



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

YAMYLE CLAUDIA VELASQUEZ BARRAGAN

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE REPARO DO DNA
MISMATCH REPAIR (MMR) NA CARCINOGENESE DO VERMELHÃO DO
LÁBIO**

FORTALEZA

2021

YAMYLE CLAUDIA VELASQUEZ BARRAGAN

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE REPARO
DO DNA MISMATCH REPAIR (MMR) NA CARCINOGENESE DO
VERMELHÃO DO LÁBIO**

Dissertação de mestrado submetida à
Coordenação do Programa de Pós-
Graduação em Odontologia, da
Universidade Federal do Ceará, como parte
dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Odontologia. Área de
Concentração: Odontologia. Área temática:
Estomatopatologia.

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

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)

B248a Barragán, Yamyle Claudia.

Análise da imunexpressão das proteínas de reparo do DNA Mismatch Repair (MMR) na carcinogênese do vermelhão do lábio. / Yamyle Claudia Barragán. – 2021.
61 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2021.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva..

1. Lábio. 2. Neoplasias Bucais. 3. Proteínas MutS. 4. Proteínas MutL.. I. Título.

CDD 617.6

YAMYLE CLAUDIA VELASQUEZ BARRAGAN

ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE REPARO DO DNA MISMATCH REPAIR (MMR) NA CARCINOGENESE DO VERMELHÃO DO LÁBIO

Relatório Final de Dissertação de mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós- Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Odontologia. Área temática: Estomatopatologia.

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

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Fabio Wildson Gurgel Costa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dra. Isabelle Joyce de Lima Silva Fernandes
Instituto do Cancer do Ceará

Dedico este trabalho primeiramente a Deus,
por ser essencial em minha vida, autor de meu
destino, a minha família pelo apoio
incondicional.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Ceará por ter proporcionado tantas vivências insubstituíveis e por ter me acolhido como estudante estrangeira, me permitindo desfrutar de toda sua infraestrutura e de seu corpo docente sem dúvida foi uma experiência que faz que cresça profissionalmente e também de forma pessoal.

Ao Prof. Paulo Goberlânio de Barros Silva pela excelente orientação durante todo este tempo de estudo de Mestrado. Foi uma honra ser bolsista de um professor tão comprometido e sábio. Minha eterna gratidão e admiração. À Banca Examinadora Prof. Dra. Isabelly de Lima Silva Fernandez, Prof. Dr. Fabio Wildson Gurgel Costa por todas as orientações e ensinamentos para este trabalho. Ao Laboratório de Patologia Bucal a meus professores que me propiciaram oportunidades únicas, com lições profissionais e humanas valiosas. A meus colegas e a muitas pessoas que fazem parte da equipe de trabalho, sem vocês, definitivamente, não conseguiria terminar esta etapa. Palavras são incapazes de descrever minha gratidão

À minha mãe, Janeth Espinoza Barragán, que dedicou a sua vida para que eu estivesse aqui. Que renunciou tanto para que eu tivesse tudo de melhor que ela pudesse oferecer. Obrigada por todos os incentivos e todos os ensinamentos sem isso, eu não chegaria onde cheguei.

A meus Irmãos, José, Cecilia, Lineth e Raul, já que o exemplo deles me fez enxergar lições muito importantes sobre lutar e sobre o amor incondicional. Obrigada por todos os ensinamentos e pelo apoio que vocês sempre me deram.

A meu apoio incondicional, Gustavo, que está ao meu lado nos melhores e piores momentos da vida. Sem seu apoio, tudo teria sido mais difícil. Obrigada pelos esforços que você faz para me ver feliz.

Às minhas amigas mais que especiais Gina, Susan, Janeth, Arianna, Lídito, que são meu suporte. Obrigada por estarem sempre presentes.

Obrigada Deus, pela minha vida e às oportunidades de conhecer pessoas excepcionais por me fazer provar do seu amor nos mínimos detalhes.

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) do lábio geralmente surge após a queilite actínica (QA), a principal lesão precursora. A superexposição aos raios solares ultravioleta tipos A e B causa mutações no DNA que levam a alterações em proteínas de reparo do DNA, principalmente aquelas do complexo Mismatch Repair (MMR). Essa família de proteínas está relacionada ao reparo pós replicacional do DNA, corrigindo as bases nitrogenadas incorporadas incorretamente ao genoma por meio dos seus dois principais heterodímeros (MutS α : MSH2 e MSH6; MutL α : PMS2 e MLH1). Nesse contexto, este projeto teve como objetivo analisar a imunexpressão dessas proteínas do complexo MMR na carcinogênese do vermelhão do lábio. Foi realizado um estudo transversal analítico com biopsias do Instituto do Câncer do Ceará (ICC), em que foram selecionados epitélios saudáveis de lábio oriundos de pelveglossectomias (15 casos), QA (30 casos) e CEC de lábio (45 casos), as quais foram submetidas à imuno-histoquímica para MSH2, MSH6, PMS2, MLH1 e ki-67. Variáveis clínico-prognósticas como sexo, idade, naturalidade, procedência, entrada no serviço (pública ou privada), profissão, histórico de fumo ou etilismo, estadiamento TNM, recidiva e protocolo terapêutico também foram avaliadas. Os grupos foram comparados por meio dos testes Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis/Dunn entre grupos de estudo e entre os dados clínico-prognósticos. O CEC e a QA apresentaram aumento significativo na imunexpressão para MutS α ($p < 0,001$), MSH6 ($p < 0,001$) e MLH1 ($p = 0,040$) e na razão MSH2/MSH6 ($p < 0,001$). A razão MSH2/MSH6, na QA, foi maior que a razão PMS2/MLH1 ($p = 0,028$). As QA com displasia de alto risco ($p = 0,024$) e os CEC com invasão vascular ($p = 0,035$) apresentaram menor imunexpressão para MSH6. Tumores T3/T4 apresentaram maior razão MutS α ($p = 0,028$) e MutL α ($p = 0,014$) e, nos pacientes com metástase nodal, a razão MutL α foi significativamente maior que a razão MSH2/MSH6 ($p = 0,046$). Este estudo demonstrou que o processo de carcinogênese do lábio (CEC) está relacionado a alterações na imunexpressão das proteínas MUTS α e MUTL α .

Palavras-chave (DeCS): Lábio; Neoplasias bucais; Proteínas MutS; Proteínas MutL.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) of the lip usually appears after actinic cheilitis (AC), the main precursor lesion. Overexposure to type A and B ultraviolet sun rays causes DNA mutations that lead to alterations in DNA repair proteins, especially those of the Mismatch Repair (MMR) complex. This family of proteins is related to post-replicative DNA repair, correcting nitrogenous bases incorrectly incorporated into the genome through its two main heterodimers (MutS α : MSH2 and MSH6; MutL α : PMS2 and MLH1). In this context, this project aimed to analyze the immunoeexpression of these MMR complex proteins in the carcinogenesis of lip vermilion. An analytical cross-sectional study was carried out with biopsies from the Ceará Cancer Institute (ICC), in which healthy lip epithelia from pelveglossectomies (15 cases), QA (30 cases) and CEC of the lip (45 cases) were selected. were subjected to immunohistochemistry for MSH2, MSH6, PMS2, MLH1 and ki-67. Clinical-prognostic variables such as sex, age, place of birth, origin, entry into the service (public or private), occupation, history of smoking or alcohol consumption, TNM staging, recurrence and therapeutic protocol were also evaluated. The groups were compared using the Mann-Whitney or Kruskal-Wallis/Dunn tests between study groups and between clinical and prognostic data. SCC and QA showed a significant increase in immunoeexpression for MutS α ($p < 0.001$), MSH6 ($p < 0.001$) and MLH1 ($p = 0.040$) and in the MSH2/MSH6 ratio ($p < 0.001$). The MSH2/MSH6 ratio in QA was greater than the PMS2/MLH1 ratio ($p = 0.028$). AK with high-risk dysplasia ($p = 0.024$) and SCC with vascular invasion ($p = 0.035$) had lower immunoeexpression for MSH6. T3/T4 tumors had higher MutS α ($p = 0.028$) and MutL α ($p = 0.014$) ratios and, in patients with nodal metastasis, the MutL α ratio was significantly higher than the MSH2/MSH6 ratio ($p = 0.046$). This study demonstrated that the process of lip carcinogenesis (CEC) is related to alterations in the immunoeexpression of MUTS α and MUTL α proteins.

Keywords (DeCS): Lip; Mounth neoplasms; MutS proteins;
MutL proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1-	Critérios arquiteturais e citológicos de acordo com a OMS.....	17
Quadro 2 -	Critérios preconizados pela OMS.....	17
Figura 1	Modelo de reparo de fitas de DNA.....	19

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Perfil sociodemográfico dos pacientes com CEC de lábio, queilite actínica e amostras de lábio sem alterações microscópicas avaliados histologicamente para análise imuno-histoquímica do heterodímero PMS2-MLH1.	46
Tabela 2 -	Perfil de imunexpressão para os heterodímeros de MutS α e MutL α nas lesões removidas do lábio e influência de achados microscópicos e gradação histológica no perfil de imunomarcção.	47
Tabela 3 -	Influência dos aspectos clínicos no perfil de imunexpressão para os heterodímeros de MutS α e MutL α no carcinoma do vermelhão do lábio	49
Tabela 4 -	Correlação entre as proteínas do complexo MMR nas lesões removidas do lábio.	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEC	Carcinoma Espinocelular de lábio
DNA	Desoxirribonucleico
HNPCC	Polipose hereditária do câncer de cólon
ICC	Instituto do Câncer do Ceará
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MMR	Mismatch Repair
MSI	Microssatélites
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
QA	Queilites Actínica.
RFC	Fator de replicação C
RPA	Proteína de replicação A
SPSS	Statistical Package for the Social Science
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	14
1.1 Queilite Actínica.....	14
1.2 Câncer de boca e carcinoma espinocelular do vermelhão do lábio.....	15
1.3 Proteínas do reparo do DNA: complexo Mismatch Repair (MMR).....	18
2.JUSTIFICATIVA.....	21
3. HIPÓTESES.....	22
3.1 Hipótese Nula.....	22
3.2 Hipótese Alternativa.....	22
4.OBJETIVOS.....	23
4.1 Objetivo Geral.....	23
4.2.Objetivos Específico.....	23
CAPÍTULO 1.....	24
Tittle Page.....	25
Running Head.....	25
Abstract.....	27
Introduction.....	28
Materials e methods.....	29
<i>Ethical considerations</i>	29
<i>Sample Calculation and Study Groups</i>	29
<i>Data collection</i>	29
<i>Histological grading of LSCC and actinic cheilitis</i>	30
<i>MicroArray Tissue and Immunohistochemistry</i>	31
<i>Immunohistochemical evaluation</i>	32
<i>Statistical Analysis</i>	32
<i>Results</i>	32
<i>Sociodemographic and clinicopathological profile of removed lip lesions</i>	32
<i>Immunostaining profile for MutSa and MutLa in lip lesions</i>	33
<i>Influence of clinicopathological characteristics of SCC of the lip on the immunostaining of MMR complex proteins</i>	34
<i>MMR complex proteins correlate in SCC of the lip</i>	35
<i>Discussion</i>	35
<i>Funding</i>	38

Acknowledgmen.....	39
REFERENCES.....	40
FIGURES.....	44
TABLES.....	46
APÊNDICE I	52
CONCLUSÃO GERAL.....	54
Referências.....	55
ANEXO I	59

1. INTRODUÇÃO

1.1. Queilite Actínica

A queilite actínica (QA) trata-se de uma alteração crônica, sendo uma desordem potencialmente maligna resultante da exposição solar frequente e prolongada, que afeta, principalmente, o lábio inferior de pessoas idosas, do sexo masculino e de pele clara (TRAGER et al., 2020). A prevalência global de QA foi relatada entre 0,45% e 2,4% (DANCYGER et al., 2018). No Nordeste do Brasil, aproximadamente, 15% da população mora em áreas rurais e 84% da população acima de 15 anos é composta por pessoas de pele clara, algumas áreas dessa região são altamente afetadas pela radiação UV, com uma média de 6 no índice UV da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO et al., 2012). É mais comum em meia-idade ou em pacientes mais velhos com exposição solar acumulada e ocorre mais frequentemente no lábio inferior por se tratar de um sítio anatômico que está mais diretamente exposto à luz solar (CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008).

