



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM – FFOE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA - PPGO

OSIAS VIEIRA DE OLIVEIRA FILHO

INFLUÊNCIA DA IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO SISTEMA
***MISMATCH REPAIR* NA PROGRESSÃO TUMORAL E NO PROGNÓSTICO DE**
PACIENTES COM CÂNCER DE OROFARINGE

FORTALEZA

2021

OSIAS VIEIRA E OLIVEIRA FILHO

**INFLUÊNCIA DA IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO SISTEMA
MISMATCH REPAIR NA PROGRESSÃO TUMORAL E NO PROGNÓSTICO DE
PACIENTES COM CÂNCER DE OROFARINGE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica
Área Temática: Estomatopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa.

FORTALEZA

2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- O48i Oliveira Filho, Osias Vieira de.
Influência da imunexpressão das proteínas do sistema mismatch repair na progressão tumoral e no prognóstico de pacientes com câncer de orofaringe / Osias Vieira de Oliveira Filho. – 2021.
60 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, 1, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa.
1. Neoplasias Orofaríngeas. 2. Proteína MutS de Ligação de DNA com Erro de Pareamento. 3. Proteínas MutL. 4. Análise de Sobrevida. I. Título.

CDD

OSIAS VIEIRA DE OLIVEIRA FILHO

**INFLUÊNCIA DA IMUNOEXPRESSION DAS PROTEÍNAS DO SISTEMA
MISMATCH REPAIR NA PROGRESSÃO TUMORAL E NO PROGNÓSTICO DE
PACIENTES COM CÂNCER DE OROFARINGE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica
Área Temática: Estomatopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa

Aprovada em: 12/02/2021

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Fabrício Bitu Sousa (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Ana Paula Negreiros Nunes Alves
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Profa. Dra. Isabelle Joyce de Lima Silva-Fernandes
Instituto do Câncer do Ceará (ICC)

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, **Joana e Osias**, por terem feito de tudo para me dar a melhor educação possível, sempre me colocando em primeiro lugar, acima, até mesmo, deles. Devo tudo a vocês, todo amor e gratidão. São meus maiores exemplos e companheiros nessa conquista.

Ao Prof. Dr. **Fabricio Bitu Sousa** pela orientação, compreensão, conselhos e as diversas oportunidades que me proporcionou.

Aos professores **Mario Rogério Lima Mota, Ana Paula Negreiros Nunes Alves e Karuza Maria Alves Pereira** que muito me inspiram diariamente.

Aos meus grandes amigos e companheiros diários **Thinali Sousa Dantas e Paulo Goberlânio de Barros Silva** por toda a parceria, e apoio ora acadêmico ora emocional. Com vocês aprendi coisas que jamais imaginaria conseguir entender. Agradeço também pelos diversos momentos de descontração que me ajudaram a seguir caminhando mesmo nos dias mais difíceis.

Aos colegas de turma **Dayrine de Paula, Cássia Nóbrega e Guilherme Soares** pela ajuda, companheirismo e suporte durante essa jornada.

Aos meus sempre amigos **Alice Dote, Alysso Lemos, Anne Freire, Celina Queiroz, Cibelle Gomes, Davi de Melo, Fabricio Fidalgo, Gabriela Soares, Ítalo Roesel, Lucas Aragão, Mariana Banhos, Marissa Pimenta, Mario Lisboa, Mateus Plutarco, Matheus Vieira, Rafaela Oliveira, Saullo Leitão e Sabrina Maia** por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, dos mais gloriosos aos mais difíceis. Em especial aos queridos **Alice Dote e Matheus Vieira** por me acompanharem nesse desafio acadêmico que é o mestrado, sou grato por todo o auxílio, paciência e positividade durante todo este processo.

A todos os colegas de pós-graduação por fazerem parte dessa história. E aos demais amigos que fiz na faculdade.

Ao **Hospital Haroldo Juaçaba** em nome da **Dra Isabelle Joyce de Lima Silva-Fernandes** por abrirem suas portas para mim e possibilitarem o conhecimento de um mundo infinito de possibilidades, experiências e ensinamentos.

Ao **Programa de Pós Graduação em Odontologia** e aos funcionários da coordenação pela disposição e suporte durante esse período.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de auxílio financeiro

*“Pesquisa para constatar, constatando,
intervenho, intervindo educo e me educo.
Pesquisa para conhecer o que ainda não
conheço e anunciar a novidade.”*

