



**CENTRO UNIVERSITÁRIO CHRISTUS
MESTRADO ACADÊMICO EM ODONTOLOGIA**

JORDANA MEDEIROS LIRA DECKER

**INFLUÊNCIA DA IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA PMS2 NO PROGNÓSTICO
E SOBREVIDA DE PACIENTES COM CÂNCER DE BOCA**

FORTALEZA

2019

JORDANA MEDEIROS LIRA DECKER

**INFLUÊNCIA DA IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA PMS2 NO PROGNÓSTICO
E SOBREVIVÊNCIA DE PACIENTES COM CÂNCER DE BOCA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro Universitário Christus, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Ciências odontológicas
Linha de Pesquisa: Estomatologia e Patologia Oral
Orientador: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros

FORTALEZA

2019

Ficha Catalográfica elaborada por Dayane Paula Ferreira Mota – Bibliotecária – CRB-3/1310

D295i Decker, Jordana Medeiros Lira.
Influência da imunexpressão da proteína PMS2 no prognóstico e
sobrevida de pacientes com câncer de boca / Jordana Medeiros Lira
Decker. – 2019.
47 f. : il. ; color.

Dissertação (Mestrado) – Centro Universitário Christus - Unichristus,
Mestrado em Ciências Odontológicas, Fortaleza, 2019.

Orientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros.

Coorientação: Prof. Dr. Fabricio Bitu de Sousa.

Área de concentração: Ciências odontológicas.

1. Câncer. 2. Cavidade oral. 3. Imuno-histoquímica. 4. Lâminas. 5.
Proteínas. I. Título.

CDD 616.99431

JORDANA MEDEIROS LIRA DECKER

**INFLUÊNCIA DA IMUNO-EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PMS2 NO PROGNÓSTICO
E SOBREVIDA DE PACIENTES COM CÂNCER DE BOCA**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Odontologia do Centro Universitário Christus, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Ciências odontológicas
Linha de Pesquisa: Estomatologia e Patologia Oral
Orientador: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros

Aprovada em ___ / ___ / _____

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Fabricio Bitu de Sousa
Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS)

Prof. Dra. Gloria Maria Pimenta Cabral
Instituto de Ensino Superior da Paraíba (IESP)

Dedico a Deus e aos meus pais Jordan e
Lourdinha.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que em sua bondade me guiou até onde estou para uma vida tão afortunada e um destino do qual nem sou merecedora.

A minha família, em especial aos meus pais, Jordan e Lourdinha e ao meu irmão Jordan Júnior pela educação, amor, incentivo, discernimento, orientação, apoio emocional, psicológico, motivacional e financeiro em todos os momentos que precisei de vocês e por sonharem esse sonho comigo.

Ao meu marido, Cleo Decker, companheiro dessa e de outras vidas, que sempre me incentivou a sair da zona de conforto, me impulsionando a encarar os desafios, sendo a calma que eu precisava em dias turbulentos.

Agradeço também aos meus orientadores Fabrício Bitu Sousa e Paulo Goberlânio de Barros (Paulinho) por me aceitarem como sua orientanda, me acolherem em terras cearenses e sempre resolverem os problemas que ainda estavam por surgir, mostrando os caminhos e soluções de uma forma leve, me levando à área acadêmica e à docência da melhor forma que um orientador poderia levar. Agradeço por serem exemplos de ser humano e de professor com aulas, práticas laboratoriais, conselhos e exemplos inspiradores e motivacionais.

Aos professores do mestrado, que me acolheram e sempre pensavam na “paraibana” antes de cada aula prática, em horários de chegada e saída e em conteúdos; em especial a professora Danna que é o amor em forma de ser humano e à professora Thinali Dantas por toda dedicação, empenho e incentivo para que esta pesquisa se concretizasse. Meu muito obrigada.

A meus amigos e companheiros de profissão, em especial a minha amiga, Glória Pimenta, minha maior inspiração dentro da minha profissão, incentivadora de todos os meus passos, clínico-profissionais e agora na docência, que me fez florescer como dentista e aflorou meus desejos de cuidar do outro ampliando minha visão do mundo.

A todos os meus colegas de mestrado: Liliana, Smyrna, Adriana, Isabella, Tereza, Ilana, Luiza, Carol, Vanessa, Raquel e Johndner que foram suporte para mim em cada módulo, em cada chegada, sempre com palavras incentivadoras e um suporte e apoio imensurável em cada passagem por Fortaleza.

São as nossas escolhas que revelam o que realmente somos,
muito mais do que as nossas qualidades.

J.K. Rowling

RESUMO

O carcinoma de células escamosas (CEC) de boca é uma neoplasia maligna de origem epitelial, com elevadas taxas de incidência e mortalidade. A expectativa de vida e o prognóstico dos pacientes é traçado basicamente pelo estadiamento clínico e existem poucos marcadores relevantes no seu prognóstico. As proteínas de reparo do DNA ou MMR são uma família de proteínas que têm como função corrigir os erros de codificação do genoma, dentre as quais a PMS2 têm a função de sinalizar a correção de um fragmento de DNA transcrito. Assim, foi objetivo do presente estudo, avaliar a influência da imunexpressão da proteína PMS2 no prognóstico de pacientes com câncer de boca. O universo da pesquisa constou de 76 pacientes que foram tratados no Hospital Haroldo Juaçaba, no período de 2011 a 2016. Foram levantados prontuários com informações clínico-patológicas incluindo sexo, idade, TNM, localização do tumor, tratamento e sobrevida global e realizada a imuno-histoquímica, por meio da técnica TMA para Ki67 e para a proteína PMS2. Os testes Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados para comparação do perfil de imunomarcção com as características clínico-patológicas e prognósticas e os testes qui-quadrado, Long-Rank Mantel-Cox e Regressão de Cox foram utilizados para análises de sobrevida ($p < 0,05$, SPSS 20,0). A imunexpressão foi avaliada quantitativamente através do software ImageJ e os dados foram correlacionados com os fatores prognósticos e a sobrevida dos pacientes. Como resultados, em relação ao marcador inflamatório Ki67, apenas a gradação histológica esteve associada à imunexpressão de Ki67, com os casos pobremente diferenciados com marcação significativamente superior aos casos bem ou moderadamente diferenciados. Em relação a proteína PMS2, sua imunexpressão foi mais presente em outras localizações (fora língua e assoalho bucal), e em relação a sobrevida, a maior imunexpressão para PMS2 teve influência, onde em pacientes jovens a imunexpressão aumentada dessa proteína influenciou significativamente o prognóstico de pacientes abaixo de 60 anos de idade em uma amostra que corrobora o perfil clínico-patológico convencional dos carcinomas de boca.

Palavras-Chaves: Carcinoma de células escamosas, Enzimas reparadoras do DNA, Proteína 2 Homóloga a MutS , Antígeno Nuclear de Célula em Proliferação

ABSTRACT

The squamous cell carcinoma (SCC) of the mouth is a malignant neoplasm of epithelial origin, with high rates of incidence and mortality. The life expectancy and prognosis of the patients is basically traced by clinical staging and there are few relevant markers in their prognosis. DNA repair proteins or MMRs are a family of proteins whose function is to correct genomic coding errors, among which PMS2 have the function of flagging the correction of a transcribed DNA fragment. Thus, it was the objective of the present study to evaluate the influence of immunoexpression of the PMS2 protein on the prognosis of patients with oral cancer. The research universe consisted of 76 patients who were treated at the Hospital Haroldo Juaçaba from 2011 to 2016. Clinical and pathological data including sex, age, TNM, tumor location, treatment and overall survival were performed. -histochemistry, by means of the TMA technique for Ki67 and for the PMS2 protein. The Mann-Whitney and Kruskal-Wallis tests were used to compare the immunoblot profile with the clinical-pathological and prognostic characteristics, and the chi-square, Long-Rank Mantel-Cox and Cox Regression tests were used for survival analysis ($p < 0.05$, SPSS 20.0). Immunoexpression was assessed quantitatively through ImageJ software and data were correlated with prognostic factors and patient survival. As a result, in relation to the Ki67 inflammatory marker, only histological gradation was associated with Ki67 immunoexpression, with poorly differentiated cases with markedly superior marking to well or moderately differentiated cases. In relation to the PMS2 protein tumor cells in other locations (outside tongue and buccal floor), they showed greater immunoexpression for PMS2 and survival had influence, where in young patients the increased immunoexpression of this protein significantly influenced the prognosis of patients under 60 years of age in a sample that corroborates the conventional clinical-pathological profile of oral carcinomas.

Keywords: Carcinoma of squamous cells, DNA repair enzymes, 2 Protein Homologous to MutS, Proliferating Cell Nuclear Antigen

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
2. CÂNCER DE BOCA.....	10
2.1. Epidemiologia.....	10
2.2. Características clínicas, histopatológicas e prognósticas	11
2.3. Enzimas de correção do material genético: vias DNA <i>Mismatch Repair</i> (MMR)	12
3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	17
4. HIPÓTESES DE TRABALHO	18
5. OBJETIVOS	19
5.1. Objetivo Geral.....	19
5.2. Objetivos Específicos.....	19
6. MATERIAIS E MÉTODOS	20
6.1. Delineamento amostral	20
6.2. Tipo de estudo e casuística.....	20
6.3. Técnica do <i>Tissue Microarray</i> (TMA) e Processamento imuno-histoquímico.....	22
6.4. Análise Imuno-histoquímica	24
6.5. Delineamento estatístico.....	24
6.6. Aspectos Éticos	25
7. RESULTADOS	26
7.1 Dados clínico-patológicos e sobrevida de 5 anos do câncer de boca.....	26
7.2. Perfil imuno-histoquímico para marcadores de proliferação celular em diferentes tecidos	28
7.3. Influência das características clínico-patológicas na imunoexpressão de marcadores de proliferação celular no CEC de boca.....	31
8. DISCUSSÃO	32
9. CONCLUSÃO	38
REFERÊNCIAS.....	39
ANEXO	44

1. INTRODUÇÃO

O câncer é a segunda principal causa de morte no mundo e foi responsável por aproximadamente 9,6 milhões de mortes em 2018. A nível global, uma em cada seis mortes são relacionadas à doença. Aproximadamente 70% das mortes por câncer ocorrem em países de baixa e média renda, sendo associado a fatores genéticos, comportamentais e alimentares (LANCET, 2016). Necessário, portanto, o conhecimento do perfil epidemiológico dos pacientes para que se possam detectar possíveis variações no comportamento da doença, direcionar as atividades de promoção e prevenção em saúde, e promover o diagnóstico precoce, visando um tratamento mais efetivo da população (SOUSA et al., 2016).