No entanto, a radiação UV não é o único fator de risco para carcinogênese labial (PIÑERA-MARQUES et al., 2010). Exposição a agentes genotóxicos endógenos e exógenos, como Radiação UV, causa interrupção do ciclo celular e danos aos sistemas de reparo do DNA. O MMR desempenha um papel fundamental na manutenção da função celular normal (IKEHATA; ONO, 2011).

Os casos de QA podem se manifestar com a aparência clínica de leucoplasias, porém também foram relatados casos de QA com uma textura áspera, cuja palpação pode ser útil em delinear e diagnosticar lesões. As características histopatológicas clássicas da QA consistem em hiperqueratose, espessamento epitelial e graus variáveis de displasia epitelial, características histológicas da QA demonstram espectro de doença, variando de leve até severa (SHAH, DOHERTY, & ROSEN, 2010).

Os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), conforme as considerações de Barnes et al. (2005), é que, para cada espécime, a gradação de displasia epitelial é baseada na observação da extensão do epitélio acometido pelas alterações, considerando ausência de displasia epitelial; displasia epitelial leve, quando apenas o terço inferior do epitélio apresentava atipias celulares; displasia epitelial moderada, quando até o terço médio do epitélio continha atipias; displasia epitelial severa.

quando as alterações são de mais de dois terços do epitélio; é caracterizado como Carcinoma in situ o espécime que apresenta atipia em toda a espessura do epitélio e CCE invasivo, quando houve áreas de rompimento na membrana basal, este espectro histológico corresponde a um potencial cada vez mais perigoso, já que se trata de uma lesão cancerizável por consequência da exposição prolongada e contínua à radiação solar, especificamente, a radiação ultravioleta, afetando preferencialmente o lábio inferior (PRISCILLA SUASSUNA CARNEIRO; DE CASTRO BARRETO, 2013).

QA crônica e os carcinomas espinocelular da pele provenientes de queratoses actínicas têm melhor prognóstico, com probabilidade de 0,5% a 3% de metastatizar. Esse fato leva a supor que, talvez, da mesma forma que na pele, o tumor que se origina de QA pode ter melhor prognóstico (ABREU et al., 2007).

1.2. Câncer de boca e CEC do vermelhão do lábio

O câncer de boca é uma neoplasia maligna que surge no lábio ou na cavidade oral e é tradicionalmente definido como carcinoma espinocelular (CEC), pois tem origem histológica nas células escamosas e perfazem um total de 90% dos tumores malignos em boca (RIVERA, 2015).

Em todo o mundo, 300.000 casos de câncer de boca ocorrem anualmente, sendo responsáveis por quase 130.000 mortes todos os anos, e a mortalidade anual é de cerca de 145.000 óbitos (RIVERA, 2015). O câncer de boca é um problema de grande relevância para a saúde pública mundial, ele está localizado entre os 10 primeiros do ranking de incidência de câncer (BRAY et al., 2018). No Brasil, a incidência do câncer bucal é considerada uma das mais altas do mundo (WARNAKULASURIYA, 2009).

O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou, em 2020, que o número de casos novos de câncer da cavidade oral esperados para o Brasil, para cada ano do triênio 2020-2022, será de 11.180 casos em homens e de 4.010 em mulheres; na região Sudeste do Brasil, com o maior número de casos reportados, o número estimado é de 7.780 novos casos (RUÍZ, 2019).

A relação entre o CEC do vermelhão do lábio e a exposição solar foi descrita, em 1923, por Ayres. O tempo estimado para o desenvolvimento do câncer de lábio é de 20 a 30 anos, porém, em alguns pacientes, é menor (SHAH; DOHERTY; ROSEN, 2010). O perfil do paciente de risco para o desenvolvimento de câncer de lábio é: idade superior a 50 anos, pele clara, fumante, com antecedente de exposição solar (AUGUSTO et al.,

2014). Setenta por cento dos indivíduos afetados trabalham ao ar livre e estão normalmente associados à queilose actínica (NEVILLE, 2016).

Evidências clínicas e epidemiológicas apontam a radiação como causa do CEC do vermelhão do lábio. Inicia-se como um processo crônico e a exposição contínua à luz solar favorece o desenvolvimento da QA, que se transforma em carcinoma de células escamosas (CARVALHO, 2001), pois ocorre em presença de elastose solar e de alterações histológicas sugestivas de QA no vermelhão adjacente ao tumor, em quase todos os casos, havendo uma relação significativa entre essas condições.

A apresentação clínica de CEC do vermelhão do lábio é, geralmente, de um crescimento com superfície crostrosa com invasão variável no subjacente músculo (relacionado ao tamanho do tumor primário). O carcinoma típico do vermelhão é uma ulceração endurecida, rígida, exsudativa e com crosta, normalmente, menor que 1 cm em seu diâmetro máximo, quando descoberta. O tumor é caracterizado por um crescimento lento, e a maioria dos pacientes toma conhecimento do problema em um período de 12 a 16 meses, antes de ser feito o diagnóstico final. As metástases ocorrem tardiamente, no momento do diagnóstico, menos de 2% dos pacientes possuem nodos linfáticos envolvidos, comumente na região submentonana (NEVILLE, 2016).

O lábio adjacente, geralmente, mostra características do sol, danos actínicos como mudança de cor, afinamento da mucosa e áreas associadas da leucoplasia (PIÑERA-MARQUES et al., 2010).

Microscopicamente, são caracterizados pela proliferação de células epiteliais dispostas em ninhos, trabéculas, cordões ou faixas. São classificados como bem, moderadamente, pouco diferenciados e indiferenciados (NEVILLE, 2016). Quanto à severidade das displasias, ela está correlacionada com a progressão para a malignidade (WARNAKULASURIYA, 2009). A Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2005, estabeleceu critérios morfológicos (Quadro 1) para a interpretação histopatológica das displasias epiteliais, classificando-as em leve, moderada e severa (Quadro 2) (BARNES et al., 2005).

Quadro 1. Critérios arquiteturais e citológicos de acordo com a OMS (BARNES et al., 2005) para o diagnóstico de displasia epitelial.

Alterações arquiteturais	Alterações celulares
Estratificação epitelial irregular	Anisonucleose
Hiperplasia da camada basal	Pleomorfismo nuclear
Projeções epiteliais em gota	Anisocitose
Número aumentado de figuras de mitose	Pleomorfismo celular
Mitoses superficiais	Aumento da proporção núcleo/citoplasma
Disceratose	Mitoses atípicas
Pérolas de queratina	Hipercromatismo nuclear
	Aumento do número/tamanho dos nucléolos

Quadro 2. Critérios preconizados pela OMS (BARNES et al., 2005) para classificar o grau de displasia epitelial.

Grau de displasia epitelial	Critérios
Leve	Alterações arquiteturais limitadas ao terço inferior do epitélio e poucas atipias citológicas
Moderada	Alterações na arquitetura epitelial até o terço médio do epitélio e atipias citológicas em quantidade moderada
Severa	Alterações arquiteturais em mais de dois terços do epitélio e quantidades significativas de atipias celulares

A maioria das lesões de QA e CEC de lábio tem como fator etiológico a luz UV como sua principal causa e ela pode levar à iniciação da carcinogênese.

Em relação à pele, a neoplasia no lábio tem maior probabilidade de desenvolver metástase, com taxas variando de 3% a 20%, todavia é de melhor prognóstico quando comparado ao câncer intraoral (ABREU et al., 2007).

1.3. Proteínas do reparo do DNA: complexo Mismatch Repair (MMR)

As consequências biológicas dos danos aos tecidos, geralmente, dependem da natureza química da lesão, que, na maioria das vezes, afeta a fidelidade da replicação do DNA, causando mutações e danos ao DNA, que podem ocorrer em quase qualquer ponto do tempo de vida da célula, não apenas durante a replicação. Na verdade, o DNA pode sofrer danos todo o tempo por fatores externos, como luz UV, produtos químicos e Raios X, sem falar nas reações químicas espontâneas que acontecem mesmo sem agressões ambientais, felizmente, as células têm mecanismos de reparo para detectar e corrigir muitos tipos de danos ao DNA (MATHEWS; HURT; CABARCAS, 2014).

Para lidar com tais danos, todos os organismos desenvolveram uma complexa rede de mecanismos de reparo de DNA: reversão direta, reparo por excisão de bases, reparo por excisão 23 de nucleotídeos, reparo de bases mal pareadas e reparo por recombinação (MORITA et al., 2010).

Os mecanismos de reparo de danos no DNA são responsáveis pela manutenção da integridade do genoma (LI, 2008). Mutações germinativas de genes de reparação de danos no DNA, bem como os genes epigenéticos com perda de função, resultam na incorporação aprimorada de mutações e, conseqüentemente, na instabilidade genômica. O sistema de reparo Mismatch Repair (MMR) é responsável pela detecção e correção de erros criados durante a replicação do DNA, evitando a incorporação de mutações na divisão celular. Este caminho elimina severamente a danificação genética das células instáveis e desempenha um papel importante na prevenção da mutagênese em curto prazo e tumorigêneses em longo prazo (STARK et al., 2015).

