



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

THABATA COELI DIAS DAMASCENO

**Valor prognóstico do infiltrado linfocitário tumoral e da expressão
de *PLK1* e *FOXM1* em carcinoma epidermoide oral**

VITÓRIA, ES

2022

THABATA COELI DIAS DAMASCENO

**VALOR PROGNÓSTICO DO INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL
E DA EXPRESSÃO DE *PLK1* E *FOXM1* EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr.^a Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler

VITÓRIA, ES

2022

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

C672v Coeli Dias Damasceno, Thabata, 1991-
Valor prognóstico do infiltrado linfocitário tumoral e da
expressão de PLK1 e FOXM1 em carcinoma epidermoide oral /
Thabata Coeli Dias Damasceno. - 2022.
101 f. : il.

Orientadora: Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Câncer bucal. 2. Progressão tumoral. 3. Biomarcadores. 4.
Infiltrado linfocitário tumoral. 5. Metilação. I. Lúcia Ventorin
von Zeidler, Sandra. II. Universidade Federal do Espírito Santo.
Centro de Ciências da Saúde. III. Título.

CDU: 61



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Portaria nº 609, de 14 de março de 2019

15ª ATA DE EXAME DE DEFESA DE DOUTORADO

Ata da 15ª sessão de Defesa de Tese do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, da discente **THABATA COELI DIAS DAMASCENO**, realizada às 14:00h do dia vinte e cinco de julho do ano dois mil e vinte e dois, por meio de videoconferência. A presidente da Banca, Profª. Drª. Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler apresentou os demais membros da comissão examinadora constituída pelos Doutores: Adriana Madeira Alvares da Silva, da Universidade Federal do Espírito Santo, como membro titular interno; Gabriela Tonini Peterle, da Universidade Federal do Espírito Santo, como membro titular interno; Sheila Coelho Soares Lima, do Instituto Nacional do Câncer, como membro titular externo; Elismauro Francisco de Mendonça, da Universidade Federal de Goiás, como membro titular externo, perante a qual **THABATA COELI DIAS DAMASCENO**, aluna regularmente matriculada no Curso de Doutorado em Biotecnologia, defendeu a tese intitulada “**VALOR PROGNÓSTICO DO INFILTRADO LINFOCITÁRIO TUMORAL E DA EXPRESSÃO DE PLK1 E FOXM1 EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL**”. Finda a apresentação, o(a) presidente passou a palavra aos membros da Comissão para procederem à arguição da candidata. Após a arguição, o(a) presidente convidou a Comissão para dirigir-se a uma sala reservada, para deliberação. Ao final, a Comissão retornou, e o(a) presidente informou aos presentes que a tese fora aprovada. Logo após, o(a) presidente declarou encerrada a sessão, e eu, Profa. Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler, lavrei a presente Ata, que é assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Vitória, 25 de julho de 2022.

Profª. Drª. Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler
Universidade Federal do Espírito Santo – Orientador

Profª. Drª. Adriana Madeira Alvares da Silva
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno

Profª. Drª. Gabriela Tonini Peterle
Universidade Federal do Espírito Santo – Titular Interno

Profª. Drª. Sheila Coelho Soares Lima¹
Instituto Nacional do Câncer - Titular Externo

Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça¹
Universidade Federal de Goiás - Titular Externo

¹ Em conformidade com as normas previstas na Portaria Normativa nº 08/2021 - PRPPG/UFES, a assinatura dos membros externos é representada neste documento pela assinatura do Presidente da Comissão Julgadora.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, pelo cuidado, amor e intercessão durante a minha vida.

A minha mãe Débora Soares Dias Damasceno, meu pai Walter Damasceno Júnior e meu marido Vinícius Ribeiro Lima, por todo apoio, carinho e incentivo no decorrer do trabalho.

À Prof^a. Dr^a Sandra Lúcia Ventorin von Zeidler, por todo o apoio, dedicação e orientação, sendo exemplo de mulher e cientista, fundamental no meu amadurecimento acadêmico, profissional e humano.