O entendimento do comportamento e mecanismo biológico e da sua etiologia permitem avanços importantes no diagnóstico e na terapêutica (BEZERRA DE MOURA et al., 2006). São utilizados vários critérios morfológicos para descrever a agressividade de um tumor, dentre estes, o tipo histológico, o grau do pleomorfismo celular, a resposta inflamatória, o número de mitoses, comprometimento de vasos sanguíneos e linfáticos, estadiamento clínico, tamanho e localização da lesão, análise de margens, aliados ao uso de marcadores biológicos, são de grande valia no entendimento do câncer (BEZERRA DE MOURA et al., 2006).

Os marcadores biológicos são componentes celulares, estruturais e bioquímicos que são úteis para definir alterações celulares e moleculares tanto em células normais quanto aquelas associadas à transformação maligna (CAPELOZZI, 2001).

Os mecanismos envolvidos no reparo do DNA são de interesse para as pesquisas com câncer pelo fato de que mutações nos genes de reparo podem ser responsáveis pelo desenvolvimento de tumores e pelo desenvolvimento de resistência das células malignas a agentes quimioterápicos (ROBERTSON et al., 2009). Dentre 5 mecanismos já conhecidos de reparo do genoma (BALABAN et al., 2005), o sistema MMR (DNA *mismatchrepair*) é responsável pela detecção e correção de erros criados durante a replicação do DNA, evitando assim a incorporação de mutações nas células em divisão, corrigindo as bases incorporadas incorretamente ao genoma devido ao erro de replicação, evitando assim a entrada no processo de carcinogênese (OLIVEIRA, 2006).

O complexo MMR codifica uma série de proteínas de correções de mutações do material genético, formado por três grupos ou subunidades: MutS α (hMSH2+hMSH6), MutS β (hMSH2+hMSH3) e MutL α (hMLH1+hPMS2). Vários estudos, inclusive o de Oliveira et al, 2006, sustentam a hipótese que as vias do sistema MMR defeituoso desempenham um

papel potencialmente funcional no câncer bucal e na instabilidade genética na carcinogênese oral.

2. CÂNCER DE BOCA

2.1. Epidemiologia

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

No Brasil, o câncer é um problema de saúde pública, gerando enormes gastos ao Sistema Único de Saúde (SUS). Esse tema ganha relevância pelo perfil epidemiológico que essa doença vem apresentando, e, com isso, conquistando espaço nas agendas políticas e técnicas de todas as esferas de governo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). 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, e merece a atenção das autoridades de saúde, principalmente quanto à implementação de programas de diagnóstico precoce e de combate aos seus fatores de risco, pois se trata uma doença, na maioria das vezes, relacionada à exposição a fatores ambientais evitáveis (CASATI et al., 2012).

Estudos demonstram que o contínuo crescimento populacional, bem como seu envelhecimento, pode afetar de forma significativa o impacto do câncer no mundo. (SCULY, 2005). No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 apontaram a ocorrência de aproximadamente 518.510 casos novos de câncer, sendo esperados um total de 257.870 novos casos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Em relação ao estado do Ceará, foram estimados para 2012, 17.390 casos de neoplasias malignas, sendo 430 acometendo à cavidade oral. Em Fortaleza, capital do estado, 140 casos em cavidade oral são estimados por ano (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Essas lesões, muitas vezes, são diagnosticadas tardiamente o que leva a um prognóstico pobre. Além disso, o tratamento é mais mutilante, gerando sequelas estéticas e

funcionais, com grande impacto sobre a qualidade de vida e saúde psicológica dos pacientes acometidos por essas lesões (LAMBERT et al., 2011).

2.2. Características clínicas, histopatológicas e prognósticas

O tipo histológico mais prevalente no câncer de boca e de orofaringe é o Carcinoma de Células Escamosas (CEC), 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 (BRASIL, 2018). O risco de desenvolvimento 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 ainda não é bem definida, vários agentes têm sido implicados no seu desenvolvimento, onde a combinação de fatores extrínsecos e intrínsecos parece ampliar o seu potencial de estimulação na divisão celular, a qual de maneira desgovernada dá origem ao tumor. (BASCONES et al., 2011). São fatores etiológicos que podem ser associados a essa neoplasia o tabaco, o álcool, a susceptibilidade genética, os agentes infecciosos, radiação, lesões pré-cancerosas, nutrição e fatores orais e ocupacionais. Tem como 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, assoalho bucal são as localizações mais 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 (WHO, 2005).

O carcinoma de células escamosas evolui a partir de um complexo processo resultante da exposição a agentes carcinogênicos e inclui várias etapas constituídas de mudanças genéticas, epigenéticas e metabólicas (WONG, 2002). Exposição crônica a esses agentes levam a instabilidade genética nas células epiteliais, levando ao desenvolvimento de lesões potencialmente malignas 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 desordens potencialmente malignas (DPM) 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 (BOMBECCARI et al., 2011; LODI et al., 2005).

Apesar de um prognóstico nitidamente diferente, a diferença entre o comportamento biológico dos carcinomas oral e orofaríngeo ainda não é bem definido. A expressão de proteínas de proliferação celular convencionais como o Ki67 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 os dois tipos de lesão (RIVERA et al., 2014). Todavia, perspectivas distintas surgem quando proteínas afetadas pelo HPV são estudadas: a proteína de proliferação P16 (LEWIS et al., 2010).

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. Tem disso demonstrado que a redução da imunexpressão dessas proteínas de correção (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) está associada ao aumento da frequência de perda de heterozigidade, como exemplo 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 (ZHANG et al., 2015) e, em carcinomas de colo retal a metilação de MLH1 ocorre paralelamente a metilação do códon CDKN2A do gene P16 (PSOFAKI et al., 2010).

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 uma importante perspectiva (BRINKMAN; WONG, 2006; JADOTTE, 2012). No entanto, estudos relacionados ao prognóstico e carcinogênese dos cânceres de boca são ainda escassos.

2.3. Enzimas de correção do material genético: vias DNA *Mismatch Repair* (MMR)

Os processos que levam ao surgimento do CEC são resultados do acúmulo de alterações genéticas em células, levando a mutações ativas, inibição de genes supressores tumorais ou aumento da oncogênese, que são alterações em proto-oncogenes celulares. Todas estas são envolvidas no crescimento, sobrevivência e manutenção celular, ademais a manutenção celular inclui também a suspensão da proliferação das células (MEYRS; HOFFERT, 2011). Todas essas alterações são originadas de múltiplos eventos moleculares, advindos de influências combinadas, podendo estar relacionadas a pré-disposição genética e exposição a carcinógenos ambientais (MOTTA, 2009).

Com o intuito de manter o seu correto funcionamento, essas células usam de artifícios para manter a plenitude e fidelidade ao genoma. Esses mecanismos têm por objetivo minimizar a frequência com que as mutações ocorrem. Um desses é o complexo de correção do material genético chamado de família MMR (DNA *mismatch repair*). Tal mecanismo tem sua maior atuação no que diz respeito à correção e detecção de erros apresentados durante a replicação do DNA, evitando a expressão de mutações nas células (EDELBRÖCK et al., 2013).

O complexo MMR codifica uma série de proteínas de correções de mutações do material genético. Essas proteínas atuam de maneira conjunta, formando os complexos que são chamados "MutL homologues" e "MutS homologous". Esses complexos se interlaçam para formar grupos proteicos, cada um deles desempenhando diferentes funções. De maneira geral, o complexo MMR é formado de três grupos ou subunidades: MutS α (hMSH2+hMSH6), MutS β (hMSH2+hMSH3) e MutL α (hMLH1+hPMS2).

Esse complexo apresenta importante função corretiva de três tipos de erros: pareamento desigual de bases simples, bases quimicamente alteradas e alças na hélice. No primeiro tipo de erro, a DNA polimerase falha em parear um nucleotídeo na fita-padrão de DNA com o seu complemento correto na fita nova que está sendo sintetizada. No segundo tipo de erro, a polimerase incorpora bases modificadas quimicamente por mutágenos na fita nova que está sendo sintetizada. O terceiro tipo de erro ocorre quando a polimerase se vê face a uma sequência muito repetitiva de DNA, como muitos nucleotídeos A (polyA) ou muitos dinucleotídeos (LIN et al., 2007).

O mecanismo de MMR tem início quando forma um complexo com o DNA que possui nucleotídeos recém-sintetizados e inseridos erroneamente, formando o complexo chamado de MutS-DNA. Esse complexo interage com as proteínas MutL, em uma reação dependente de energia (ATP). O MSH2 em conjunto com a MSH6 forma a estrutura que reconhece pequenos mismatches e pequenos loops de inserção/deleção (denominado indel), essa correção de mismatches é dependente de ATP, mas não dá hidrólise de nucleotídeos (OLIVEIRA et al., 2009) e estão presentes em todas as fases do ciclo celular.

A interação entre esses complexos ativa a endonuclease MutH, que é responsável pelo início dos mecanismos de reparo de DNA, como por exemplo, a clivagem da cadeia danificada e conseqüentemente a substituição dos nucleotídeos incorretos (LIN et al., 2007). Dependendo da posição em que a cadeia foi quebrada em relação à região de mismatch, as exonucleases podem agir na direção 5' --> 3', ou na direção oposta. Essas exonucleases removem nucleotídeos do gap (quebra da cadeia) prolongando as regiões posteriores do

mismatch. O complexo MutS α (MSH2-MSH6) ativa a EXO1 que hidrolisa na região 5' no mismatch do DNA, a hidrolisação dos nucleotídeos resultando em sua remoção em cerca de 2.000 unidades (NIESSEN et al., 2009).

Esse reparo genético é um processo altamente conservador e específico de excisão e ressíntese da cadeia de DNA, que tem como função corrigir erros de incorporação de nucleotídeos durante a replicação, defeitos nos nucleótidos resultantes da recombinação entre pais heterozigotos ou danos físicos ao DNA (JEON et al., 2016). Ativado por homólogos de MutS (MSH) e homólogos de MutL (MLH/PMS) formam as “tesouras moleculares”, extremamente estáveis que podem ser ligadas pelo complexo MLH /PMS para autorizar excisão específica da cadeia marcada (JEON et al., 2016).

O complexo MutS é formado por um dímero, as proteínas MSH2 e MSH6. Essas duas proteínas atuam conjuntamente interagindo entre si com o intuito de reconhecer e reparar o segmento de DNA incompatível por meio do processo de reconhecimento de erros de sequenciamento de bases nitrogenadas. Após esse reconhecimento ocorre ativação do complexo MutL. O complexo MutL é formado pelo dímero MLH /PMS (PMS2, PMS1 ou MLH3 para formar MutLa, MutL β ou MutLy, respectivamente) o qual vai interagir com o complexo de MutS e recrutar outras enzimas do sistema de reparo incluindo EXO1, PCNA1, RPA, helicase e DNA polimerase (BUZA et al., 2016).