As proteínas do reparo de DNA Mismatch (MMR) são encontradas em diversos mecanismos importantes de funções celulares. A principal função dessas proteínas está relacionada ao reparo pós replicacional do DNA, corrigindo as bases incorporadas incorretamente ao genoma devido ao erro de replicação. A perda das funções das proteínas MMR é, geralmente, aumentada por causa das mutações espontâneas em organismos, que vão desde bactérias a humanos (ULRICH et al., 2011; VINÍCIUS; OLIVEIRA, 2010).

Vários erros são corrigidos pela revisão, mas alguns poucos escapam. Reparo de mal pareamento acontece logo após o novo DNA ter sido feito e sua função é remover e substituir as bases mal pareadas (aquelas que não foram corrigidas durante a revisão).

O reparo do mal pareamento também pode detectar e corrigir pequenas inserções e deleções, que ocorrem quando as polimerases "deslizam" perdendo seu local de inserção na fita molde (HSIEH et al., 2008).

O reconhecimento de incompatibilidades no sistema MMR é realizado por heterodímeros das proteínas hMs (homólogo de MutS α). O sistema DNA MMR é composto por três componentes relacionados: MutS α , MutS β , MutL α . Subunidades de proteínas distintas: MutS α (hMSH2 -hMSH6), em que sua função é a de reconhecer incompatibilidades de base e são necessárias na iniciação da via MMR; Mut S β (hMsh2-hMsh3), em que sua função é a de reconhecer exclusão de nucleotídeos e a incompatibilidade mediada por MutS α , esse heterodímero é estudado com menos ênfase no mecanismo, já que ele, normalmente, é expresso em níveis relativamente baixos em todas as células, enquanto MutS α está presente em níveis elevados (Li GM, 2007) (LYER et al., 2006).

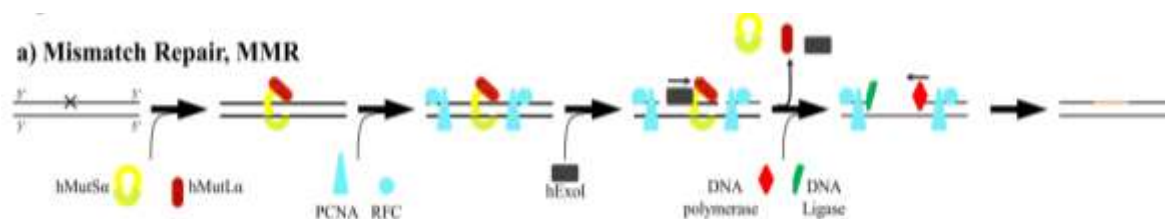


Figura 1. Esquemática de mecanismos de identificação e reparo dos erros em material genético durante checagem através das proteínas MutS α (complexo MSH2-MSH6) e MutL α (MLH1-PMS2) (JENSEN et al., 2011).

MutS α reconhece a base incompatível e se liga à fita de DNA danificada, recrutando, por meio desta, o MutL α (hMlh1: hPms2 heterodímero). Com a troca de ADP por ATP, o complexo MutS α desliza ao longo da fita de DNA, induzido por hPms2 em ambos os lados da incompatibilidade. Isso permite a entrada da exonuclease, ExoI, na extremidade 3' da fita danificada, em que remove 150 bases, incluindo a incompatibilidade, após a qual a proteína de replicação A (RPA) é recrutada, a polimerase de DNA δ liga-se em associação com seu antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), fator de processabilidade, que é carregado no DNA processado pelo fator de replicação C (RFC), uma nova fita de DNA é subsequentemente sintetizada, logo após o

DNA ligase I se une às extremidades (JENSEN et al., 2011) (Figura 1).

O sistema MMR foi amplamente estudado na última década devido à sua associação com várias doenças e condições, incluindo o câncer colorretal hereditário não poliposo (HNPCC) (RUEDA, 2013). Mais recentemente, o número de cânceres tem sido associado a defeitos no mecanismo de MMR, incluindo cólon, endométrio e câncer de próstata, colorretal (LI et al., 2013), carcinoma urotelial e renal (EHSANI; OSUNKOYA, 2014), gástrico, endometrial, ovariano, de glândulas salivares e tem sido descrita sua associação com o desenvolvimento e o prognóstico de tumores de cabeça e pescoço (DE OLIVEIRA FILHO et al., 2021) e no CEC de boca (SARMENTO et al., 2013; DECKER et al., 2020), assim também como em algumas lesões potencialmente malignas, como a leucoplasia.

Estudos anteriores sugeriram a perda de expressão de proteínas relacionadas à MMR, especialmente hMLH1, durante o processo de carcinogênese oral. (CALDEIRA et al., 2011). Alterações na imunexpressão das proteínas hMLH1 e hMSH2 são frequentemente detectadas em lesões potencialmente malignas. O processo de múltiplas etapas da carcinogênese oral depende do acúmulo de alterações genéticas, levando à instabilidade genômica, transformação celular e progressão tumoral (MASCOLO et al., 2012).

Os estudos encontrados na literatura que associam a imunexpressão das proteínas hMLH1 e hMSH2 com aspectos histológicos têm sido correlacionados com dados clínicos e epidemiológicos (ULRICH et al., 2011).

Em relação à carcinogênese do vermelhão do lábio, estudos que tenham comparado a expressão de proteínas da via MMR com base em amostras de lábio sadio, QA e CEC de lábio ainda não foram publicados. Apesar dos mecanismos de carcinogênese intraoral e do vermelhão do lábio serem diferentes, é provável que essa via exerça importante papel no desenvolvimento do carcinoma do vermelhão de lábio.

2. JUSTIFICATIVA

O complexo MMR é responsável pela substituição da base de incompatibilidade e pela exclusão de inserção incompatível, geradas durante a replicação do DNA. O MMR também reconhece danos no DNA formados por compostos químicos, como agentes alquilantes e sua inativação pode ter consequências negativas nas células, como uma tendência aumentada de mutações em genes associados à manutenção e replicação do genoma (PEREIRA et al., 2017).

A maior expressão ou a menor expressão das proteínas MMR causam altos níveis de instabilidade nas regiões de microssatélites (MSI) dos genes de reparo do DNA, que alteram a habilidade de esses genes repararem erros normalmente produzidos durante a replicação do DNA, o que está associado à carcinogênese.

O papel das proteínas MMR em CEC de lábio ainda não é totalmente conhecido, visto que a radiação UV exerce um fator importante na iniciação e progressão tumoral, quando a função desse reparo é pequena ou inexistente, a possibilidade de ocorrerem mutações aumenta consideravelmente, facilitando o aparecimento de lesões pré-cancerígenas (SIMIS T, 2006).

A absorção de luz ultravioleta no tegumento promove alterações químicas em substâncias foto lábeis presentes na pele do lábio. A exposição solar intensa e prolongada é considerada fator de risco decisivo para o surgimento do câncer de vermelhão do lábio (SALLES, 2007). A capacidade de reparação do DNA do trabalhador exposto à radiação UVB é fator importante na prevenção do câncer vermelhão do lábio.

Os poucos estudos envolvendo mecanismos de reparo do DNA em CEC, no vermelhão de lábio, motivou-nos a investigar o papel dessas proteínas no processo de carcinogênese. O nosso estudo poderá ajudar a se ter uma melhor compreensão sobre o papel desempenhado pelo sistema MMR na patogênese de CEC de lábio e QA.

1. HIPÓTESES

3.1 Hipótese Nula

A imunossupressão das proteínas de reparo do DNA MMR não está associada à carcinogênese do vermelhão do lábio.

3.2 Hipótese Alternativa

A imunossupressão das proteínas de reparo do DNA MMR está associada à carcinogênese do vermelhão do lábio.

1. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar o papel da imunexpressão das proteínas de reparo do DNA MMR na carcinogênese do vermelhão do lábio.

4.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar a imunexpressão das proteínas MutS α , MutL α e ki-67 em vermelhão do lábio, QA e carcinoma do vermelhão do lábio.
- Avaliar a influência de características clínico-patológicas em fatores na imunexpressão para MutS α , MutL α e ki-67 nos carcinomas do vermelhão do lábio e QA.

CAPÍTULO 1

Esta dissertação está baseada no Artigo 46, do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para trabalhos de conclusão de mestrado e doutorado (dissertações e teses) e permite a inserção de artigos científicos de autoria do candidato.

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Haroldo Juaçaba (Instituto do Câncer do Ceará), protocolado com número de registro de 2.191.839 (Anexo I). Serão respeitados todos os aspectos éticos expressos na Resolução nº 466 de 2012, do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde, que traz as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de pesquisas com seres humanos e em conformidade com a norma do CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa).

Dessa forma, a presente dissertação é composta por um artigo científico redigido de acordo com a revista científica escolhida.

Capítulo 1

“Imunoexpressão das proteínas Mismatch Repair em Carcinoma Espinocelular de lábio: um papel na carcinogênese de lábio? Um estudo observacional retrospectivo guiado por STROBE” (*Mismatch repair proteins immunostaining in lip squamous cell carcinoma: a role in carcinogenesis in lip?*).

Este artigo seguiu as normas de publicação do periódico:

Journal of Oral Pathology and Medicine

Qualis CAPES Referência A2

ISSN: 0904-2512

Title Page**Title**

Mismatch repair proteins immunostaining in lip squamous cell carcinoma: a role in lip carcinogenesis?.

Running Head

MMR in lip carcinogenesis

Authors

Yamyle Velásquez Barragán¹, Anna Clara Aragão Matos Carlos², Osias Vieira de Oliveira Filho¹, Thâmara Manoela Marinho Bezerra¹, Isabelle Joyce de Lima Silva-Fernandes³, Thinali Sousa Dantas^{1,2}, Ana Paula Negreiros Nunes Alves¹, Paulo Goberlânio de Barros Silva^{1,2,3*}

¹Laboratório de Patologia Oral, Departamento de Clínica Odontológica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

²Departamento de Odontologia, Unichristus, Fortaleza, Ceará, Brasil.

³Laboratório de Oncogenética, Hospital Haroldo Juaçaba, Instituto do Câncer do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brasil.

Abbreviations

AC = actinic cheilitis

LSCC = lip squamous cell carcinoma

TMA = tissue micro array

HLE = Healthy lip epithelia

MMR = Mismatch Repair

HHJ = Haroldo Juaçaba Hospital

ICC = Instituto do Câncer do Ceará

***Correspondence author:** Prof. Dr. Paulo Goberlânio de Barros Silva

Laboratório de Biologia Molecular e Genética, Hospital Haroldo Juaçaba, Instituto do Câncer do Ceará, Rua Papi Júnior, 1222 - Rodolfo Teófilo, Fortaleza - CE, 60430-230

Phone: +55 85 3031 4728

E-mail: paulo_goberlanio@yahoo.com.br

ABSTRACT

Introduction: Squamous cell carcinoma of the lip (LSCC) is strongly associated with malignant transformation of Actinic Cheilitis (AC). Such solar radiation alters the functions of Mismatch Repair (MMR) complex proteins, we aimed to evaluate the MMR complex proteins in lip carcinogenesis.

