientes com CEC de orofaringe p16+

					NFkB			ki67	p53_média
	MSH2	MSH6	MLH1	PMS2	Núcleo	Citoplasma	Relação N/C		
<b>Sexo</b>									
Feminino	64.99±24.76	8.66±13.90	1.74±4.60	1.94±1.72	76.63±31.42	0.02±0.02	38.76±1.00	50.23±35.59	78.12±36.5
Masculino	33.29±35.57	3.34±11.54	8.90±18.48	8.08±15.37	80.38±23.79	0.25±0.64	39.75±17.90	19.79±28.08	70.46±39.2
<b>p-Valor</b>	0,067	0,401	0,333	0,349	0,772	0,394	0,966	0,052	0,418
<b>Idade</b>									
Até 60	32.90±33.28	47.82±33.13	1.55±5.60 *	3.38±7.08	5.98±14.42	80.45±22.86	0.08±0.19	10.58±14.86	30.86±1.00
>60	24.69±36.33	33.51±40.90	14.37±19.84	12.52±25.17	6.86±10.36	76.48±33.15	0.42±0.96	14.01±15.60	42.38±16.4
<b>p-Valor</b>	0,628	0,427	<b>0,042</b>	0,230	0,894	0,759	0,206	0,702	0,606
<b>Escolaridade</b>									
Ens fundamental	37.95±33.44	47.98±36.10	6.57±13.62	7.93±16.72	7.54±14.39	78.46±26.41	0.23±0.60	11.44±13.98	43.33±15.2
Ens médio	0.42±0.84	18.31±17.32	0.03±0.05	0.00±0.00	1.05±1.32	82.45±24.74	0.01±0.01	11.70±20.27	28.03±1.00
<b>p-Valor</b>	0,051	0,189	0,361	0,366	0,388	0,788	0,494	0,979	0,477
<b>Fumo</b>									
Não	25.14±31.74	40.18±37.62	5.13±13.12	7.44±16.27	7.64±14.34	82.09±22.61	0.23±0.60	10.29±10.82	73.44±36.6
Sim	51.65±36.15	54.98±24.98	5.05±10.10	0.00±0.00	0.67±0.97	67.92±36.72	0.01±0.01	16.31±28.25	72.80±39.5
<b>p-Valor</b>	0,162	0,472	0,991	0,450	0,354	0,333	0,482	0,542	0,946
<b>Álcool</b>									
Não	32.66±33.50	51.05±37.59	7.17±15.25	4.07±7.67	10.05±15.97	81.56±25.80	0.30±0.69	7.45±8.15	43.33±15.2
Sim	27.11±35.43	32.64±30.88	2.54±7.13	10.02±23.48	0.53±0.80	75.81±26.39	0.01±0.01	17.56±20.36	28.03±1.00
<b>p-Valor</b>	0,727	0,273	0,441	0,423	0,112	0,634	0,242	0,198	0,477
<b>pT</b>									
pT1-pT2	44.50±33.09	67.09±21.30	6.69±14.16	3.67±7.91	4.27±8.71	72.10±34.16	0.28±0.79	7.29±9.74	30.86±1.00
pT3-pT4	16.38±28.82	21.89±31.74	3.54±10.58	9.15±20.63	7.85±16.05	85.12±14.76	0.11±0.21	14.29±17.03	42.38±16.4
<b>p-Valor</b>	0,058	<b>0,002</b>	0,600	0,446	0,557	0,267	0,494	0,382	0,606
<b>pN</b>									
pN0	30.89±35.57	43.87±36.54	10.26±17.65	1.74±4.60	6.43±9.49	80.15±32.13	0.37±0.89	12.21±14.13	77.38±37.6
pN+	30.20±33.77	43.04±36.17	1.84±6.09	8.90±18.48	6.14±15.01	78.78±22.64	0.08±0.20	11.14±15.52	69.39±38.9
<b>p-Valor</b>	0,967	0,964	0,160	0,333	0,963	0,912	0,278	0,899	0,372
<b>RT</b>									
Não	1.40±1.28	36.76±37.98	0.03±0.06	4.94±8.56	0.53±0.79	91.25±6.11	0.01±0.01	13.35±19.01	28.03±1.00
Sim	35.57±33.82	44.52±35.91	6.13±13.23	6.51±16.24	7.25±13.98	77.14±27.12	0.21±0.58	11.03±14.26	43.33±15.2
<b>p-Valor</b>	0,104	0,737	0,448	0,875	0,426	0,391	0,554	0,816	0,477
<b>QT</b>									
Não	25.45±32.53	33.80±35.51	6.49±12.41	12.15±21.38	1.98±2.59	90.19±10.60	0.02±0.03	6.76±6.92	43.33±15.2
Sim	33.77±35.09	50.21±35.08	4.01±12.65	1.99±6.59	9.08±16.39	71.97±30.11	0.29±0.69	15.63±18.48	28.03±1.00
<b>p-Valor</b>	0,600	0,331	0,682	0,153	0,244	0,120	0,284	0,254	0,477

\*p<0,05, teste Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis/Dunn (média±DP).