Após a identificação e acoplagem dos complexos MutS e MutL, é formado um conglomerado de proteínas que irão ordenar as funções das outras proteínas que fazem o reparo do DNA durante a replicação. A resposta ao dano do DNA dependente da comunicação com outras vias de reparo com consequente ativação do Antígeno Nuclear de Proliferação Celular (PCNA). O PCNA, a partir desse momento, é ativado pelo MutL e, por sua vez, inicia a exérese do material genético marcado, excisando-o juntamente com o próprio complexo MutS-MutL (EDELBROCK et al., 2013) (Figura 1).

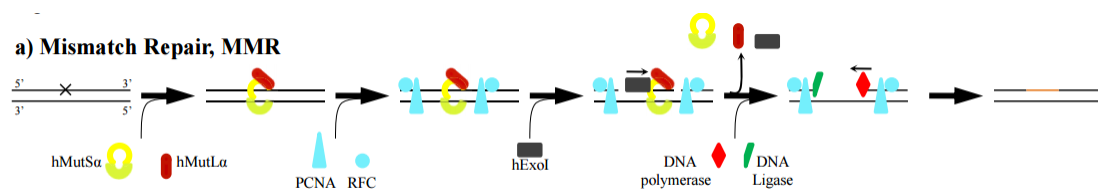


Figura 1: Figura esquemática de mecanismos de identificação e reparo dos erros em material genético durante checagem através das proteínas MutS α (complexo MSH2-MSH6) e MutL α (MLH1-PMS2) (JENSEN et al., 2011).

Desse modo, o complexo MMR atua no reparo do DNA e influência de modo indireto com as condições de saúde humana. Sendo considerado um supressor de tumor, existe uma relação clara entre a sua inativação (mutações germinativas) e o desenvolvimento de câncer atuando como supressor tumoral (SUTER et al., 2004). Esses supressores de tumor também comumente corrigem genes metilados (e inativado), no decurso da progressão neoplásica (SUTER et al., 2004), porém, a metilação do DNA tende afetar a expressão dos supressores de tumor, o gene do MMR, que tem participação em processos que incluem modulação do ciclo celular, reparo do DNA, apoptose, angiogênese, dentre outros, interferindo nos eventos de carcinogênese e prognóstico (LIU; YANG, 2015).

A influência da alteração dessas proteínas na carcinogênese e no prognóstico de diversos tumores tem sido descrita em uma série de tumores benignos, malignos e em modelos experimentais (LIU; YANG 2015). Em estudos *in vitro* a hipóxia, um importantíssimo fator estimulador da proliferação celular através de diversas vias, mostrou induzir o silenciamento de MLH1 com conseqüente alterações microestruturais das histonas exercendo importante papel na carcinogênese do carcinoma de células renais (YOO et al., 2014; LIU; YANG, 2015).

O estudo das mutações germinativas do gene no PMS2, enfatiza a predisposição para o aparecimento de câncer do colo retal, que aparentemente é esporádico em idade jovem. (PETLOMAKI, 2005) Já, em culturas celulares de tumores de mama a inativação de MSH2 mostrou estar associada a diferentes estágios da diferenciação maligna (SIGLEY et al., 2017). Ademais, em modelos experimentais com camundongos a deleção do gene MSH2 levou ao desenvolvimento de carcinomas colorretais (WOJCIECHOICZ et al., 2014) o que se deveu ao acúmulo de falhas genéticas não corrigidas que culminaram com o câncer (BERNSTEIN et al., 2013). O gene PMS2, também tem um papel no processo de apoptose, independente do MLH1, fato que enfatiza a importância do PMS2 como um gene de susceptibilidade ao câncer (ARNOLD et al., 2005; PETLOMAKI, 2005).

O papel dessas proteínas vai além dos estudos *in vitro* e *in vivo* e impacta na carcinogênese observada longitudinalmente e no prognóstico de lesões benignas e malignas em seres humanos. Em estudos com tumores benignos observou-se que a metilação de MLH1 é diretamente associada a perda de sua expressão e à surgimento de adenomas (BEGGS et al., 2013) e poliposeintestinal (PATEL et al., 2017), importantes lesões pré-malignas para o carcinoma colorretal. Em pacientes com carcinoma colorretal já estabelecidos, a mutação de genes da família MMR (MSH2, MSH6, MLH1) levou a redução do tempo livre de doença após início do tratamento (SINICROPE et al., 2015; GIARNINERI et al., 2000).

Com relação ao câncer intraoral, alguns trabalhos já foram desenvolvidos pesquisando algumas proteínas de forma isolada. HUI, BUZA, ZIAI (2016) descreveu que a redução da imuno-expressão de MLH1 é observada na transição de epitélios orais normais para leucoplasias e carcinomas de células escamosas. PEREIRA et al., (2013) demonstrou que a baixa expressão de MSH2 está associada a pobre prognóstico e WAGNER et al., (2016) mostrou que o estadiamento clínico é inversamente correlacionado com a expressão de MSH2 e MSH6. No entanto, o estudo da proteína PMS2 correlacionada ao câncer oral, tem sido pobremente descrita com escassos estudos sobre sua correlação.

Defeitos do gene PMS2 responsabilizam-se por significativa proporção de cânceres colorretais. Em quase 70% dos casos da síndrome de Lynch familiar, uma mutação germinativa em um dos quatro genes de reparo do DNA - MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 - pode ser identificada, com uma maior predileção para o gene PMS2. NIESSEN et al (2009) observou que, dentre 97 pacientes com Síndrome de Lynch sem mutações nos genes MLH1, MSH2, ou MSH6, quatro apresentaram mutações funcionais no gene PMS2, sugerindo que este gene possui grande importância no desenvolvimento da forma hereditária da doença. Porém a expressão desse marcador para câncer oral tem poucos estudos. Essa lacuna de conhecimento abre perspectiva para estudo desse marcador (PMS2) como forma de traçar perfis de prognósticos nesse tipo de neoplasia maligna e auxiliar na sua compreensão da patogênese.

3. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O desenho do perfil prognóstico e do planejamento terapêutico de pacientes com câncer de boca, ainda é guiado basicamente pelo estadiamento. Os carcinomas intraorais apresentam um prognóstico ruim e não possuem quaisquer direcionamentos com base em biomarcadores (HEO et al., 2012).

Tendo em vista a importância das proteínas do reparo de DNA da família MMR (complexo MutS (MSH2-MSH6) e MutL(MLH1-PMS2)) na carcinogênese geral e intraoral, e à falta de estudos demonstrando a biomarcação para a proteína PMS2 no câncer de boca, o presente estudo avaliou a influência da proteína PMS2 no prognóstico de pacientes com carcinoma de células escamosas de boca.

O presente estudo estima com esses achados contribuir no delineamento de marcadores prognósticos para o CEC de boca e auxiliar na compreensão da progressão tumoral dessas neoplasias malignas (PANG et al., 2016).

4. HIPÓTESES DE TRABALHO

H0 = A imunexpressão da proteína PMS2 não influencia no prognóstico de pacientes com carcinoma de células escamosas de boca.

H1 = A imunexpressão da proteína PMS2 influencia no prognóstico de pacientes com carcinoma de células escamosas de boca.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo Geral

Avaliar a influência da imunoexpressão da proteína PMS2 no prognóstico de pacientes com carcinoma de células escamosas de boca, diagnosticados e tratados em uma instituição terciária de referência estadual.

5.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar retrospectivamente o perfil clínico-prognóstico de pacientes com carcinoma de células escamosa de boca, diagnosticados e tratados e em uma instituição terciária de referência estadual;
- Caracterizar o perfil de imuno-marcação para a proteína PMS2 em tecido lesional e perilesional e metástases linfonodais de peças cirúrgicas de pacientes com carcinoma de células escamosas de boca;
- Avaliar a influência da imunoexpressão para PMS2 no tecido lesional das peças cirúrgicas desses pacientes em fatores prognósticos, incluindo na sua sobrevida;
- Avaliar a interassociação entre a imunoexpressão das proteínas PMS2 e o marcador de proliferação celular Ki67.

6. MATERIAIS E MÉTODOS

6.1. Delineamento amostral

Baseado no estudo de WAGNER et al. (2016) que observou que pacientes com câncer de boca estágio T1/T2 apresentavam maior imunexpressão para MSH2, uma das proteínas do complexo MMR, em relação aos pacientes T3/T4 ($68,48 \pm 10,99$ versus $61,79 \pm 16,89$, respectivamente) estima-se necessário avaliar 76 casos de câncer de boca oral, a fim de obter uma amostra que represente com 80% de poder e 95% de confiança a hipótese alternativa deste trabalho.

6.2. Tipo de estudo e casuística

Trata-se de um estudo quantitativo, observacional de corte transversal, no qual foram selecionados os dados dos pacientes que se submeteram, no período de 1º de janeiro de 2011 a 31 de dezembro de 2016, à cirurgia de ressecção de carcinomas de células escamosas em região de boca sem tratamentos neoadjuvantes, no Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC), um Centro de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (CACON) no Nordeste Brasileiro.

Foram excluídos pacientes que fizeram quaisquer terapias neoadjuvante, pacientes com prontuários incompletos (<30% das informações sócio demográficas e clínico-prognósticas), que tiveram perda de segmento ou que tiveram material insuficiente no bloco e/ou lâmina das peças cirúrgicas ressecadas.

Dados sócio demográficos, como idade, sexo, grau de instrução, estado civil, profissão, raça/cor, tipo de entrada no hospital (convênio/particular ou SUS) e religião foram levantados. Dados clínico-patológicos, como variante histológica do tumor, localização primária, TNM, estadiamento tumoral, tratamento realizado, dados estes que foram fornecidos através dos prontuários dos pacientes, foram utilizados. A localização dos tumores primários orais foi classificada conforme recomendado pela OMS, pela classificação internacional das doenças CID-0, em lábio, gengiva, terço anterior de língua, palato duro, assoalho de boca e outras partes não identificadas na boca (área retromolar). O TNM do tumor será definido conforme proposição do Instituto Nacional do Câncer INCA que determina TNM, sendo T referente ao tamanho do tumor, N a acometimento linfonodal e M relacionado a metástases a distância (TABELA 1) (BRASIL, 2004).