Materials and Methods: Healthy lip epithelia (HLE) (n=15), AC (n=30), and lip SCC (n=45) were selected and subjected to immunohistochemistry for MutS α (MSH2/MSH6) MutL α (MLH1/PMS2) to assess percentual of nuclear positive cells. Clinical-prognostic variables of the primary tumor and histological gradation (SCC and AC) were evaluated. Mann-Whitney, Kruskal-Wallis/Dunn, and Spearman correlation tests were used (p<0.05, SPSS 20.0).

Results: LSCC and AC showed significantly increased immunostaining for MSH2 (p<0.001), MSH6 (p<0.001) and MLH1 (p=0.040) and the MSH2/MSH6 ratio (p<0.001). The MSH2/MSH6 ratio in AC was higher than the PMS2/MLH1 ratio (p=0.028). AC with high-risk dysplasia (p=0.024) and LSCC with vascular invasion (p=0.035) showed lower immunostaining for MSH6. T3/T4 tumors showed higher MSH2/MSH6 (p=0.028) and PMS2/MLH1 (p=0.014) ratio and in patients with nodal metastasis the PMS2/MLH1 ratio was significantly higher than the MSH2/MSH6 ratio (p=0.046).

Conclusion: Increased MMR expression in lip cancer and the imbalance of MutS α and MutL α is associated with the progression and prognosis of lip SCC.

Keywords (MeSH): Lip; Mouth Neoplasms; MutS Proteins; MutL Proteins.

Introduction

The malignant transformation from Actinic cheilitis (AC) to lip squamous cell carcinoma (LSCC) is quite slow, with time range from 1 to 30 years, perhaps due to the difficulty in definitively diagnosing AC lesions,^{1,2,3}. LSCC is estimated to be responsible for 12% of all head and neck cancers⁴, and its carcinogenesis is related UV radiation^{1,5,6} because it remains the main cause of interruption of the cell cycle and damage to DNA repair systems⁷.

The biological consequences of DNA damage depend on the nature of the injury, which most often affects the fidelity of DNA replication, causing mutations, to cope with this damage, all organisms have developed a complex network of DNA Repair⁸ mechanisms. DNA Repair Mismatch (MMR) proteins are found in several important mechanisms of cellular functions and their main function is related to post-replicative DNA repair, correcting the bases incorrectly incorporated into the genome by replication error^{3,8}.

The recognition of the incompatible MMR system is carried out by heterodimers of the MSH proteins (MutS homologue). The MSH2/MSH6 (MutS α) heterodimer recognizes base incompatibilities. In contrast, the heterodimer MSH2/MSH3 (MutS β) recognizes nucleotide deletion and incompatibility mediated by MutS α after initial recognition, MutS α binds to the damaged DNA strand, recruiting MutL α (MLH1/PMS2)^{3,9,10,11}.

Recent studies have shown that immunostaining of MMR complex proteins is associated with oral carcinogenesis and the prognosis of head and neck tumors^{12,13}. These proteins appear to be promising prognostic indicators. Since UV directly impacts the function of these proteins, they are likely to play an essential role in the process of carcinogenesis of the lip. Therefore, the present study aimed to evaluate the immunostaining of the

MMR complex in lip carcinogenesis and its influence on the clinical and pathological variables of LSCC.

Materials e methods

Ethical considerations

This research was approved by the Research Ethics Committee of the Haroldo Juaçaba Hospital / Ceará Cancer Institute, under the registration protocol number 2.191.839. Observing the norms that regulate research in human beings, of the National Health Council in accordance with resolution 466/12. our study was conducted using the scientific methodology known as the STROBE initiative.

Sample Calculation and Study Groups

Considering that Sanguasin et al.¹⁴ observed that gene alterations in MSH2 increases by 10.67 ($p=0.030$) times the incidence of locoregional recurrence of oral SCC (total incidence of 50%), it is estimated necessary to evaluate, adopting a ratio of three cases for each control, 45 SCC of the lip and 15 lip epithelia without microscopic alterations to obtain a sample that represents with 80% power and 95% confidence the null hypothesis of this research (Kesley's method). To include the AC, a proportion of two cases for each control was used, thus totaling 45 lip SCC, 30 AC, and 15 healthy epithelia of the vermilion of the lower lip.

Data collection

The samples collected for the present study were collected from patients diagnosed and treated at the Haroldo Juaçaba Hospital / Ceará Cancer Institute (HHJ / ICC) who underwent surgery to resection lip vermilion carcinoma and who did not undergo neoadjuvant treatment.

Tissues from healthy lip epithelia from pelveglossectomies (control group) and tissues from AC and LSCC from the Pathology Laboratory of ICC were selected

After revision of the slides, samples of vermilion epithelium of the lip free of tumor margins from head and neck surgical resections were included in the control group. Those with a revised histological diagnosis of AC were included in the AC group. Those cases with a revised histological diagnosis of SCC were included in the LSCC group.

Clinicopathological data were collected from the patients' medical records, excluding patients with incomplete records (>30% of the sociodemographic and clinical-prognostic information). After evaluating the paraffin blocks, the blocks that did not present enough material to perform the Tissue MicroArray (TMA) technique were excluded.

Rescuing the histological, formalin-fixed, and paraffin-embedded specimens were selected, and the demographic and clinical data retrieved from the medical records of the selected patients were analyzed. Histological slides of the excisional biopsies were evaluated, and were identified for the fabrication of TMA blocks.

Histological grading of LSCC and actinic cheilitis

The classification of ACs and lip SCCs were performed by an experienced pathologist (>10 years of oral pathology), who exhibited an intra-examiner calibration coefficient kappa = 0.859.

The ACs had their epithelial dysplasia classified using a binary system of low/high risk of malignant transformation Warnakulasuriya et al¹⁵. The LSCC samples were classified using Bryne's binary model that classifies SCC into high and low-grade Dissanayake et al¹⁶. The presence of perineural and vascular invasion was also considered.

MicroArray Tissue and Immunohistochemistry

All microscopic slides were analyzed, and areas of tumors with highly cellular LSCC sections, areas of AC showing epithelium and connective tissue with solar elastosis, and control areas showing epithelium and connective tissue were identified. Two representative circumferential areas of 2 mm diameter each (3.14 mm²) from each sample were selected for the Microarray tissue technique. Paraffin blocks were punched from each demarcated area with a Tissue Microarrayer (Quick-Ray UNITMA®, Seongnam-si, South Korea) and then transferred to a paraffin receptor block containing 70 circular wells of the same diameter (2 mm). Then, the paraffin receptor blocks containing the oral ulcers were cut into 3 µm thick sections placed on silanized slides.

For immunohistochemical processing, samples were deparaffinized, rehydrated, and subjected to antigen retrieval in tris-EDTA buffer (pH 9.0). To inactivate endogenous peroxidases, samples were incubated in phosphate-buffered saline (PBS) with 3% H₂O₂ for 30 minutes, washed in PBS and incubated for one hour with primary antibodies against MSH2 (Dako®, FE11), MSH6 (Dako®, EP49), PMS2 (Dako®, EP51), MLH1 (Dako®, ES05) and ki-67 (Dako®, MIB-1).

Samples were washed in PBS, incubated in Envision Plus HRP Anti-IgG-rabbit/mouse for 30 minutes (ready-to-use; monoclonal; Dako® K4065), washed again in PBS, and diaminobenzidine chromogen (Dako® K3469) was applied to the samples for 5 minutes. Harris hematoxylin was used as the counterstain (10 s), after which the specimens were dehydrated in ethanol and xylene and covered with a permanent mounting medium (Entelam®, City, Country). Colorectal carcinoma sections were used as a positive control, and the negative control and the positive control were treated in parallel with antibody diluent instead of the primary antibody.

Immunohistochemical evaluation

For evaluation of MSH2, MSH6, PMS, MLH1, and ki-67, ten fields per histological section were photographed at 400x magnification. The images were exported to ImageJ® software and counted to determine the percentage of immunostained positive cells. Brown nuclear staining of epithelial cells (control group and QA group) and cancer cells (LSCC group) was considered a positive immunoreaction¹².

Statistical Analysis

Data were tabulated in Microsoft Excel and exported to the Statistical Package for the Social Science (SPSS) software in which the analyses were performed adopting a 95% confidence level.

The mean and standard deviation of the percentages of immunostaining for each of the MMR complex proteins studied, as well as the MSH2/MSH6 and PMS2/MLH1 ratio, were calculated. Data were compared using Mann-Whitney and Kruskal-Wallis/Dunn tests (between-group analysis) and Wilcoxon and Spearman correlation (intragroup analysis)

Results

Sociodemographic and clinicopathological profile of removed lip lesions

Most patients were male, aged up to 65 years, born and coming from the countryside of the state, who were admitted through the public health service and were farmers or retired/pensioners. There was no significant difference between the groups regarding clinical characteristics (Table 1).

Microscopically, the lip samples showed mostly orthokeratinized stratified sidewalk epithelial tissue with well-defined basal, spinous, and granular layers,

occasional exocytosis, and spongiosis supported by a chorion of fibrovascular connective tissue (Figure 1).

AC specimens exhibited atrophic stratified sidewalk epithelial tissue with four to six layers of squamous cells, disorganization of the basal and spinous layers, significant nuclear hyperchromatism cellular pleomorphism, and were paraceratinized. The supporting connective tissue showed solar elastosis throughout the lesions and occasional mononuclear inflammatory cells. Most actinic cheilitis had low-risk dysplasia (n=19), and 11 had high-risk dysplasia.

The LSCC samples showed proliferation of islands and strands of cells of epidermoid origin, organized, sometimes in nests, exhibiting intense cellular and nuclear pleomorphism, keratin pearls, typical and atypical mitosis figures, and intense mixed inflammatory infiltrate. Of the LSCCs evaluated, 29 were low-grade, and 17 were high-grade. Vascular (n=5) or perineural (n=12) invasion was observed in the minority of patients.

Immunostaining profile for MutSa and MutLa in lip lesions

The immunostaining for MSH2 and MSH6 showed immuno-positive epithelial cells in the standard lip samples, usually located in the basal and parabasal layers. In AC, the number of cells exhibiting positivity was arranged in the basal, paranasal, and spinous layers, increasing significantly. In the LSCC samples, most of the cells in the tumor islands and nests exhibited positivity for MLH1 (Figure 1).