**Material suplementar 3:** Influência da localização e de características clínico-patológicas na imunoe expressão de proteínas do eixo MMR-NFkB em pacientes com CEC de boca

	NFkB								
	MSH2	MSH6	MLH1	PMS2	Núcleo	Citoplasma	Relação N/C	ki67	p53_média
<b>Sexo</b>									
Feminino	21.48±26.28	22.25±25.35	8.73±19.28	6.66±18.52	10.95±16.09	75.79±21.77	0.16±0.29	18.31±16.81	4.94±9.69
Masculino	31.48±27.53	33.02±31.16	8.16±18.04	4.53±15.86	7.41±11.11	72.36±27.38	0.12±0.18	21.43±17.79	14.77±15.90
<b>p-Valor</b>	0,180	0,147	0,904	0,615	0,333	0,641	0,558	0,490	0,231
<b>Idade</b>									
Até 60	67.77±42.11	26.87±29.27	31.55±30.97	7.53±16.28	3.95±13.46	8.11±12.91	70.78±26.93	0.13±0.26	19.53±16.26
>60	80.45±31.33	30.45±24.36	25.04±26.87	9.70±21.54	7.54±21.26	9.09±12.87	77.53±23.51	0.12±0.15	21.66±19.32
<b>p-Valor</b>	0,160	0,620	0,379	0,638	0,393	0,777	0,329	0,855	0,630
<b>Escolaridade</b>									
Ens fundamental	72.27±38.57	27.97±27.46	28.34±29.58	7.87±18.40	5.46±16.99	8.61±12.87	73.57±25.85	0.13±0.22	20.15±17.00
Ens médio	100.00±0.00	45.71±1.00	52.81±4.55	24.55±0.25	0.00±0.00	1.35±1.00	64.19±1.00	0.02±1.00	26.94±37.41
<b>p-Valor</b>	0,316	0,524	0,250	0,208	0,653	0,578	0,720	0,620	0,591
<b>Fumo</b>									
Não	27.14±23.95	28.03±24.25	7.46±19.41	2.61±11.57	8.13±13.06	76.82±24.93	0.09±0.13	24.21±20.48	4.94±9.69
Sim	28.75±28.94	29.52±31.71	8.76±18.05	6.56±18.69	8.66±12.83	71.79±26.15	0.15±0.25	18.47±15.59	14.77±15.90
<b>p-Valor</b>	0,832	0,848	0,789	0,365	0,883	0,486	0,368	0,208	0,231
<b>Álcool</b>									
Não	75.65±36.28	28.83±25.52	29.91±27.87	10.38±20.02	6.31±17.99	8.23±11.53	74.84±25.79	0.11±0.14	22.50±17.97
Sim	66.24±43.32	26.87±32.06	26.87±33.85	3.15±12.02	2.99±13.70	9.19±16.13	69.57±25.72	0.18±0.36	14.05±14.27
<b>p-Valor</b>	0,343	0,800	0,705	0,146	0,453	0,799	0,488	0,278	0,084
<b>pT</b>									
pT1-pT2	66.45±42.14	27.43±27.64	30.19±28.76	15.08±24.81	6.70±18.69	9.75±16.33	77.57±17.74	0.14±0.28	22.93±16.61
pT3-pT4	77.15±35.55	28.78±27.48	28.41±30.14	3.93±10.64	4.46±15.66	7.69±10.10	70.75±29.57	0.13±0.18	18.82±17.87
<b>p-Valor</b>	0,241	0,851	0,812	<b>0,013</b>	0,594	0,550	0,324	0,835	0,354
<b>pN</b>									
pN0	22.37±24.43	22.08±26.16	9.88±20.30	7.51±19.14	11.47±17.52	78.44±17.35	0.16±0.28	15.98±16.13	4.94±9.69
pN+	32.51±28.82	34.57±31.01	7.16±16.82	3.61±14.72	6.58±8.29	70.20±29.57	0.11±0.18	26.44±17.55	14.77±15.90
<b>p-Valor</b>	0,151	0,082	0,548	0,342	0,154	0,232	0,478	<b>0,014</b>	0,231
<b>RT</b>									
Não	79.64±39.96	16.25±30.24	20.91±31.89	12.01±23.12	0.00±0.00	4.21±4.24	74.77±15.14	0.06±0.05	23.44±14.90
Sim	71.88±38.23	30.04±26.71	30.47±29.05	7.73±17.56	6.20±18.00	9.07±13.46	73.23±26.86	0.14±0.23	19.81±17.86
<b>p-Valor</b>	0,538	0,185	0,347	0,499	0,283	0,350	0,883	0,351	0,547
<b>QT</b>									
Não	71.93±39.00	26.98±26.50	27.99±29.25	10.75±20.54	7.79±20.39	9.85±15.30	73.87±26.34	0.15±0.25	25.12±18.91
Sim	74.39±37.98	30.02±28.86	30.42±30.11	4.95±14.33	1.88±9.08	6.64±8.21	72.78±25.23	0.10±0.18	14.12±13.05
<b>p-Valor</b>	0,784	0,669	0,738	0,202	0,150	0,346	0,873	0,447	<b>0,009</b>

\*p&lt;0,05, teste Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis/Dunn (média±DP).