Tabela 1: Estadiamento dos Tumores em Região de Cabeça e Pescoço

T	N	M
<ul style="list-style-type: none"> • TX: O tumor primário não pode ser avaliado • T0: Não há evidência de tumor primário • Tis: Carcinoma in situ • T1: Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão • T2: Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão • T3: Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão • T4: Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, ou pele da face (queixo ou nariz) 	<ul style="list-style-type: none"> • NX: Os linfonodos regionais não podem ser avaliados • N0: Ausência de metástase em linfonodos regionais • N1: Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão • N2: Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão • N3: Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão. 	<ul style="list-style-type: none"> • MX: A presença de metástase à distância não pode ser avaliada • M0: Ausência de metástase à distância • M1: Metástase à distância

Fonte: BRASIL, 2004

Adicionalmente as lesões foram classificadas conforme os estádios propostos pela mesma entidade em: estágio I; estágio II; estágio III; e estágio IV. O estágio IV englobará os estádios IVA, IVB e IVC (TABELA 2) (BRASIL, 2004).

Também foi calculada a sobrevida global, obtida através da diferença entre a data do início do tratamento (dia, mês e ano) a data do óbito (dia mês e ano) ou final *do follow up* utilizado para fins de análise estatística a quantidade de meses entre essas datas. Da mesma

forma foi calculada a sobrevida livre de doença através da diferença entre a data do início do tratamento (dia, mês e ano) a data da recidiva local ou desfecho do *follow up* (dia, mês e ano).

Tabela 2: Estádio dos Tumores em Região de Cabeça e Pescoço

Estádio	T	N	M
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T1, T2, T3	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Estádio IVA	T1, T2, T3	N2	M0
	T4a	N0, N1, N2	
Estádio IVB	Qualquer T	N3	M0
	T4b	Qualquer N	
Estádio IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: BRASIL, 2004.

Após a seleção da amostra, foram levantadas as lâminas histológicas das biópsias excisionais para revisão e reclassificação da gradação tumoral por um patologista experiente (BRASIL, 2005), sendo classificado em carcinoma de células escamosas bem diferenciado, moderadamente diferenciado ou pobremente diferenciado e foram excluídas lâminas com qualidade ou material considerados insuficientes. Presença de invasão nervosa, linfovascular e de necrose também foram consideradas para análise.

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

Após a revisão de todas as lâminas histológicas, foram selecionadas lâminas que representaram uma área da biópsia excisional com microambiente tumoral adequado, que representaram de maneira satisfatória todo o tumor; além de epitélio escamoso não lesional para ser considerado grupo controle (LIU et al., 2016). Após a seleção das lâminas, seus respectivos blocos (bloco doador) foram levantados para a confecção do bloco de TMA (bloco receptor).

Para técnica de TMA, um dispositivo técnico chamado “*tissue microarrayer*” (Quick-Ray UNITMA®) foi utilizado. Com esse dispositivo punccionou-se um fragmento de

tecido com 2mm de diâmetro, com maior representatividade do bloco doador e transferiu de maneira ordenada para o bloco receptor que apresenta um padrão de matriz precisamente espaçadas.

Assim, cada bloco de TMA foi composto por 35 fragmentos de tecidos, correspondentes ao fragmento guia (vazio) e aos fragmentos do tumor e ao fragmento de epitélio escamoso controle e quando houve, acometimento linfonodal como representado na figura 2.

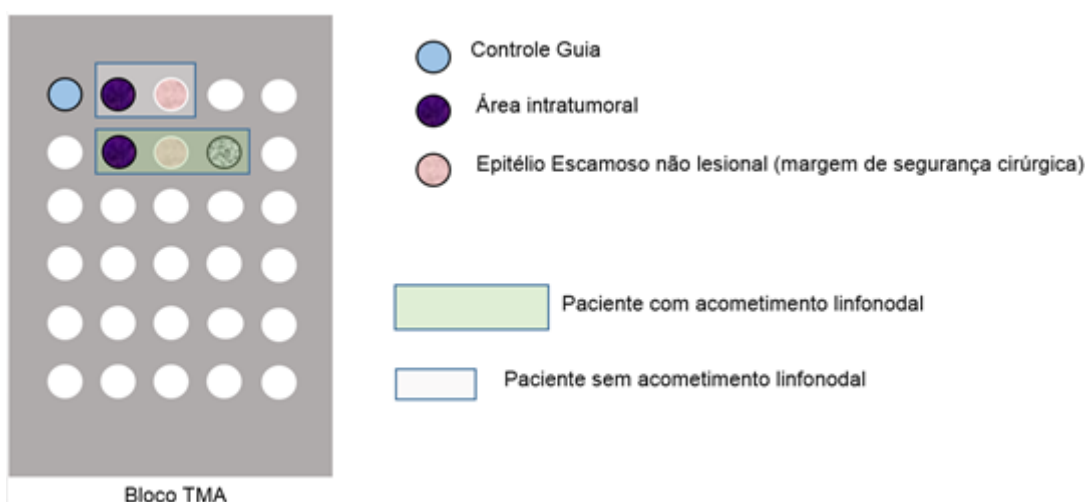


Figura 2: Representação do bloco receptor de TMA.

O bloco receptor foi, então, em uma mesma sessão, submetido a cortes sequenciais de 4 μ m de espessura que foram depositados em lâminas silanizadas de vidro, para realização de coloração convencional por hematoxilina-eosina e para reações de imuno-histoquímica.

Foram feitos sete cortes, quatro para reação de imuno-histoquímica e um para coloração por hematoxilina-eosina e o bloco receptor foi considerado esgotado quando mais de 20% das amostras não estiveram presentes (ANDRANDE et al., 2007).

A reação de imuno-histoquímica foi realizada através da técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase. Após desparafinização e reidratação será realizada recuperação antigênica por meio de solução de citrato pH 6,0 a 97°C durante 45 minutos.

Após resfriamento das lâminas à temperatura ambiente e lavagens com solução tampão de fosfato (PBS) foi realizado bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio 3% diluído em PBS, novas lavagens na solução tampão e incubação *overnight*

com o anticorpo PMS2 de acordo com as diluições determinada por reações em estudo piloto. (QUADRO 1)

Quadro 1. Anticorpo utilizado para imuno-histoquímica.

Anticorpo	Clone	Diluição
PMS2 (abcam)	E51	1:100
Ki67 (abcam)	MIB-2	Pronto para uso

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 min. A revelação foi realizada por meio de incubação com 3,3'-Diamino-benzidina (DAB) (Abcam®) e a contra-coloração com bluing solution. Após coloração e contra-coloração as lâminas foram montadas para avaliação.

Ainda foram feitos controles positivos da reação de imuno-histoquímica por cortes histológicos convencionais, conforme sugerido pelo fabricante e para controle negativo, lâminas de TMA, utilizando a mesma técnica de imuno-histoquímica descrita anteriormente, porém omitindo a etapa de incubação com o anticorpo primário.

6.4. Análise Imuno-histoquímica

Para avaliação microscópica foram fotografados 5 campos por corte histológico em um aumento de 400x através de um microscópio com câmera acoplada (Leica DM 2000®) (ZHANG et al., 2015).

Na avaliação quantitativa, as imagens foram exportadas para o software ImageJ®, e através do comando *cell counter*, para determinação da porcentagem de células tumorais marcadas e não marcadas definindo seu percentual em áreas representativas de tumor e epitélio escamoso perilesional.

6.5. Delineamento estatístico

Os dados foram transcritos em uma planilha base no Microsoft Excel e exportados para o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) versão 20.0 adotando uma confiança de 95%.

O percentual de células imunopositivas para PMS2 e Ki67 foi expresso em forma de média e desvio-padrão e analisados pelo teste Kruskal-Wallis ou Mann-Whitney (dados não paramétricos). Os dados categóricos foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e foram analisados dicotomicamente através do teste do qui-quadrado e para análise de sobrevida além do será utilizado o teste de Long-Rank Mantel-Cox (comparação das curvas de sobrevida de Kaplan-Meier). Adicionalmente, modelo de regressão de Cox foi utilizado para análise multivariada.

6.6. Aspectos Éticos

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa do HHJ/ICC, observando-se as normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde de acordo com a resolução 466/12. Com o número do parecer 2.191.839 (ANEXO 1)

7. RESULTADOS

7.1 Dados clínico-patológicos e sobrevida de 5 anos do câncer de boca

Um total de 76 pacientes foram avaliados nesse estudo, dos quais 66 (86,8%) permaneceram vivos ao longo dos cinco anos de avaliação, totalizando uma sobrevida média de $49,11 \pm 25,13$ meses. A maior parte dos pacientes era do sexo masculino ($n=50$, 65,8%), com até 60 anos de idade ($n=43$, 56,6%) e com tumores localizados em assoalho bucal ($n=35$, 46,1%). Esses fatores clínicos não mostraram associação significativa com a sobrevida em 5 anos e com o tempo médio de sobrevida (TABELA 3).

O estágio T mais prevalente foi o T3/4 ($n=47$, 61,8%), o estágio N mais prevalente foi o N0/1 ($n=50$, 65,8%) e a metástase a distância foi ausente na maioria dos casos ($n=74$, 97,4%). Os casos T3/4 mostraram menor taxa de sobrevida ($n=78,7\%$) e tempo médio de sobrevida ($44,94 \pm 27,47$) que os pacientes T1/2 ($n=29$, 100% e $55,00 \pm 10,77$) ($p=0,011$ e $p=0,032$, respectivamente). Não houve associação significativa entre a sobrevida e a metástase linfonodal ou a distância (TABELA 3).

A maioria dos casos eram de pacientes com estágio III/IV ($n=60$, 78,9%) e com carcinomas moderadamente diferenciados ($n=71$, 93,4%). A abordagem terapêutica mais utilizada foi a cirurgia associada à RT ou a RT e QT ($n=32$, 43,2%). O estadiamento e a gradação histológica não influenciaram significativamente a sobrevida em 5 anos. Porém, os casos tratados apenas com cirurgia apresentaram maior taxa de sobrevida em 5 anos ($n=10$, 100%) que os pacientes tratados com combinações terapêuticas (Cirurgia + RT: $n=30$, 93,8%; Cirurgia + RT + QT: $n=24$, 75,0%) ($p=0,010$) (TABELA 3).

Não houve diferença estatística significativa das características clínico-patológicas para sobrevida em 5 anos dos pacientes estudados. Apenas o estadiamento mostrou associação significativa com a prevalência de óbitos e a taxa de sobrevida.

Tabela 3: Perfil clínico-epidemiológico dos 76 pacientes com câncer de boca diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juçaba (Instituto do Câncer do Ceará) selecionados para avaliação de sua influência na imunexpressão de PMS2 e Ki67.