There was a loss of MSH2 expression in AC compared to the lip without microscopic changes. It was possible to observe a significant increase in the immunostaining of this immunomarker in LSCC samples compared to the lip tissue without microscopic changes and the AC ($p < 0.001$). Besides, an increase in MSH6

immunostaining could also be analyzed in the ACs and the LSCC compared to the lip tissue without microscopic changes ($p < 0.001$). In the lip without microscopic changes, the immunostaining for MSH6 was significantly lower than the immunostaining of MSH2 ($p = 0.043$). In the AC occurred that higher immunostaining of MSH6 compared to MSH2 ($p = 0.005$). In the LSCC lip, there was no significant difference in the immunostaining of the two markers ($p = 0.296$). The MSH2/MSH6 ratio was significantly lower in AC and LSCC than in lip samples without microscopic changes ($p < 0.001$) (Table 2).

Immunostaining for MLH1 and PMS2 demonstrated occasional immunopositive epithelial cells in the basal and parabasal layer in the standard lip samples. In actinic cheilitis, the number of cells exhibiting positivity for this marker increased significantly, reaching the spinous layer. In the LSCC samples, almost all cells in the islands and tumor nests exhibited positivity for PMS2 (Figure 1) (Table 2).

A significant increase in MLH1 expression can be observed in the AC and LSCC samples compared to lip tissue without microscopic changes ($p = 0.040$). There was no significant difference between the ratio of PMS2/MLH1 immunostaining in the three study groups. (Table 2).

The immunostaining for ki-67 was significantly higher in the samples of AC and LSCC compared to the lip without microscopic changes ($p = 0.004$) (Table 2).

Influence of clinicopathological characteristics of SCC of the lip on the immunostaining of MMR complex proteins

For LSCC, the presence of vascular invasion was associated with a reduction in the number of MSH6-immunopositive cells ($p = 0.035$). Immunostaining of MSH2, MSH6, PMS2, and MLH1 and their ratios did not differ between markers or low and high

grades. Perineural invasion showed no association with MMR complex proteins (Table 2).

Patients with nodal metastasis showed higher PMS2/MLH1 ratio ($p=0.046$) and T3/T4 tumors showed higher MSH2/MSH6 ratio ($p=0.028$) and PMS2/MLH1 ratio ($p=0.014$) than T1/T2 tumors. Sex, age, presence of distant metastasis or recurrence were not associated with the immunostaining of MMR complex proteins (Table 3)

MMR complex proteins correlate in SCC of the lip

In the health lip without microscopic changes, there were no significant correlations between the proteins of the MMR complex. In AC, the immunostaining of MSH6 was directly correlated to the immunostaining of MSH2 ($p=0.038$). In LSCC all proteins were directly correlated with each other ($p<0.05$). Immunostaining of ki-67 did not correlate with the MMR complex proteins in any of the three tissues ($p>0.05$) (Table 4).

Discussion

Alterations in the MMR system has been described in the pathogenesis of numerous tumors. Recent studies have shown that low expression in MMR components has been linked to several types of cancers such as colorectal cancer, urothelial, renal and lung carcinomas have already been identified^{3,11,17,18,19}. In addition to salivary glands and its association with the development and prognosis of head and neck tumors and in the oral SCC^{12,13}.

The MutS α complex has its primary function, the post-replicative repair of DNA, correcting the bases incorrectly incorporated into the genome due to replication error²⁰. The main function of hMSH2 is to recognize pairing errors⁸, and the inefficiency

of this heterodimer is essential in the development of potentially malignant lesions of oral epithelium. Sarmiento et al.²¹ immunohistochemically analyzed forty cases of AC of the lower lip, demonstrating that hMLH1 and hMSH2 were less expressed in more dysplastic lesions. These results are similar to described by Oliveira et al.²² who showed greater expression of hMLH1 in mild dysplasia, while Souza et al.²³ found a lower expression of hMSH2 in lip cancer than in AC. Pimenta et al.²⁴ found a reduction in hMSH2 protein expression in oral lichen planus than normal oral mucosa epithelial tissue, raising the potential risk of this lesion malignancy. Alves et al.²⁵ demonstrated the downregulation of hMSH2 in the oral mucosa of smokers compared to patients who had never smoked. An experimental model of skin cancer, Meira et al.²⁶, induced by UVB radiation in rats, demonstrated that the overexpression of MSH2 reflects an interaction between the repair processes of nitrogenous bases incompatibility generating a genetic instability and subsequent carcinogenesis.

MSH6 alterations within the MutS α complex are also important in carcinogenesis^{9,14,17}. Jessri et al.¹⁹ described a loss of hMSH6 expression in oral dysplasia and SCC compared to normal epithelial tissue. However, in the lip lesions of this study, MSH6 was shown to be increased because, in the repair attempt, the overexpression of MSH6 could almost completely disrupt the mechanisms that prevent recombination between divergent DNA sequences by interacting with the DNA polymerase PCNA processing clamp^{18,27}. Importantly, cooverexpression of MSH2 and MSH6 in a PCNA interaction-dependent manner¹¹ also has several genome instability phenotypes, including increased mutation rate, increased sensitivity to DNA replication inhibitor, and DNA damaging agents, genome instability phenotypes that could be important in promoting cancer progression²⁸

The expression of MSH6 was remarkably similar to that of MLH1. There was an increased expression in actinic cheilitis and lip SCC compared to the lip without microscopic changes with no modification in the expression of MSH2. More than 80% of all colorectal cancers show loss of MLH1 protein is associated with microsatellite instability in urothelial carcinoma¹³. On the other hand, shows a low expression of MMR proteins, especially MLH1 and MSH2, is associated with oral carcinogenesis¹⁰⁻⁹⁻²⁹. Although we have observed that cheilitis with high-grade dysplasia and LSCCs with lymphovascular invasion have a loss of MSH6 expression, the process has differed in lip carcinogenesis. Apparently, an imbalance of MutL α proteins could be given by a compensatory mechanism for poor functional performance in the repair attempt^{17,19,29}.

Since malignant cells remain in a continuous division, they are permanently challenged to active DNA repair. Because of this, the performance of the MMR complex proves to be limited once these corrections can keep up with the rate of bipartition errors or the corrections are deficient, resulting in microsatellite instability due to failure to repair incorrect insertion/deletion pairs^{19,28}.

The present study also showed that in LSCC, the vascular invasion was associated with a reduction in the number of MSH6-immunopositive cells and staging with an imbalance in both MutS α and MutL α complexes. A study evaluating microsatellite instability in gastric cancer tumors with nodal metastasis also showed loss of MMR protein expression¹², suggesting that MMR deficiency is also associated with oral carcinogenesis progression and greater aggressiveness in tumors⁹. These findings seem to be independent of sex and age, resembling what was described by Wagner et al⁹.

In previous studies with oral and oropharyngeal SCC samples, the MMR complex directly influenced the prognosis in specific subpopulations (oral cancer patients

under 60 years of age and p16+ oropharyngeal tumors)^{12,13}. Although there were few relapse cases in the present study, it can be observed that patients who relived had a lower mean immunoexpression. Nevertheless, since lip tumors have a good prognosis³⁰, the small sample of recurrent tumors makes more solid conclusions impossible.

Correlations between MMR proteins followed tumor progression, probably due to DNA mismatches that trigger an MMR system response during malignant transformation^{19,28}. However, these proteins did not follow ki-67 expression, similar to what was observed in oropharyngeal tumors¹².

The retrospective nature of this study may limit its level of clinical evidence and we have two main limitations: the lack of MSI analysis, difficulty to be performed in paraffin blocks, and the sample size, since due to a good prognosis of LSCC, a much larger casuistic would be necessary to obtain an association between immunostaining and recurrence rates. However, this is the first study to address the immunostaining for all MMR complex proteins in the three stages of LSCC progression and clinical-pathological features, contributing enormously to the role of this pathway in head and neck tumors.

Thus, we could observe an increased expression of the MMR complex in lip cancer and that the imbalance of MutS α and MutL α is associated with tumor progression. There are increased activity and inter-association between these proteins in tumors, but their loss of expression significantly worsens the prognosis.

Funding

This research was partially founded by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FUNCAP (Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico) with the Protocol 00164-00078.01.00/1

Acknowledgments

The research team would like to thank the Cancer Institute of Ceará and the Haroldo Juaçaba Hospital for funding part of this study and allow the research to occur within their infrastructure.

REFERENCES

1. Piñera-M K, Lorenço SV, da Silva LFF, Sotto MN, Carneiro PC. Actinic lesions in fishermen's lower lip: Clinical, cytopathological and histopathologic analysis. *Clinics*. 2010;65(4):363-367.
2. Dancyger A, Heard V, Huang B, Suley C, Tang D, Ariyawardana A. Malignant transformation of actinic cheilitis: A systematic review of observational studies. *J Investig Clin Dent*. 2018;9(4):e12343.
3. Rodust PM, Stockfleth E, Ulrich C, Leverkus M, Eberle J. UV-induced squamous cell carcinoma - A role for antiapoptotic signalling pathways. *Br J Dermatol*. 2009;161(SUPPL. 3):107-115.
4. Kornevs E, Skagers A, Tars J, Bigestans A, Lauskis G, Libermanis O. 5 Year Experience With Lower Lip Cancer. *Stomatologija*. 2005;7(3):95-98.
5. Ikehata H, ONO T. The Mechanisms of UV Mutagenesis. *J Radiat Res*. 2011;52(2):115-125.
6. Li GM. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*. 2008;18(1):85-98
7. Shah AY, Doherty SD, Rosen T. Actinic cheilitis: A treatment review. *Int J Dermatol*. 2010;49(11):1225-1234.
8. Morita R, Nakane S, Shimada A, Inoue M, Iino H, Wakamatsu T, Fuukui K, Nakagawa N, Masui R, Kuramitsu S. Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: A comparison of bacterial and eukaryotic systems. *J Nucleic Acids*. 2010;32(6): 179594.
9. Wagner VP, Webber LP, Salvadori G, Meurer L, Fonseca FV, Castillo RM, Squarise CH, Vargas PA, Martins MD. Overexpression of MutS α complex proteins predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Med (United States)*.

2016;95(22):1-8.

10. Fernandes AM, Ramos-Jorge ML, Cardoso SV, Loyola AM, Mesquita RA, Aguiar MCF. Immunostaining of hMSH2 and hMLH1 in oral squamous cell carcinoma and its relationship to histological grades of malignancy. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(9):543-548.
11. Jensen NM, Dalsgaard T, Jakobsen M, Nielsen RR, Sorensen CB, Bolund L, Jensen TG. An update on targeted gene repair in mammalian cells: Methods and mechanisms. *J Biomed Sci.* 2011;18(1) :18-10.
12. De Oliveira Filho OV, Dantas TS, de Lima Silva-Fernandes IJ, et al. Mismatch Repair Proteins in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Observational Study . *Head Neck Pathol.* 2021;10.1007/s12105-021-01286-9.
13. Decker J, Filho O, Freitas M, Fernandez S, Dantas T, Campelo M, Cunha M, Silva P, Sousa F. PMS2: a potential prognostic protein marker in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral y Cir Bucal.* 2020;2:0-0.
14. Sanguansin S, Petmitr S, Punyarit P, Vorasubin V, Weerapradist W, Surarit R. HMSH2 gene alterations associated with recurrence of oral squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res.* 2006 Jun;25(2):251-7.
15. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol.* 2009;45(4-5):309-316.
16. Dissanayake U. Malignancy grading of invasive fronts of oral squamous cell carcinomas. *Transl Res Oral Oncol.* 2017;2:2057178X1770887.
17. Ehsani L, Osunkoya AO. Expression of MLH1 and MSH2 in urothelial carcinoma of the renal pelvis. *Tumor Biol.* 2014;35(9):8743-8747.
18. Li M, Zhang Q, Liu L, Lu W, Wei H, Li R, Lu S. Expression of the Mismatch Repair Gene hMLH1 Is Enhanced in Non-Small Cell Lung Cancer with EGFR Mutations.