A família LabPatol e aos amigos do LACEN – ES pelos momentos, apoio, companheirismo e aprendizado ao longo do trabalho.

À banca examinadora por aceitar o convite e pelas contribuições.

Ao laboratório multiusuário de análises biomoleculares (LABIOM), laboratório de ultraestrutura celular Carlos Alberto Redins e ao laboratório de patologia do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) pela parceria e disponibilidade para as análises de imuno-histoquímica.

Ao Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HUCAM e do Hospital Santa Rita de Cassia (HSRC), em especial ao Dr. José Roberto Vasconcelos de Podestá, por permitirem o acompanhamento às consultas dos pacientes e por todo aprendizado.

Ao professor Hisham Mehanna diretor do Intitute of Head and Neck Studies and Education da University of Birmingham, Reino Unido pela colaboração, e à University Hospitals Coventry and Warwickshire NHS Trust, por permitir o acesso às amostras biológicas.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo.

À Fundação de amparo à pesquisa e inovação do Espírito Santo (FAPES) por fomentar a viabilizar a execução deste trabalho. O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Nível de Superior - Brasil (CAPES) – código de financiamento 001.

RESUMO

DAMASCENO, T.C.D, ZEIDLER, S.L.V. **Valor prognóstico do infiltrado linfocitário tumoral e da expressão de *PLK1* e *FOXM1* em carcinoma epidermoide oral.** 2022. 103f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFES, Espírito Santo. Brasil.

O carcinoma epidermoide oral (CEO) apresenta uma estimativa de 377.713 novos casos a cada ano do triênio 2020-2022, no mundo. Indivíduos acometidos pelo CEO exibem comportamento clínico heterogêneo e diagnóstico em estágio avançado, ocasionando um pior prognóstico. A detecção precoce da doença eleva em até 80% as taxas de sobrevivência. Com isso, a análise da dinâmica entre a resposta imunológica, por meio da análise do infiltrado linfocitário tumoral (TIL), e a progressão tumoral, avaliada pela utilização dos biomarcadores *PLK1* e *FOXM1*, podem ser ferramentas essenciais para auxiliar na detecção, recorrência e prognóstico da doença. Avaliou-se a metilação da região promotora de *PLK1* no soro, a expressão gênica de *PLK1* e *FOXM1* no tecido tumoral, e a expressão de *Plk1* no epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor como indicadores de prognóstico em pacientes com CEO. Expressão de *Plk1* foi avaliada em 109 amostras de tecido parafinizado, 21 fragmentos de tumor congelado e 30 soros (17 antes do início do tratamento e 13 após o tratamento). Os testes Qui-Quadrado e Exato de Fisher foram utilizados para instituir associação entre as variáveis estudadas com a densidade de TIL, o status de metilação e a expressão de *Plk1*; para a comparação da expressão média de *Plk1* nos segmentos estudados foi empregado o teste U de Mann-Whitney e o pós-teste de Bonferroni; a análise de variância One-Way (ANOVA) e aplicação dos testes de Dunnett e/ou Tukey foram aplicados para verificar os padrões de expressão gênica; e as curvas de sobrevidas foram avaliadas pelo modelo Kaplan-Meier. A baixa densidade de TIL foi associada com o tamanho do tumor T3/T4 ($p = 0,001$) e estágio clínico III/IV ($p = 0,011$); enquanto o TIL alto foi associado ao tamanho do tumor T1/T2 ($p = 0,001$), estágio clínico I/II ($p = 0,01$) e cirurgia como tratamento realizado ($p = 0,046$). O status de metilação de *PLK1* não mostrou associação com as variáveis analisadas. Expressão elevada de *PLK1* foi observada em 11 amostras em relação ao controle ($p < 0,0001$), assim como duas amostras tiveram uma expressão diferenciada quando em paridade às demais ($p < 0,0001$). *FOXM1* não apresentou expressão relativa no