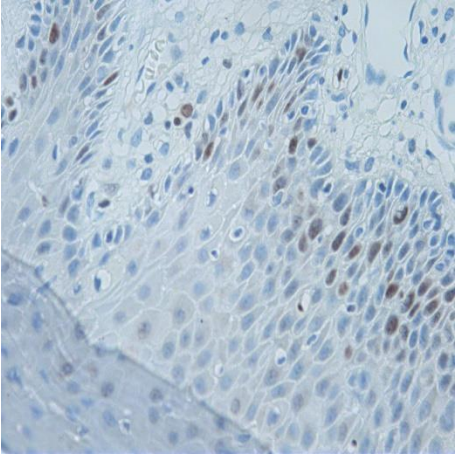
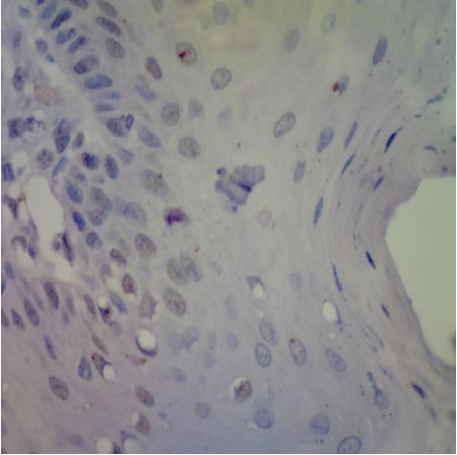
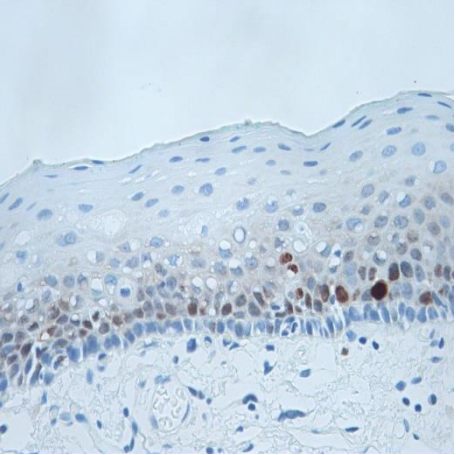
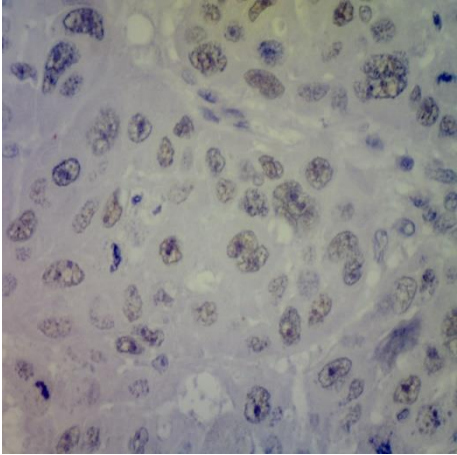
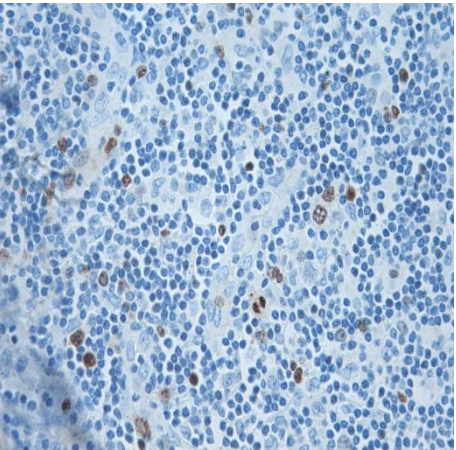
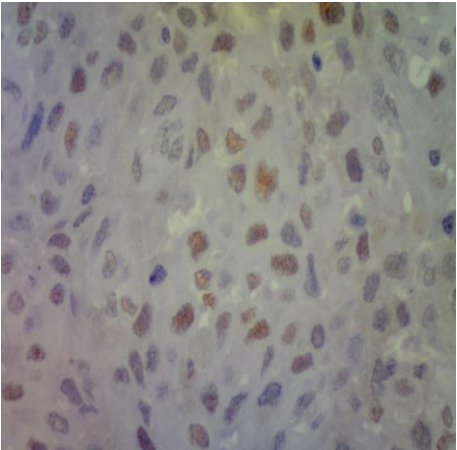
	Amostra		Sobrevida 5		p-valor ^a	Tempo de	
			anos)			sobrevida	
	N	%	n	%		(meses)	p-valor ^b
Status de Sobrevida	76	100,0%	66	86,8%	-	$49,11 \pm 25,13$	-

Sexo							
Masculino	50	65,8	41	82,0%	0,150	39,45±21,37	0,140
Feminino	26	34,2	25	96,2%		55,89±19,76	
Idade							
Até 60 anos	43	56,6	36	83,7%	0,499	42,28±25,33	0,356
Mais de 60 anos	33	43,4	30	90,9%		52,28±23,53	
Localizacao							
Assoalho buccal	35	46,1	28	80,0%	0,182	35,36±18,54	0,291
Língua	26	34,2	25	96,2%		49,00±23,60	
Outros	15	19,7	13	86,7%		52,35±18,80	
T							
T1/2	29	38,2	29	100,0%	0,011	55,00±10,77	0,032
T3/4	47	61,8	37	78,7%		44,94±27,47	
N							
N0/1	50	65,8	46	92,0%	0,065	52,49±25,39	0,151
N2/3	26	34,2	20	76,9%		37,60±21,11	
M							
M0	74	97,4	65	87,8%	0,247	49,60±27,00	0,297
M1	2	2,6	1	50,0%		23,50±14,50	
Estágio clínico							
Estádio 1 e 2	16	21,1	16	100,0%	0,080	52,49±14,37	0,125
Estádio 3 e 4	60	78,9	50	83,3%		46,92±27,85	
Gradação histológica							
MD	71	93,4	62	87,3%	0,516	49,67±26,27	0,641
PD	5	6,6	4	80,0%		23,00±10,00	
Tratamento							
Cirurgia	10	13,5	10	100,0%	0,037	56,10±6,64	0,074
Cirurgia + RT	32	43,2	30	93,8%		55,38±17,66	
Cirurgia + RT + QT	32	43,2	24	75,0%		36,48±23,37	

^aTeste qui-quadrado ou exato de Fisher; Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual; ^bTeste Long-Rank Mantel-Cox; Dados expressos em forma de média e desvio-padrão. BD = bem diferenciado; MD= moderadamente diferenciado; PD = pobremente diferenciado.

7.2. Perfil imuno-histoquímico para marcadores de proliferação celular em diferentes tecidos

Figura 3: Perfil histológico e de imunoexpressão para PMS2 e Ki67 em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca dos pacientes tratados no Hospital Haroldo Juacaba (Instituto do Câncer do Ceará).

	Ki67	PMS2
PERILESÃO		
TUMOR PRIMÁRIO		
METÁSTASE LINFONODAL		

IHC = imuno-histoquímica para PMS2 e Ki67. 400x

Com relação ao perfil de imunexpressão dos marcadores de proliferação celular PMS2 e Ki67, observou-se que $26,1\pm 18,1\%$ das células apresentava marcação PMS2 na perilesão, mostrando-se essa marcação significativamente aumentada tanto nas amostras de tumor, com $59,6\pm 28,6\%$ de células marcadas e nas amostras de linfonodo, com $48,6\pm 27,3\%$ ($p<0,001$), sem diferença estatística entre tumor e linfonodo (TABELA 4).

O marcador de proliferação Ki67 apresentou aproximadamente $1,8\pm 7,7\%$ da marcação das células na perilesão; na amostra de tumor evidenciou aproximadamente $35,1\pm 17,5\%$; e na amostra lifonodal, aproximadamente $32\pm 15,2\%$ ($p<0,001$), sem diferença estatística entre tumor e linfonodo (TABELA 4).

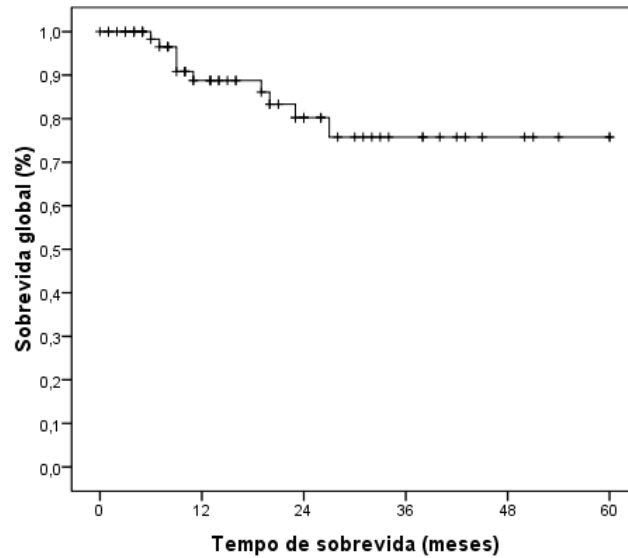
Tabela 4: Perfil de imunexpressão de marcadores de proliferação celular em tumor primário, perilesão e metástase linfonodal de CEC de boca dos pacientes tratados no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará).

	Perilesão	Tumor	Linfonodo	p-Valor
Células com marcação nuclear (%)				
PMS2	$26,1\pm 18,1$	$59,6\pm 28,6^*$	$48,6\pm 27,3^*$	<0,001
Ki67	$1,8\pm 7,7$	$35,1\pm 17,5^*$	$32,0\pm 15,2^*$	<0,001

* $p<0.05$ versus Perilesão; † $p<0.05$ versus Tumor; Teste de Kruskal-Wallis/Dunn (média \pm DP).

Como evidenciado na Tabela 1, dentre os 76 pacientes estudados (100% da amostra), 66 (86,8 % da amostra) permaneceram vivos nos cinco anos de estudo.

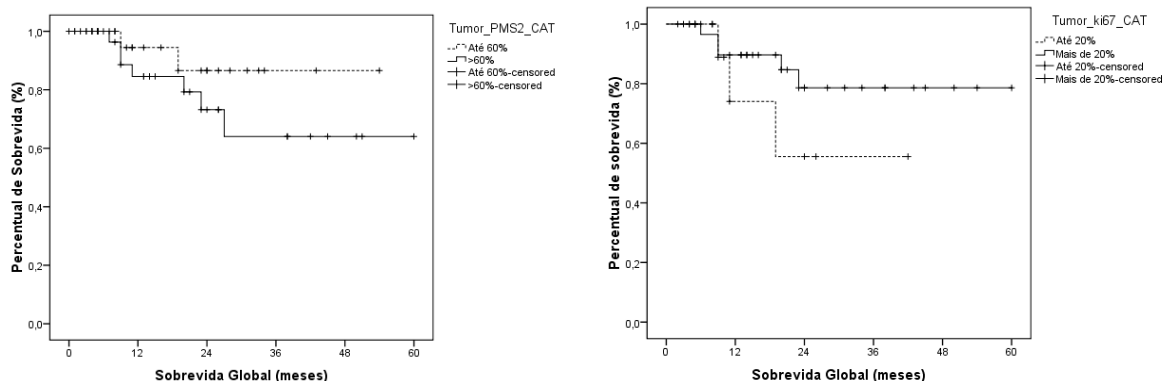
Figura 4: Sobrevida global de pacientes com CEC de boca tratados no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará).