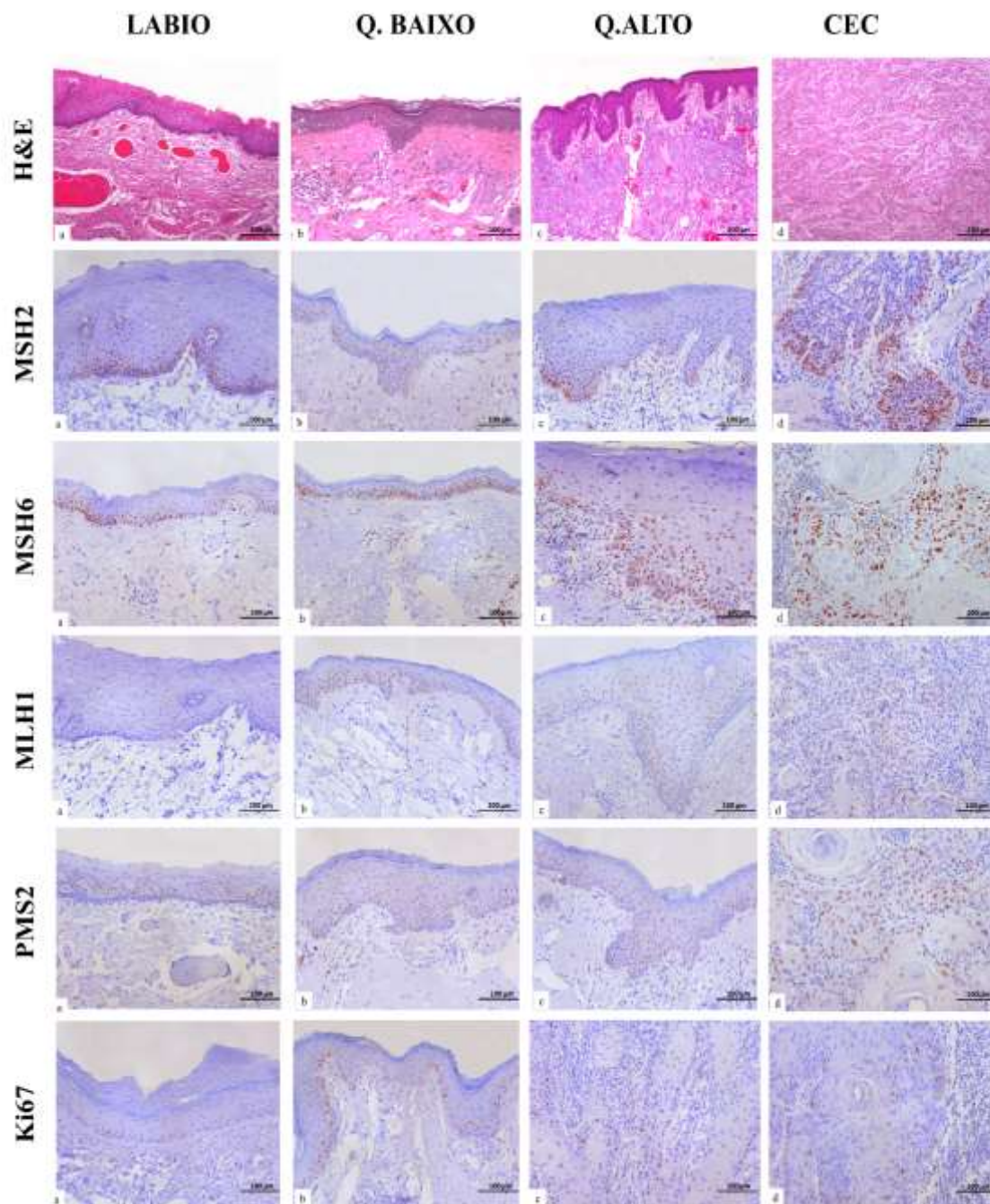
PLoS One. 2013;8(10):1-7.

19. Jessri M, Dalley AJ, Farah CS. HMSH6: A potential diagnostic marker for oral carcinoma in situ. *J Clin Pathol*. 2015;68(1):86-90.
20. Liu D, Keijzers G, Rasmussen LJ. DNA mismatch repair and its many roles in eukaryotic cells. *Mutat Res*. 2017;773:174-187.
21. Sarmiento DJ de S, Godoy GP, Miguel MC da C, da Silveira ÉJD. Link between immunostaining of hMLH1 and hMSH2 proteins and clinical-epidemiological aspects of actinic cheilitis. *An Bras Dermatol*. 2016;91(4):463-467.
22. De Oliveira DHIP, de Sousa Lopes MLD, de Santana Sarmiento DJ, Queiroz LMG, da Costa Miguel MC, da Silveira ÉJD. Relationship between the epithelial expression of hMLH1, MDM2, and p63 and lower lip carcinogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2014;43(5):357-363.
23. Souza LR, Fonseca-Silva T, Pereira CS, Santos E P, Lima L C, Carvalho H A, Gomez R S, Guimaraes A L S & De Paula A M B. Immunohistochemical analysis of p53, APE1, hMSH2 and ERCC1 proteins in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma. *Histopathology*. 2011;58(3):352-360.
24. Pimenta FJ, Pinheiro MD, Gomez RS. Expression of hMSH2 protein of the human DNA mismatch repair system in oral lichen planus. *Int J Med Sci*. 2004;1(3):146-151.
25. Alves MG, Carta CF, de Barros PP, Issa JS, Nunes FD, Almeida JD. Repair genes expression profile of MLH1, MSH2 and ATM in the normal oral mucosa of chronic smokers. *Arch Oral Biol*. 2017;73:60-65.
26. Meira LB, Cheo DL, Reis AM, Claij N, Burns DK, Riele HT, Friedberg EC. Mice defective in the mismatch repair gene Msh2 show increased predisposition to UVB radiation-induced skin cancer. *DNA Repair (Amst)*. 2002;1(11):929-934.

27. Edelmann W, Yang K, Umar A, Heyer J, Lau K, Fan K, Liedtke W, Cohen PE, Kane MF, Lipford JR, Yu N, Crouse GF, Pollard JW, Kunkel T, Lipkin M, Kolodner R, Kucherlapati R. Mutation in the mismatch repair gene Msh6 causes cancer susceptibility. *Cell*. 1997;91(8):467-477.
28. Wilczak W, Rashed S, Hube-Magg C, Kluth M, Simon R, Büscheck F, Clauditz TS, Grupp K, Minner S, Tsourlakis MC, Möller-Koop C, Graefen M, Adam M, Haese A, Wittmer C, Sauter G, Izbicki JR, Huland H, Schlomm T, Steurer S, Krech T, Lebok . Up-regulation of mismatch repair genes MSH6, PMS2 and MLH1 parallels development of genetic instability and is linked to tumor aggressiveness and early PSA recurrence in prostate cancer. *Carcinogenesis*. 2017;38(1):19-27.
29. Sarmiento DJ de S, de Almeida WL, Miguel MC da C, Queiroz L M G, Godoy G P, Cruz M C, Da Silveira E . Immunohistochemical analysis of mismatch proteins in carcinogenesis of the lower lip. *Histopathology*. 2013;63(3):371-377.
30. Vukadinovic M, Jezdic Z, Petrovic M, Medenica LM, Lens M. Surgical Management of Squamous Cell Carcinoma of the Lip: Analysis of a 10-Year Experience in 223 Patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007;65(4):675-679.

FIGURES

Figure 1: Representative images from photomicrographs; Healthy lip, Q. B = Cheilitis with low dysplasia, Q. A = Cheilitis with high dysplasia, CPB = Lip squamous cell carcinoma. MSH2; nuclear staining, percentage of staining cells per case: a = 60%, b = 40%, c = 40%, d = 75%. MSH6; nuclear staining, percentage of staining cells per case: a = 50%, b = 80%, c = 68%, d = 75%. MLH1; nuclear staining, percentage of staining cells per case: a = 40%, b = 60%, c = 60%, d = 60%. PMS2; nuclear staining, percentage of staining cells per case: a = 50%, b = 75%, c = 75%, d = 75%. Ki67; nuclear staining, percentage of staining cells per case: a = 1%, b = 9%, c = 9%, d = 9%.



TABLES

Table 1: Sociodemographic profile of patients with SCC of the lip, actinic cheilitis, and lip specimens without microscopic changes evaluated histologically for immunohistochemical analysis of the PMS2-MLH1 heterodimer.

	Group			p-Value
	Lip	Cheilitis	SCC	
Total	15 (100.0%)	30 (100.0%)	45 (100.0%)	-
Sex				
Female	5 (33.3%)	15 (50.0%)	11 (24.4%)	0.074
Male	10 (66.7%)	15 (50.0%)	34 (75.6%)	
Age				
Up to 65	7 (46.7%)	14 (46.7%)	24 (53.3%)	0.819
>65	8 (53.3%)	16 (53.3%)	21 (46.7%)	
Origin				
Countryside	11 (73.3%)	16 (53.3%)	27 (60.0%)	0.564
Metropolitan area	1 (6.7%)	7 (23.3%)	6 (13.3%)	
Capital	3 (20.0%)	7 (23.3%)	12 (26.7%)	
Living in				
Countryside	11 (73.3%)	16 (53.3%)	27 (60.0%)	0.564
Metropolitan area	1 (6.7%)	7 (23.3%)	6 (13.3%)	
Capital	3 (20.0%)	7 (23.3%)	12 (26.7%)	
Service entrance				
Public Health System	15 (100.0%)	27 (93.1%)	37 (92.5%)	0.558
Health Insurance/Private	0 (0.0%)	2 (6.9%)	3 (7.5%)	
Profession				
Farmer	3 (37.5%)	7 (38.9%)	12 (46.2%)	0.548
Retired/Pensioner	4 (50.0%)	11 (61.1%)	11 (42.3%)	
Other professions	1 (12.5%)	0 (0.0%)	3 (11.5%)	

*p<0.05, Fisher's exact test or Pearson's chi-square test (n,

Table 2: Immunostaining profile for MutS α and MutL α heterodimers in the removed lip lesions and influence of microscopic findings and histological gradation on the immunolabeling profile.