Paulo Freire

RESUMO

O carcinoma de células escamosas em orofaringe (CCEO) está em amplo crescimento no mundo, mesmo havendo diminuição da exposição aos fatores de risco clássicos, assumindo um caráter epidêmico e sendo classificado como o câncer mais comum entre todos relacionados ao papilomavírus humano. Enquanto os fatores de risco são extensamente explorados na literatura, existem múltiplas questões quanto à progressão dessas lesões que permanecem sem respostas ou pobremente exploradas. Nesse contexto, as vias de reparo do DNA têm surgido como uma alternativa para responder a esses questionamentos, com a associação da disfunção da via de reparo de DNA do tipo *mismatch repair* (MMR) ao desenvolvimento de cânceres sendo amplamente relatada em diversos estudos abordando diferentes malignidades. Logo, o presente estudo teve como objetivo investigar a influência das proteínas do sistema MMR na progressão e no prognóstico de pacientes com carcinomas de células escamosas em orofaringe tratados em uma instituição terciária de referência nacional. Para isto, foram levantados dados sociodemográficos e clínico-patológicos de 50 pacientes tratados no Hospital Haroldo Juaçaba/Instituto do Câncer do Ceará. Os blocos parafinados oriundos de biópsias excisionais foram submetidos à seleção de áreas representativas provenientes da frente de invasão tumoral, de metástases linfonodais e de margens cirúrgicas que não apresentassem alterações histológicas, sendo selecionados três núcleos de 2,5 mm por amostra para a confecção de um bloco único através da técnica *Tissue Micro Array* (TMA). Os blocos de TMA foram, então, submetidos a reações de imunohistoquímica para MSH2, MSH6, PMS2, MLH1, Ki67, caspase-3 e p16. As imunomarcações das proteínas foram avaliadas por percentual de células marcadas e associadas aos dados clínico-patológicos por meio dos testes de Mann-Whitney e de Kruskal-Wallis/Dunn. Esses dados, por sua vez, foram correlacionados entre si por meio da Correlação de Spearman. Para análise de sobrevida, foi utilizado o teste de Long-Rank Mantel-Cox e modelo de regressão de Cox. Todas as análises foram realizadas utilizando o software estatístico SPSS versão 20.0 ($p < 0,05$). MSH6 e caspase-3 mostraram alta expressão em tumores primários (p16+ e p16-) e em metástases linfonodais (p16 + e p16-), e altos níveis de MSH2 foram encontrados nas metástases linfonodais (p16 + e p16-). Um desequilíbrio na relação MSH2/MSH6 também foi observado. A expressão de PMS2 e caspase-3 foi associada à baixa sobrevida nos CCEO p16- e. Na análise multivariada, MSH2, MSH6 e MLH1 tiveram o pior impacto prognóstico nos tumores p16+. Este estudo retrospectivo lançou luz sobre o papel das proteínas MMR na progressão e no prognóstico do câncer CCEO, sendo o primeiro

a apresentar a caracterização da imunomarcagem dessas proteínas nesses tumores. Concluiu-se que a superexpressão de MSH2, MSH6 e de MLH1 está associada ao aumento da instabilidade de DNA, causada pela proliferação celular. Nesse sentido, as proteínas MSH2, MSH6 e MLH1 podem constituir um marcador prognóstico em pacientes com CCEO p16+.

Palavras-chave: Neoplasias Orofaringeas, Proteína MutS de Ligação de DNA com Erro de Pareamento, Proteínas MutL, Análise de Sobrevida.

ABSTRACT

Cases of oropharyngeal squamous cell carcinoma are on the rise and the disease now ranks as the most common human papillomavirus-related cancer. Although risk factors have been extensively discussed in the literature, the role of the DNA mismatch repair system remains unanswered. In this context, DNA repair pathways have emerged as an alternative to answer these questions, with the association between dysfunction of the mismatch repair (MMR) DNA repair pathway and the development of cancers being widely reported in several studies addressing different tumors. This study aimed to evaluate the impact of the DNA mismatch repair (MMR) protein immunostaining on the tumor progression and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma (OPSCC). This retrospective observational study comprised 50 cases of OPSCC. Immunohistochemistry for MSH2, MSH6, PMS2, MLH1, Ki67, p16 and caspase-3 was performed. The expression of these proteins was assessed in surgical resection margins, primary tumor (PT), and lymph node metastasis (LNM) of p16+ and p16- OPSCC. Clinical-pathological involvement in immunostaining was evaluated with Kruskal-Wallis/Dunn or Mann-Whitney test, Wilcoxon test and Spearman's correlation. Overall survival (OS) was analyzed with Log-Rank Mantel-Cox and Cox regression. MSH6 and caspase-3 showed high expression in PT (p16+ and p16-) and in LNM (p16+ and p16-), and high levels of MSH2 were found in LNM (p16+ and p16-). An imbalance in MutS α also was observed. PMS2 and caspase-3 expression was associated with poor survival in p16- OPSCC and, in multivariate analysis, MSH2, MSH6 and MLH1 had the poorest prognostic impact in p16+ OPSCC. This retrospective study shed light on the role of MMR proteins in OPSCC cancer progression and prognosis. We evidenced that the overexpression of these proteins is associated with increased DNA mismatch caused by cell proliferation. Thus, MSH2, MSH6 and MLH1 proteins may constitute a protein marker for poor prognosis in patients with p16+ OPSCC.

Keywords: Oropharyngeal Neoplasms, DNA Mismatch Repair, MutS Proteins, MutL Proteins, Survival Analysis.

LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CAPES	<i>Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel</i>
CCE	<i>Carcinomas de células escamosas</i>
CCEO	<i>Carcinoma de células escamosas em orofaringe</i>
EXO1	<i>Exonuclease 1</i>
HNSCC	<i>Head and neck squamous cell carcinoma</i>
HPV	<i>Papilomavírus Humano / Human papillomavirus</i>
IHC	<i>Immunohistochemistry</i>
LNM	<i>Lymph node metastasis</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MSI	<i>Instabilidade de microssatélites / Microsatellite instability</i>
OSCC	<i>Oral squamous cell carcinoma</i>
OPSCC	<i>Oropharyngeal squamous cell carcinoma</i>
OS	<i>Overall survival</i>
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PT	<i>Primary tumor</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
SRM	<i>Surgical resection margin</i>
TMA	<i>Tissue Micro Array</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
	1.1 Carcinoma de células escamosas de orofaringe	12
	1.2 Sistema de reparo do DNA: via DNA <i>mismatch repair</i>	13
2	PROPOSIÇÃO GERAL	17
	2.1. Objetivos específicos	17
3	CAPÍTULOS	18
	3.1. Mismatch repair proteins in oropharyngeal squamous cell carcinoma: a retrospective observational study	18
4	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXOS	57