Curva de Kaplan-Meier. **Os pontos de corte para imunoposição para P53 e Ki67 foram, respectivamente, 80% e 35% de marcação nuclear (mediana da imunoposição).

Além disso, o tempo médio de sobrevida global da amostra referida foi de 49 ± 3 meses, sendo 29 ± 6 meses para os pacientes com baixa expressão para Ki67 e 50 ± 4 meses para os pacientes com alta expressão para Ki67 ($p=0,254$) e 49 ± 4 meses para os pacientes com baixa expressão de PMS2 e 44 ± 7 meses para os pacientes com alta expressão de PMS2 ($p=0,223$) (Figura 5).

Figura 5: Sobrevida global por imunoposição de marcadores de proliferação celular em tumor primário pacientes com CEC de boca tratados no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará).



* $p < 0,05$, teste de Long-Rank Mantel-Cox. **Os pontos de corte para imunoposição para PMS2 e Ki67 foram, respectivamente, 60% e 20% de marcação nuclear.

7.3. Influência das características clínico-patológicas na imunexpressão de marcadores de proliferação celular no CEC de boca

Com relação à influência da imunexpressão nuclear para Ki67 e às características clínico-patológicas, observou-se que não há diferença estatística, respectivamente, em relação ao sexo ($p=0,867$), à idade ($p=0,223$), à localização ($p=0,660$), ao estadiamento T ($p=0,946$), N ($p=0,661$), M ($p=0,593$), ao estágio do tumor ($p=0,649$), ao tratamento ($p=0,580$) e à sobrevida ($p=0,874$). Apenas a gradação histológica esteve associada à imunexpressão de Ki67, com os casos pobremente diferenciados com marcação significativamente superior aos casos bem ou moderadamente diferenciados (Tabela 5)

Com relação à influência da imunexpressão nuclear de PMS2 nas características clínico-patológicas, não houve associação com sexo ($p=0,967$), idade ($p=0,275$), estadiamento T ($p=0,349$), M ($p=0,188$), estágio clínico ($p=0,231$), tipo de tratamento ($p=0,629$) e status de sobrevida ($p=0,732$). Os tumores localizados em outras localizações mostraram maior imunexpressão para PMS2 que os tumores localizados em assoalho bucal e língua ($p=0,006$). Os casos com duas três metástases linfonodais mostraram menor imunexpressão que os casos de CEC oral de pacientes com um ou nenhum linfonodo acometido ($p=0,026$). Com relação à gradação histológica as amostras com diferenciação pobremente diferenciadas mostraram maior percentual de células marcadas que os casos bem ou moderadamente diferenciados ($p=0,013$).

Tabela 5: Influência do perfil clínico-epidemiológico dos 76 pacientes com câncer de boca diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará) selecionados na imunexpressão de PMS2 e Ki67.

	Marcador de proliferação tecidual (tumor)			
	PMS2 (%)	p-Valor	Ki67 (%)	p-Valor
Sexo				
Masculino	59,5±28,8	0,967 ^a	35,5±18,0	0,867 ^a
Feminino	60,1±28,9		34,3±16,9	
Idade				
Até 60 anos	56,8±27,7	0,275 ^a	37,0±17,7	0,223 ^a
Mais de 60 anos	64,3±30,0		31,7±17,1	

Localização				
Assoalho bucal	53,1±29,7	0,006^b	33,2±17,1	0,660 ^b
Língua	54,7±22,7		38,6±17,5	
Outros	80,9±27,1*		33,9±19,2	
T				
T1/2	56,3±23,1	0,349 ^a	35,0±18,2	0,946 ^a
T3/4	61,9±31,9		35,1±17,3	
N				
N0/1	66,4±28,0*	0,026^a	34,1±17,1	0,661 ^a
N2/3	48,9±26,7		36,7±18,5	
M				
M0	58,8±28,5	0,188 ^a	35,4±17,7	0,593 ^a
M1	88,0±16,0		26,3±8,4	
Estádio				
Estádio 1 e 2	67,7±24,3	0,231 ^a	37,0±18,0	0,649 ^a
Estádio 3 e 4	57,4±29,1		34,5±17,5	
Gradação histológica				
BD/MD	58,8±29,9	0,013^a	34,0±17,2	0,048^a
PD	73,4±6,9*		59,0±10,2*	
Tratamento				
Cirurgia	67,5±25,8	0,629 ^b	31,8±18,9	0,580 ^b
Cirurgia + RT	60,2±30,5		38,0±15,6	
Cirurgia + RT + QT	56,8±28,8		33,6±19,3	
Sobrevida				
Vivo	59,4±29,0	0,732 ^a	34,7±17,1	0,874 ^a
Morto	61,5±27,4		37,1±21,6	

*p<0,05, ^aTeste Mann-Whitney; ^bTesteKruskal-Wallis; Dados expressos em forma de média e desvio-padrão.

MD = Moderadamente diferenciado; PD = Pobrememente diferenciado.

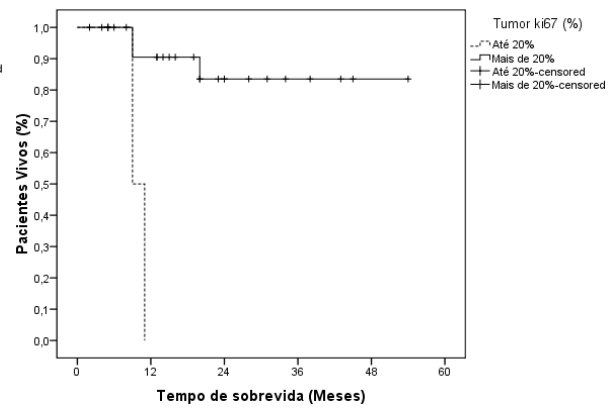
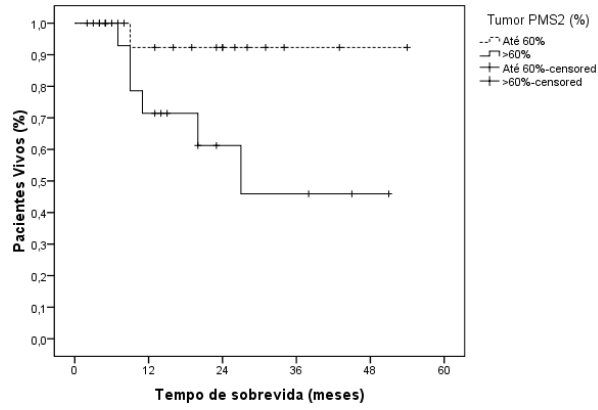
Nos pacientes acima de 60 anos a imunoexpressão para Ki67 ou PMS2 não influenciaram significante a sobrevida global. No entanto, nos pacientes com idade até 60 anos houve associação significante entre baixa sobrevida e alto percentual de células imunopositivas para Ki67 (p=0,001) e PMS2 (p=0,041).

Tabela 6: Influência da imunexpressão para PMS2 e Ki67 na frequência de óbitos em pacientes abaixo e acima de 60 anos de idade diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará)

	Sobrevida 5 anos)		Tempo de sobrevida		
	n	%	p-valor ^a	(meses)	p-valor ^b
Pacientes até 60 anos					
Ki67					
Até 20%	3	60,0%	0,163	10,0±1,0	0,001
>20%	24	88,7%		47,3±3,5	
Pacientes > 60 anos					
Ki67					
Até 20%	8	88,9%	1,000	36,2±5,0	0,665
>20%	8	80,0%		45,1±8,7	
Pacientes até 60 anos					
PMS2					
Até 60%	22	95,6%	0,029	50,4±3,3	0,041
>60%	11	64,7%		32,1±5,6	
Pacientes > 60 anos					
PMS2					
Até 60%	9	90,0%	1,000	26,0±5,0	0,155
>60%	14	93,3%		55,0±4,3	

^aTeste qui-quadrado ou exato de Fisher; Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual; ^bTeste Long-Rank Mantel-Cox; Dados expressos em forma de média e desvio-padrão. BD = bem diferenciado; MD= moderadamente diferenciado; PD = pobremente diferenciado.

Figura 5: Sobrevida global em pacientes com CEC de boca tratados no Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará) com idade inferior a 60 anos por perfil de imunexpressão para ki67 e PMS2.



* $p < 0,05$, teste de Long-Rank Mantel-Cox. **Os pontos de corte para imunexpressão para PMS2 e ki67 foram, respectivamente, 60% e 20% de marcação nuclear.

8. DISCUSSÃO

O conhecimento acerca dos principais mecanismos moleculares do sistema de reparo MMR está em processo de crescimento ao longo dos anos, embora a complexidade de suas vias de sinalização, ainda, permaneça pouco conhecida. O entendimento desses mecanismos, faz-se crucial para maior suporte no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos para doenças relacionadas a essa via de reparo (OLIVEIRA, 2006; LOPES, 2013).

É importante ressaltar que uma mudança significativa no tempo e qualidade da sobrevida dos pacientes portadores de câncer de boca só ocorrerá com o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e que estão relacionadas com a padronização de procedimentos técnicos através da utilização dos marcadores tumorais (BARROS et al., 2005). Os estudos acerca dos fenômenos moleculares que acompanham a carcinogênese e os eventos que caracterizam o comportamento de malignidade de uma neoplasia têm colaborado para os avanços no diagnóstico e prognóstico das lesões (ALVARENGA et al., 2008; BEZERRA DE MOURA et al., 2006).

Nesse estudo foram avaliadas, a imunomarcção da proteína do sistema MMR, a PMS2 e o marcador de proliferação celular o Ki67, onde foram correlacionados sua imunoeexpressão com fatores clínico patológicos significativos e entre si.

Com relação aos dados clínico-patológicos desta pesquisa, a maior parte dos pacientes era do sexo masculino, com até 60 anos de idade, corroborando com os dados de inúmeros estudos nacionais, como o de ANDRADE et al. (2015) e o de CASATTI et al. (2012) onde houve o predomínio de pacientes do sexo masculino, acima de 50 anos de idade, de cor de pele parda/preta, com baixo nível de escolaridade. Outros estudos como FREIRE et al. (2017) demonstraram que a incidência do câncer de boca é significativamente maior entre os homens, corroborando os achados do presente trabalho. Em relação a localização anatômica mais prevalente nesta pesquisa, o assoalho bucal foi a mais significativa, semelhante ao observado por TEIXEIRA et al. (2009). Assim, nossa amostra mostra-se similar ao clinicamente observado na maioria dos trabalhos sobre câncer de boca.