	MutS α		p-Value ^a	MutL α		p-Value ^a	Ratio		p-Value ^a	Ki-67 (%)
	MSH2 (%)	MSH6 (%)		PMS2 (%)	MLH1 (%)		MSH2/MSH6	PMS2/MLH1		
Lip Lesions										
Lip (n=15)	63.23±13.79	51.69±13.87	0.043	47.18±12.12	44.67±9.34	0.500	1.26±0.32	1.08±0.32	0.593	1.20±0.86
Cheilitis (n=30)	49.45±19.41*	77.04±8.85*	0.005	57.68±12.25	60.69±13.14*	0.424	0.67±0.24*	0.98±0.24	0.028	9.82±4.65*
SCC (n=45)	75.82±10.84* [†]	74.27±11.28*	0.296	60.41±20.46	60.35±12.12*	0.157	1.02±0.13* [†]	1.05±0.18	0.387	9.10±9.59*
p-Value^b	<0.001	<0.001		0.106	0.040		<0.001	0.461		0.004
Histological grading of dysplasias										
Low risk (n=19)	53.75±14.83	80.46±7.74	0.018	55.86±12.69	61.46±13.50	0.241	0.72±0.09	0.95±0.24	0.046	8.82±4.37
High risk (n=11)	36.53±29.30	68.51±4.89*	0.109	64.95±8.13	52.24±0.00	1.000	0.53±0.43	1.26±0.10	0.025	11.80±4.95
p-Value^b	0.309	0.024		0.194	0.469		0.732	0.206		0.210
Histological grading of lip SCC										
Low (n=29)	74.42±9.99	74.66±12.39	0.741	58.83±19.72	55.45±15.87	0.094	1.00±0.11	1.09±0.22	0.177	6.54±12.50
High (n=17)	78.12±12.13	73.69±9.79	0.182	63.18±22.32	63.41±21.97	0.722	1.04±0.15	1.00±0.08	0.646	6.75±8.47

p-Value^b	0.247	0.973		0.432	0.181		0.278	0.208		0.964
Lymphovascular										
invasion (SCC)										
No (n=40)	76.62±10.18	75.81±11.22	0.600	62.96±19.24	61.00±17.16	0.130	1.00±0.10	1.06±0.19	0.131	6.64±11.68
Yes (n=5)	70.70±14.69	65.00±6.57*	0.498	46.13±23.45	45.66±22.15	0.684	1.09±0.23	1.01±0.11	0.498	6.26±8.65
p-Value^b	0.450	0.035		0.160	0.096		0.071	0.603		0.957
Perineural invasion										
(SCC)										
No (n=32)	75.93±10.48	75.69±12.03	0.543	62.69±20.38	60.47±16.27	0.212	1.00±0.11	1.04±0.18	0.349	7.27±12.62
Yes (n=13)	75.59±12.03	70.72±8.63	0.386	55.19±20.75	55.00±22.51	0.575	1.05±0.16	1.07±0.20	0.767	4.79±6.74
p-Value^b	0.922	0.290		0.347	0.509		0.481	0.963		0.604

aTest Wilcoxon; bTest Kruskal-Wallis/Dunn, *p<0.05 versus lip, †p<0.05 versus cheilitis (media ±SD).

Table 3: Influence of clinical features on the immunostaining profile for MutSa and MutLa heterodimers in vermilion carcinoma of the lip.

	MutSa		p-Value ^a	MutLa		p-Value ^a	Ratio		p-Value ^a	Ki-67 (%)
	MSH2 (%)	MSH6 (%)		PMS2 (%)	MLH1 (%)		MSH2/MSH6	PMS2/MLH1		
Sex										
Female (n=11)	75.45±8.97	70.75±8.46	0.249	59.36±20.45	55.00±18.92	0.063	1.07±0.11	1.11±0.22	0.500	11.61±22.42
Male (n=34)	75.92±11.44	75.15±11.84	0.346	60.70±20.86	59.56±18.71	0.790	1.00±0.13	1.04±0.17	0.615	6.37±8.76
p-Value^b	0.740	0.343		0.792	0.637		0.202	0.554		0.364
Age										
Up to 65 (n=24)	51.08±8.15	72.07±8.87	0.394	57.55±9.10	64.46±19.92	0.649	0.70±0.10	1.00±0.25	0.722	5.88±7.46
>65 (n=21)	48.90±22.36	80.78±7.22	0.557	57.72±13.61	59.44±11.45	0.215	0.65±0.28	0.97±0.26	0.535	8.83±15.41
p-Value^b	0.447	0.597		0.943	0.937		0.800	0.792		0.491
T										
T1/2 (n=30)	74.23±12.89	81.09±12.15	0.345	52.59±24.15	47.00±22.29	0.686	0.91±0.16	1.02±0.13	0.144	8.19±10.77
T3/4 (n=15)	75.10±10.41	70.87±9.05	0.043	55.97±22.02	49.30±23.14	0.068	1.06±0.04	1.36±0.18	0.068	20.57±21.93
p-Value^b	0.808	0.167		0.850	0.602		0.028	0.014		0.300
N										
N0 (n=29)	78.66±4.27	82.26±11.36	0.917	60.46±15.18	60.63±12.63	0.465	0.97±0.14	1.03±0.18	0.109	6.82±10.20
N+ (n=16)	70.86±15.24	72.52±10.71	0.463	49.95±27.40	41.43±24.26	0.075	0.97±0.14	1.24±0.23	0.046	27.43±20.95
p-Value^b	0.606	0.153		0.423	0.201		1.000	0.286		0.039

M										
M0 (n=47)	74.07±8.04	77.09±14.50	0.753	49.04±15.84	44.71±21.50	0.273	0.98±0.13	1.22±0.35	0.109	6.76±5.80
M1 (n=3)	67.64±20.63	72.28±13.81	1.000	54.57±37.63	45.61±30.87	0.109	0.93±0.20	1.16±0.11	0.109	7.89±8.91
p-Value^b	0.732	0.732		0.606	0.881		0.796	0.724		0.885
Recurrence										
No (n=47)	76.16±9.89	73.87±11.42	0.171	61.45±18.84	59.91±17.05	0.200	1.03±0.12	1.05±0.19	0.648	9.09±9.58
Yes (n=3)	71.96±21.85	78.48±10.58	0.593	50.08±37.10	45.63±30.88	0.593	0.90±0.17	1.07±0.10	0.285	8.74±7.70
p-Value^b	0.956	0.409		0.661	0.385		0.188	0.519		0.770

aWilcoxon head; bMan-Whitney head, *p<0.05 (mean ±SD).

Table 4: Correlation between the MMR complex proteins in the removed lesions of the lip.

	MSH2	MSH6	PMS2	MLH1	Ki67
Lip					
MSH2	-	p=0.432 (r=0.357)	p=0.285 (r=0.600)	p=0.800 (r=-0.200)	p=0.397 (r=0.429)
MSH6	-	-	p=0.432 (r=0.357)	p=0.208 (r=0.600)	p=0.876 (r=-0.071)
PMS2	-	-	-	p=0.285 (r=0.600)	p=0.188 (r=-0.700)
MLH1	-	-	-	-	p=0.544 (r=0.314)
Ki67	-	-	-	-	-
Cheilitis					
MSH2	-	<i>p=0.038 (r=0.661)</i>	p=0.803 (r=0.091)	p=0.265 (r=0.417)	p=0.460 (r=0.283)
MSH6	-	-	p=0.790 (r=0.091)	p=0.865 (r=0.067)	p=0.574 (r=-0.191)
PMS2	-	-	-	p=0.298 (r=0.345)	p=0.593 (r=0.182)
MLH1	-	-	-	-	p=0.637 (r=0.183)
Ki67	-	-	-	-	-
SCC					
MSH2	-	<i>p<0.001 (r=0.753)</i>	<i>p<0.001 (r=0.691)</i>	<i>p<0.001 (r=0.810)</i>	p=0.544 (r=0.133)
MSH6	-	-	<i>p=0.002 (r=0.526)</i>	<i>p<0.001 (r=0.689)</i>	p=0.697 (p=0.086)
PMS2	-	-	-	<i>p<0.001 (r=0.872)</i>	p=0.384 (r=0.206)
MLH1	-	-	-	-	p=0.352 (r=0.220)
Ki67	-	-	-	-	-

APÊNDICE I

STROBE Statement—Checklist of items that should be included in reports of *cross-sectional studies*

	Item No	Recommendation	Page
Title and abstract	1	(a) Indicate the study's design with a commonly used term in the title or the abstract	1
		(b) Provide in the abstract an informative and balanced summary of what was done and what was found	1-2
Introduction			
Background/rationale	2	Explain the scientific background and rationale for the investigation being reported	3-6
Objectives	3	State specific objectives, including any prespecified hypotheses	5-6
Methods			
Study design	4	Present key elements of study design early in the paper	6
Setting	5	Describe the setting, locations, and relevant dates, including periods of recruitment, exposure, follow-up, and data collection	6
Participants	6	(a) Give the eligibility criteria, and the sources and methods of selection of participants	6
Variables	7	Clearly define all outcomes, exposures, predictors, potential confounders, and effect modifiers. Give diagnostic criteria, if applicable	7
Data sources/ measurement	8*	For each variable of interest, give sources of data and details of methods of assessment (measurement). Describe comparability of assessment methods if there is more than one group	7-8
Bias	9	Describe any efforts to address potential sources of bias	9-10
Study size	10	Explain how the study size was arrived at	6
Quantitative variables	11	Explain how quantitative variables were handled in the analyses. If applicable, describe which groupings were chosen and why	9-10
Statistical methods	12	(a) Describe all statistical methods, including those used to control for confounding	10
		(b) Describe any methods used to examine subgroups and interactions	
		(c) Explain how missing data were addressed	
		(d) If applicable, describe analytical methods taking account of sampling strategy	
		(e) Describe any sensitivity analyses	

Results	13*	(a) Report numbers of individuals at each stage of study—eg numbers potentially eligible, examined for eligibility, confirmed eligible, included in the study, completing follow-up, and analysed (b) Give reasons for non-participation at each stage (c) Consider use of a flow diagram	10-11
Descriptive data	14*	(a) Give characteristics of study participants (eg demographic, clinical, social) and information on exposures and potential confounders (b) Indicate number of participants with missing data for each variable of interest	10-12
Outcome data	15*	Report numbers of outcome events or summary measures	10-13
Main results	16	(a) Give unadjusted estimates and, if applicable, confounder-adjusted estimates and their precision (eg, 95% confidence interval). Make clear which confounders were adjusted for and why they were included (b) Report category boundaries when continuous variables were categorized (c) If relevant, consider translating estimates of relative risk into absolute risk for a meaningful time period	10-13
Other analyses	17	Report other analyses done—eg analyses of subgroups and interactions, and sensitivity analyses	13-14
Discussion			
Key results	18	Summarise key results with reference to study objectives	14-17
Limitations	19	Discuss limitations of the study, taking into account sources of potential bias or imprecision. Discuss both direction and magnitude of any potential bias	17
Interpretation	20	Give a cautious overall interpretation of results considering objectives, limitations, multiplicity of analyses, results from similar studies, and other relevant evidence	17
Generalisability	21	Discuss the generalisability (external validity) of the study results	16-17
Other information			
Funding	22	Give the source of funding and the role of the funders for the present study and, if applicable, for the original study on which the present article is based	17-18

*Give information separately for exposed and unexposed groups.