São utilizados vários critérios morfológicos para descrever a agressividade de um tumor, dentre estes, o tipo histológico, o grau do pleomorfismo celular, a resposta inflamatória, o número de mitoses e o comprometimento de vasos sanguíneos e linfáticos (BEZERRA DE MOURA et al., 2006). O estágio T mais prevalente foi o T3/4, o estágio N mais prevalente foi o N0/1 e a metástase a distância foi ausente na maioria dos casos. Os

casos T3/4 mostraram menor taxa de sobrevida e menor tempo médio de sobrevida que os pacientes T1/2. Esses resultados validam estudos como o de HESSEL et al. (2010) no qual a sobrevida global em 5 anos para o carcinoma de células escamosas de boca foi de 68,6%, com melhor prognóstico nos estágios T1/2 e N0/1.

A abordagem terapêutica mais utilizada foi a cirurgia associada à RT ou a RT e QT. Porém, os casos tratados apenas com cirurgia apresentaram maior taxa de sobrevida em 5 anos. Esse resultado se deve à relação entre os estadiamentos e ao tratamento das lesões iniciais em estágio I que têm como tratamento eletivo as cirurgias que proporcionam resultados satisfatórios e localizados (JOGAIB, 2006; BRENER, 2007). AMAR et al. (2003) mostrou que embora o tratamento combinado seja preconizado para a doença em estágio avançado, os resultados estão aquém do que seria esperado pela somatória de seus resultados individuais, com alguns pacientes não tendo benefícios com abordagens terapêuticas associadas dado o avanço da doença.

Com relação à influência da imunexpressão nuclear para Ki67 e às características clínico-patológicas, observou-se que apenas a gradação histológica esteve associada à imunexpressão de Ki67, com os casos pobremente diferenciados com marcação significativamente superior aos casos bem ou moderadamente diferenciados. Esses achados corroboram os estudos de JING et al. (2018), no qual a imunexpressão da Ki67 em células tumorais, fibroblastos e em frentes invasivas demonstrou a correlação existente entre padrões distintos de gradações histológicas em diferentes compartimentos e tipos celulares, trazendo a imunexpressão positiva aumentada da Ki67 como um indicador prognóstico potencial para o carcinoma de células escamosas orais. MOTTA et al. (2009) e TAGHAVI & YAZDI (2015), por sua vez, trazem fortes evidências que a presença parâmetros histológicos e a presença de marcadores moleculares, dentre eles o marcador Ki67 configuram uma situação de maior risco e pior prognóstico ao esse tipo de carcinoma escamoso.

Com relação à influência da imunexpressão nuclear de PMS2 nas características clínico-patológicas, não houve associação com sexo, idade, estadiamento clínico, tipo de tratamento e status de sobrevida, estando de acordo com o estudo de KELEMEN et al. (2017), onde não houve correlação estatística entre deficiência da proteína PMS2 e sobrevida em pacientes com câncer de endométrio. Os tumores localizados em outras localizações mostraram maior imunexpressão para PMS2 que os tumores localizados em assoalho bucal e língua. Estudo recentes de CARTA et al. (2018), identificam os efeitos do tabagismo crônico na mucosa oral levaram à metilação de inúmeros genes, inclusive do PMS2, trazendo evidências de que o tabagismo causa metilação e reduz a expressão de genes de reparo.

Interessantemente, nos pacientes com idade inferior a 60 anos, a alta imunoeexpressão para PMS2 foi associado a um pior prognóstico. As mutações germinativas do gene no PMS2, enfatizam a predisposição para o aparecimento de câncer do colo retal em pacientes com idade inferior a 50 anos (PETLOMAKI, 2005). O gene PMS2, também tem um papel no processo de apoptose o que enfatiza sua importância como um gene de susceptibilidade ao câncer (ARNOLD et al., 2005; PETLOMAKI, 2005) e em quase 70% dos casos da síndrome de Lynch familiar, uma mutação germinativa em um dos quatro genes de reparo do DNA, MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, pode ser identificada, com uma maior predileção para o gene PMS2 (NIESSEN et al., 2009).

O aumento de sua expressão nos tumores pobremente diferenciados sugere super ativação dessa proteína frente a tumores mais agressivos. O que não pode ser identificado histologicamente pôde ser sugerido imuno-histoquimicamente. Apesar de a redução da imunoeexpressão de MLH1 ser observada na transição de epitélios orais normais para leucoplasias e carcinomas de células escamosas (HUI, BUZA & ZIAI, 2016), a baixa expressão de MSH2 ser associada a pobre prognóstico de tumores de boca (PEREIRA et al., 2013) e que o estadiamento clínico é inversamente correlacionado com a expressão de MSH6 no carcinoma de células escamosas oral (WAGNER et al., 2016) é provável que o estado de inativação dessas proteínas ou a possibilidade de mutação dos genes responsáveis por sua transcrição possam influenciar no prognóstico desses tumores.

Diversos cânceres em idade jovem estão associados a mutações, mesmo que esporádicas, sendo as proteínas do complexo MMR importantes nesse processo. Parece que o câncer de boca, apesar de seus fatores etiológicos serem de origem exógena, sofre influência dessa via. No entanto, novos estudos se fazem necessários a fim de avaliar a susceptibilidade dos tumores de cabeça e pescoço em pacientes com predisposição genética ou alterações significativas na via MMR.

9. CONCLUSÃO

Com base nos resultados desta pesquisa, pode-se ressaltar que o perfil de imunexpressão para PMS2 foi diretamente relacionado com tumores pobremente diferenciados, mostrou maior expressão em sítios anatômicos incomuns e influenciou significativamente o prognóstico de pacientes abaixo de 60 anos de idade em uma amostra que corrobora o perfil clínico-patológico convencional dos carcinomas de boca.

REFERÊNCIAS

ALVARENGA, L. M.; RUIZ, M. T.; PAVARINO-BERTELLI, E. C.; RUBACK, M. J. C.; MANIGLIA, J. V.; GOLONI-BERTOLLO, E. M. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*, v. 74, n. 1, p. 68-73, 2008.

AMAR, L. et al. Qualidade de vida e prognóstico nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia*. v.68, n. 3, p. 400-403, 2003.

ANDRADE, V.P. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissuemicroarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. São Paulo, v. 43, n. 1, p. 55-60, fevereiro, 2007.

ANDRADE, J.O.M.; SANTOS, C.A.S.T.; OLIVEIRA, M.C. Fatores associados ao câncer de boca: um estudo de caso-controle em uma população do Nordeste do Brasil. *Rev. bras. epidemiol.* 18 (04) Out-Dec,2015.

BALABAN R, NEMOTO, S; FINKEL, T. Review mitochondria, oxidants, and aging cell; 120:483-495, 2005.

BARROS, Rosana M. G; MAGALHÃES, Albino V; SCHMIT, F. C. Câncer de boca: expressão imuno-histoquímica de c-erbB-2, Bcl-2 E EGFR – Estudo comparativo com leucoplasia e hiperplasia inflamatória. *Revista Odonto Ciência – Fac. Odonto/PUCRS*, v. 20, n. 50, out./dez. 2005

BASCONES A.B. et al. Epidemiological study of oral cancer patients in Alava province, Spain. *Experimental and Therapeutic Medicine*. Spain, v.2, n. 5 p. 937-940, 2011.

BEGGS, A.D. et al. A study of genomic instability in early preneoplastic colonic lesions. *Oncogenesis*. v.32, n. 46, p. 5333-5337, 2013.

BEZERRA DE MOURA, S. A; CATÃO, M. A; GERBY, M; BELTRÃO, R. V; OLIVEIRA DE SALES, M. A; COSTA, L. J. Marcadores biológicos no câncer de boca.; Costa, LJ. *International Journal of Dentistry*, Recife, 1 (2): 58-62, abril/junho 2006.

BOMBECCARI, G. P. et al. Oral lichen planus and malignant transformation: a longitudinal cohort study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod*, v. 112, p. 328-334, 2011.

BRASIL, Câncer, IN, Silva, JAG. Estimativa 2018-2019, Incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Inca, 2018.

BRASIL, Ministério da Saúde; Instituto Nacional de câncer (INCA). TNM: Classificação de tumores malignos. 6ª ed., Rio de Janeiro, Inca, 250 p. 2004.

BRASIL. CID-0: Classificação Internacional de Doenças para Oncologia, 3ª ed, São Paulo, Edusp, 427, 2005.

- BRENER, Sylvie.; JEUNON, Franca Arenare; BARBOSA, Alvimar Afonso; GRANDINETTI, Helenice de Andrade Marigo. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. 53(1): 63-69, 2007.
- BUZA, N; ZIAI, J, HUI, P. Mismatch repair deficiency testing in clinical practice. *Expert Rev Mol Diagn.* 16(5): 591-604. Mar 2016.
- CARTA, C.F.L.; OLIVEIRA ALVES, M.G.; BARROS, P. P. de; CAMPOS, M. S; SCHOLZ, J.; JORGE, A. O. C.; NUNES, D. F.; ALMEIDA, J. D. Triagem da metilação de genes de reparo de DNA na mucosa bucal de fumantes crônicos. *Arch Oral. Biol.* ago; 92: 83-87, 2018.
- CAPELOZZI, V. L. Entendendo o papel de marcadores biológicos no câncer de pulmão. *J Pneumologia*, nov./dez 2001; 27(6):321-328.
- CASATI, M. F.T.; VASCONCELOS, J. A.; VERGNHANINI, G. S.; CONTREIRO, P. F.; GRAÇA, T. B. da; KANDA, J. L.; AKERMAN, M.; MATOS, L. L. de. Epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço no Brasil: estudo transversal de base populacional. *Rev. Bras. Cir. Cabeça Pescoço*, v.41, nº 4, p. 186-191 2012
- 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*, 2005; v.60, p.293-298, 2005.
- EDELBROCK, M. A. et al, Structural, molecular and cellular functions of MSH2 and MSH6 during DNA mismatch repair, damage signaling and other noncanonical activities, *Mutat. Res.* mar-abr; 743-744: 2013;
- GIARNIERI, E. R. et al. Msh2, Mlh1, Fhit, p53, Bcl-2, and Bax Expression in Invasive and in Situ Squamous Cell Carcinoma of the Uterine Cervix. *Molecular Oncology, Markers, Clinical Correlates.* v.6, n.9, p. 3600-3606, 2000.
- HEO, K. et al. Hypoxia-induced up-regulation of apelin is associated with a poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncology*, v. 48, n. 6, p. 500-6, Jun 2012.
- HESSEL, A. C.; MORENO, M. A.; HANNA, E. Y.; ROBERTS, D. B.; LEWIN, J. S.; EL-NAGGAR, A. K. Compliance with quality assurance measures in patients treated for early oral tongue cancer. *Cancer* 2010; 15:3408-16
- HUI, P.; BUZA, N.; ZIAI, J. Mismatch Repair Deficiency Testing in Clinical Practice, Taylor & Francis, doi:10.1586/14737159.2016.1156533, 2016.
- 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.
- JENSEN, N. M.; DARLSGAARD, T.; JAKOBSEN, M.; NIELSEN, R. R.; SØRENSEN, C. B.; BLUND, L.; JENSEN, T. An update on targeted gene repair in mammalian cells: methods and mechanisms. *Journal of Biomedical Science*, v. 18, n. 10, p. 1-14, 2011.

JEON, et al., Dynamic control of strand excision during human DNA mismatch repair, PNAS, vol. 113, no. 12, 3281–3286, 2016.

JING, Y.; YANG, Y.; HAO, F.; SONG, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, Y.; NI, Y. Higher Ki67 expression in fibroblast like cells at invasive front indicates better clinical outcomes in oral squamous cell carcinoma patients. Bioscience Reports, 2018.

JOGAIB, J C; et al. Carcinoma de células escamosas oral. Caderno UNFO, Volta Redonda. 2006.

KELEMEN, L. E.; RAMBAU, P. F.; KOZIAK, J. M.; STEED, H.; KÖBEL, M. Carcinomas síncrono endometrial e ovariano: preditores de risco e associações com perfis de sobrevivência e expressão tumoral. maio; 28 (5): 447-457, 2017

LAMBERT, R.; SAUVAGET, C.; CANCELA, M. C.; SANKARANARAYANAN, R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. European Journal of Gastroenterology & Hepatology. V. 23, n. 8, 2011.

LANCET, G.B.D. Risk Factors Collaborators. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990-2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study. Oct; 388, 2015.

LEWIS JR, J.S.; THORSTAD, W. L.; CHERNOCK, R.D.; HAUGHEY, M. B.; YIP, J.H. QUIN ZHANG, M. S.; MOFTY, S. K. E.; p16 Positive Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: An Entity With a Favorable Prognosis Regardless of Tumor HPV Status. Am J Surg Pathol. Aug; 34(8),2010.

LIN, W.W.; KARIN, M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. The Journal of Clinical Investigation, v.117, n.5, p. 1175-1183, 2007.

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

LIU, L., YANG, X., Implication of Reprimo and hMLH1 gene methylation in early diagnosis of gastric carcinoma, Int J Clin Exp Pathol 2015;8(11):14977-14982, 2015.

LODI, G. et al. Current controversies in oral lichen planus: Report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral RadiolEndod. v. 100, p. 164-78, 2005.

LOPES, A.; CHAMMAS, R.; IYEYASU, HIROFUME. Oncologia para Graduação. 3ª ed, Lemar, 2013.

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.

MEYER-HOFFERT, U; WIEDOW, O. Neutrophil serine proteases: mediators of innate immune responses. Current Opinion in Hematology, v. 18, n.1, p. 19-24, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BRASIL). Instituto Nacional de Câncer José Allencar Gomes da Silva. Estimativa 2018: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro; 2018.

MOTTA, R. R.; ZETTLER, C. G.; CAMBRUZZI, E.; JOTZ, G. P.; BERNI, R. B. Ki - 67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. *Braz J Otorhinolaryngol.*, ;75:544-9. 2009.

NIESSEN, R. C.; KLEIBEUKER, J. H.; WESTERS, H.; JAGER, P. O.; ROZEVELD, D.; BOS K, K. PMS2 involvement in patients suspected of Lynch syndrome. *Genes Chromosomes Cancer*; 48(4):322-329, 2009.

OLIVEIRA, L. R.; SILVA, A. R.; ZUCOLOTO, S. Perfil da incidência e da sobrevida de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 42, n. 5, p. 385-392, 2006.

PANG, P. et al. A comparison of mandible preservation method and mandibulotomy approach in oral and oropharyngeal cancer: A meta-analysis. *Oral Oncology*. v.63, p. 52-60, 2016.

PATEL, T. N.; ROY, S.; RAVI, R. Gastric cancer and related epigenetic alterations. *E cancer medical science*. n. 11, p. 714, 2017.

PEREIRA, C. S. et al. Low expression of MSH2 DNA repair protein is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinoma. *Journal of Applied Oral Science*. v.21, n.5, p.416-421, 2013.

PETERSEN, P. E. Oral cancer prevention and control – The approach of the World Health Organization. *Oral Oncology*. v. 45, p. 454-460, 2008.

PETLOMAKI, P. Lynch syndrome genes. *Fam Cancer*. ;4(3):227-32 2005;

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.

ROBERTSON, A. B. et al. Base excision repair: The long and short of it. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 66, n. 6, p. 981–993, 2009

SCULLY, C. Oral cancer; evidence for sexual transmission. *British Dental of Journal*, v.199, n.4, p.203-207, Aug. 2005.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncology*, v. 45, p. 301-308, 2009.

SILGLEY, J. et al. Diffusion and Binding of Mismatch Repair Protein, MSH2, in Breast Cancer Cells at Different Stages of Neoplastic Transformation. *PlosOne*. v. 12, n. 1, 2017.

SOUSA, A. R.; HENNEMANNKOURY, G. V.; BADARANNE, E. B. L.; CAVALCANTE, H.A.; FONTELLAS, C.N. Clinico-epidemiological profile of patients with head and neck cancer in a reference hospital. *Rev Soc Bras Clin Med.* jul-set;14(3):122-8 11, 2016.

SOUZA, L; et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: Epidemiological study and clinicopathological associations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 16, n. 6, p. 757-62, 2011.

SUTER, C. M.; MARTIN, D. I. K.; WARD, R. L. Germline epimutation of MLH1 in individuals with M multiple cancers, *Nature genetics*, 2004.

TAGHAVI, N.; YAZDI, I. Prognostic Factors of Survival Rate in Oral Squamous Cell Carcinoma: Clinical, Histologic, Genetic and Molecular Concepts. *Archives Of Iranian Medicine*, v. 18, n. 5, p. 314 - 319, maio, 2015.

WAGNER, V. P. et al. Overexpression of MutS α Complex Proteins Predicts Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Medicine*. v.95, n.22, 2016.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*, v. 45, p. 309-316, 2009.

WOJCIECHOWICZ, K. et al. Temozolomide increases the number of mismatch repair-deficient intestinal crypts and accelerates tumorigenesis in a mouse model of Lynch syndrome. *Gastroenterology*. v.147, n. 5, p. 1064-1072, 2014.

WONG, Y.K et al. Socio-demographic factors in the prognosis of oral cancer patients. *Oral Oncology*, v.42, n.9, p.893-906, 2002.

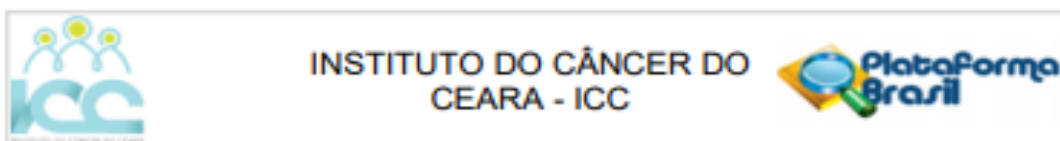
WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Pathology & Genetics Head and Neck Tumours*. Geneva, International Agency for Research on Cancer, 4^a ed, p 165, 2005.

YOO, K.H. et al. Deficiency of MSH2 expression is associated with clear cell renal cell carcinoma. *Oncology Letters*. v.8, n.5, p.2135-2139, 2014.

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.

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.

ANEXO


PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Influência da imuno-expressão de proteínas de reparo do DNA no prognóstico e sobrevida de pacientes com câncer de boca e de orofaringe

Pesquisador: Paulo Goberlânio de Barros Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 70596317.6.0000.5528

Instituição Proponente: Instituto do Cancer do Ceara

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.191.839

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo quantitativo, observacional de corte transversal, no qual serão selecionados os dados de 100 pacientes que se submeteram, no período de 01 de janeiro de 2008 a 31 de dezembro de 2014, à cirurgia de ressecção de carcinomas de células escamosas em região de boca e orofaringe sem tratamentos neoadjuvantes, no Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará (HHJ/ICC),

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a influência da imuno-expressão das proteínas do reparo de DNA (imuno-marcação para MSH2,MSH6, MLH1, PMS2, PCNA e RFC) , bem como p16 e Ki67 no prognóstico e sobrevida de pacientes com carcinoma de células escamosas de boca e orofaringe diagnosticados e tratados em uma instituição terciária de referência estadual

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Há benefícios com o conhecimento científico adquirido, haja visto que o prognóstico do câncer de boca e de orofaringe são significativamente distintos o que se deve provavelmente aos seus diferentes comportamentos biológicos.Os riscos são os pertinentes ao manuseio de prontuários e informações que devem ser resguardadas.

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222
Bairro: RODOLFO TEÓFILO **CEP:** 60.430-230
UF: CE **Município:** FORTALEZA
Telefone: (85)3288-4653 **Fax:** (85)3228-4653 **E-mail:** eco@icc.org.br



INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 2.191.829

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos presentes e adequados

Recomendações:

Adequar no texto divergências quando referido pacientes diagnosticados e tratados no HHJ, sendo um critério de exclusão a presença de neoadjuvância

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem comentários.

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado aprova o Projeto de Pesquisa, mas com a recomendação de Adequar no texto divergências quando referido pacientes diagnosticados e tratados no HHJ, sendo um critério de exclusão a presença de neoadjuvância

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_920771.pdf	01/07/2017 21:40:26		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCompleto.pdf	01/07/2017 21:39:26	Paulo Goberlânio de Barros Silva	Aceito
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tecepositario.pdf	01/07/2017 21:36:40	Paulo Goberlânio de Barros Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	parecer.pdf	01/07/2017 21:35:15	Paulo Goberlânio de Barros Silva	Aceito
Folha de Rosto	folharosto.pdf	01/07/2017 21:34:00	Paulo Goberlânio de Barros Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Endereço: PARI JÚNIOR, 1222 CEP: 60.430-200
 Bairro: RODOLFO TEÓFILO
 UF: CE Município: FORTALEZA
 Telefone: (85)3228-4653 Fax: (85)3228-4653 E-mail: ece@icc.org.br



INSTITUTO DO CÂNCER DO
CEARA - ICC



Continuação do Parecer: 2.191.839

Não

FORTALEZA, 28 de Julho de 2017

Assinado por:
Marcelo Gurgel Carlos da Silva
(Coordenador)

Endereço: PAPI JÚNIOR, 1222
Bairro: RODOLFO TEÓFILO CEP: 60.430-230
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (85)3288-4853 Fax: (85)3228-4853 E-mail: cco@icc.org.br