Note: An Explanation and Elaboration article discusses each checklist item and gives methodological background and published examples of transparent reporting.

The STROBE checklist is best used in conjunction with this article (freely available on the Web sites of PLoS Medicine at <http://www.plosmedicine.org/>, Annals of Internal Medicine at <http://www.annals.org/>, and Epidemiology at <http://www.epidem.com/>). Information on the STROBE Initiative is available at www.strobe-statement.org.

CONCLUSÃO GERAL

Levando-se em consideração os aspectos estudados nesta pesquisa, conclui-se que há aumento na expressão do complexo MMR no câncer de lábio e que o desbalanceio de MutS α e MutL α está associado com a progressão tumoral. Nos tumores, há aumento da atividade e da interassociação entre essas proteínas, mas a sua perda de expressão piora significativamente o prognóstico.

Referências

- ABREU, M. A. M. M. DE et al. Queilite actínica adjacente ao carcinoma espinocelular do lábio como indicador de prognóstico. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 72, n. 6, p. 767–771, 2007.
- ALVES, M. G. O. et al. Repair genes expression profile of MLH1, MSH2 and ATM in the normal oral mucosa of chronic smokers. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 60–65, 2017.
- AUGUSTO, S. et al. Treatment of actinic cheilitis by surgical vermilionectomy. v. 20, p. 11–17, 2014.
- BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018.
- CALDEIRA, P. C. et al. Oral leukoplakias with different degrees of dysplasia: Comparative study of hMLH1, p53, and AgNOR. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 40, n. 4, p. 305–311, 2011.
- CAVALCANTE, A. S. R.; ANBINDER, A. L.; CARVALHO, Y. R. Actinic Cheilitis: Clinical and Histological Features. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 66, n. 3, p. 498–503, 2008.
- DANCYGER, A. et al. Malignant transformation of actinic cheilitis: A systematic review of observational studies. **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 9, n. 4, p. e12343, 2018.
- DE OLIVEIRA FILHO, O. V. et al. Mismatch Repair Proteins in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Retrospective Observational Study. **Head and Neck Pathology**, n. 0123456789, 2021.
- DECKER, J. et al. PMS2: a potential prognostic protein marker in oral squamous cell carcinoma. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 2, p. 0–0, 2020.
- DISSANAYAKE, U. Malignancy grading of invasive fronts of oral squamous cell carcinomas. **Translational Research in Oral Oncology**, v. 2, p. 2057178X1770887, 2017.
- EDELMANN, W. et al. Nianjun Yu, 9 Gray F. Crouse, 9 views see Modrich. **Cell**, v. 91, n. 8, p. 467–477, 1997.
- EHSANI, L.; OSUNKOYA, A. O. Expression of MLH1 and MSH2 in urothelial carcinoma of the renal pelvis. **Tumor Biology**, v. 35, n. 9, p. 8743–8747, 2014.
- FERNANDES, A. M. et al. Immunoexpression of hMSH2 and hMLH1 in oral squamous cell

carcinoma and its relationship to histological grades of malignancy. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 37, n. 9, p. 543–548, 2008.

HSIEH, P.; YAMANE, K. DNA mismatch repair: Molecular mechanism, cancer, and ageing. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 129, n. 7–8, p. 391–407, 2008.

IKEHATA, H.; ONO, T. The Mechanisms of UV Mutagenesis. **Journal of Radiation Research**, v. 52, n. 2, p. 115–125, 2011.

JENSEN, N. M. et al. An update on targeted gene repair in mammalian cells: Methods and mechanisms. **Journal of Biomedical Science**, v. 18, n. 1, 2011.

KORNEVS, E. et al. 5 Year Experience With Lower Lip Cancer. **Stomatologija / issued by public institution “Odontologijos studija” ... [et al.]**, v. 7, n. 3, p. 95–98, 2005.

LI, G. M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. **Cell Research**, v. 18, n. 1, p. 85–98, 2008.

LI, M. et al. Expression of the Mismatch Repair Gene hMLH1 Is Enhanced in Non-Small Cell Lung Cancer with EGFR Mutations. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–7, 2013.

LYER, R. R. et al. DNA mismatch repair: Functions and mechanisms. **Chemical Reviews**, v. 106, n. 2, p. 302–323, 2006.

M.B. DE CARVALHO. características clinico epidemiológicas do carcinoma de boca. v. 47, n. 3, 2001.

MASCOLO, M. et al. Epigenetic dysregulation in oral cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 2, p. 2331–2353, 2012.

MATHEWS, L. A.; HURT, E. M.; CABARCAS, S. M. DNA repair of cancer stem cells. **DNA Repair of Cancer Stem Cells**, p. 1–178, 2014.

MEIRA, L. B. et al. Mice defective in the mismatch repair gene Msh2 show increased predisposition to UVB radiation-induced skin cancer. **DNA Repair**, v. 1, n. 11, p. 929–934, 2002.

MENCK, C. F.; MUNFORD, V. DNA repair diseases: What do they tell us about cancer and aging? **Genetics and molecular biology**, v. 37, n. 1 Suppl, p. 220–33, 2014.

MORITA, R. et al. Molecular mechanisms of the whole DNA repair system: A comparison of bacterial and eukaryotic systems. **Journal of Nucleic Acids**, v. 2010, n. ii, 2010.

Patologia Oral e Maxilofacial Neville. , 2009.

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, 2017.

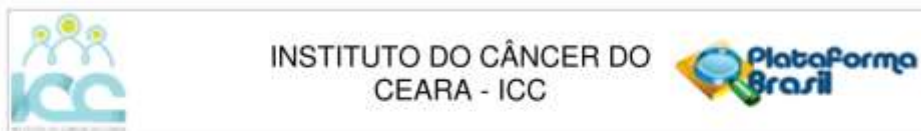
PIÑERA-MARQUES, K. et al. Actinic lesions in fishermen’s lower lip: Clinical, cytopathological and histopathologic analysis. **Clinics**, v. 65, n. 4, p. 363–367, 2010.

- PRISCILLA SUASSUNA CARNEIRO; DE CASTRO BARRETO, R. Queilite actínica-perfil da produção científica em odontologia do Brasil nos últimos dez anos. **Revista Cubana de Estomatologia**, v. 49, n. 4, p. 276–285, 2013.
- RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 9, p. 11884–11894, 2015.
- RODUST, P. M. et al. UV-induced squamous cell carcinoma - A role for antiapoptotic signalling pathways. **British Journal of Dermatology**, v. 161, n. SUPPL. 3, p. 107–115, 2009.
- RUEDA, L. C. LIDIANE CAMILA RUEDA “ Investigação de mutações nos genes MLH1 e MSH2 em portadores de C ncer Colorretal Heredit rio sem Polipose (HNPCC) ”. 2013.
- RUÍZ, A. A. B. **Estimativa do cancer no Brasil 2020**. [s.l: s.n.]. v. 3
- SANGUASIN, A. L. A. et al. Involvement of repair genes in oral cancer: A systematic review. **Cell Biochemistry and Function**, v. 37, n. 8, p. 572–577, 2019.
- SARMENTO, D. J. DE S. et al. Immunohistochemical analysis of mismatch proteins in carcinogenesis of the lower lip. **Histopathology**, v. 63, n. 3, p. 371–377, 2013.
- SHAH, A. Y.; DOHERTY, S. D.; ROSEN, T. Actinic cheilitis: A treatment review. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 11, p. 1225–1234, 2010.
- STARK, A. M. et al. Expression of DNA mismatch repair proteins MLH1, MSH2, and MSH6 in recurrent glioblastoma. **Neurological Research**, v. 37, n. 2, p. 95–105, 2015.
- TRAGER, M. H. et al. Actinic cheilitis: a systematic review of treatment options. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, 2020.
- ULRICH, M. et al. Non-invasive diagnosis and monitoring of actinic cheilitis with reflectance confocal microscopy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 3, p. 276–284, 2011.
- VIN CIUS, M.; OLIVEIRA, M. DE. Complexos de reparo mismatch : mecanismos e funções Mismatch repair complexes : mechanisms and functions. [s.d.].
- VUKADINOVIC, M. et al. Surgical Management of Squamous Cell Carcinoma of the Lip: Analysis of a 10-Year Experience in 223 Patients. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 65, n. 4, p. 675–679, 2007.
- WAGNER, V. P. et al. Overexpression of MutS  complex proteins predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Medicine (United States)**, v. 95, n. 22, p. 1–8, 2016.

WALDEMAR WILCZAK PERSSON, P.; MATHEWS, R. D. an us cr ip t Ac ce pt us cr ip t
Ac ce pt ed. **Review of Financial Studies**, v. 29, n. 9, p. 2341–2386, 2016.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral
Oncology**, v. 45, n. 4–5, p. 309–316, 2009.

Anexo I – Parecer do comitê de ética



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),

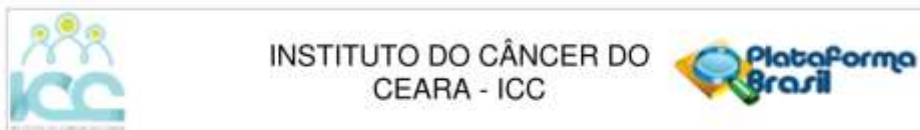
Objetivo da Pesquisa:

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



Continuação do Parecer: 2.191.839

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:

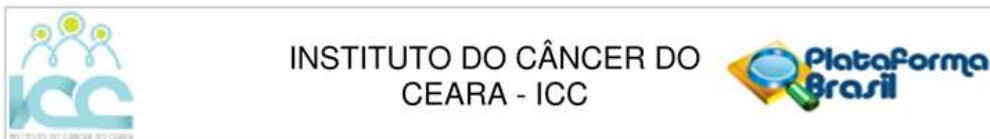
Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P ROJETO_920771.pdf	01/07/2017 21:40:26		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCompleto.pdf	01/07/2017 21:39:26	Paulo Goberlânio de Barros Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	fieldepositario.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: 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



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)3288-4653 **Fax:** (85)3228-4653 **E-mail:** eco@icc.org.br