grupo amostral. A análise da expressão de Plk1 nos segmentos exibiu correlação entre os pares epitélio adjacente e as regiões de displasia e tumor ($p < 0,001$). A alta expressão de Plk1 apresentou associação ($p < 0,001$) com as variáveis tamanho do tumor T3/4, metástase linfonodal e estadiamento III/IV. Assim como, a baixa expressão mostrou associação ($p < 0,001$) com o menor tamanho do tumor, não acometimento linfonodal e estádios iniciais. A expressão de Plk1 no tumor e a densidade de TIL não mostraram ser fatores de prognóstico quando analisadas para as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença, mas exibem estar relacionados ao desenvolvimento e progressão tumoral em CEO.

Palavras-chave: Câncer bucal. Progressão tumoral. Biomarcadores. Infiltrado linfocitário tumoral. Metilação.

**Prognostic value of tumor lymphocytic infiltrate and *PLK1* and *FOXM1*
expression in oral squamous cell carcinoma**

ABSTRACT

DAMASCENO, T.C.D, ZEIDLER, S.L.V. Prognostic value of tumor lymphocytic infiltrate and *PLK1* and *FOXM1* expression in oral squamous cell carcinoma. 2022. 103f. Thesis (Doctoral in Biotechnology) - Postgraduation Biotechnological Programme, UFES, Espírito Santo. Brazil.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) has an estimated 377,713 new cases each year in the 2020-2022 triennium worldwide. Individuals affected by OSCC exhibit heterogeneous clinical behavior and diagnosis at an advanced stage, causing a worse prognosis. Early detection of the disease increases survival rates by up to 80%. Thus, the analysis of the dynamics between the immune response, through the analysis of the tumor lymphocytic infiltrate (TIL), and the tumor progression, evaluated by the use of the biomarkers *PLK1* and *FOXM1*, can be essential tools to assist in the detection, recurrence and prognosis. of the disease. Serum *PLK1* promoter region methylation, *PLK1* and *FOXM1* gene expression in tumor tissue, and Plk1 expression in tumor adjacent epithelium, dysplasia and tumor were evaluated as prognostic indicators in patients with OSCC. Plk1 expression was evaluated in 109 paraffinized tissue samples, 21 frozen tumor fragments and 30 serum (17 before treatment initiation and 13 after treatment). The Chi-Square and Fisher's Exact tests were used to establish an association between the variables studied with TIL density, methylation status and Plk1 expression; to compare the mean expression of Plk1 in the segments studied, the Mann-Whitney U test and the Bonferroni post-test were used; One-Way analysis of variance (ANOVA) and application of Dunnett and/or Tukey tests were applied to verify patterns of gene expression; and survival curves were evaluated using the Kaplan-Meier model. Low TIL density was associated with T3/T4 tumor size ($p = 0.001$) and clinical stage III/IV ($p = 0.011$); while high TIL was associated with T1/T2 tumor size ($p = 0.001$), clinical stage I/II ($p = 0.01$) and surgery as treatment performed ($p = 0.046$). The *PLK1* methylation status showed no association with the variables analyzed. High expression of *PLK1* was observed in 11 samples in relation to the control ($p < 0.0001$), as well as two samples had a different expression when in parity to the others ($p < 0.0001$). *FOXM1* did not show

expression in the sample group. The analysis of Plk1 expression in the segments showed a correlation between the adjacent epithelium pairs and the dysplasia and tumor regions ($p < 0.001$). High Plk1 expression was associated ($p < 0.001$) with the variables T3/4 tumor size, lymph node metastasis and stage III/IV. Likewise, low expression was associated ($p < 0.001$) with smaller tumor size, no lymph node involvement and early stages. Tumor Plk1 expression and TIL density were not shown to be prognostic factors when analyzed for the overall survival and disease-free survival curves, but they did show to be related to tumor development and progression in OSCC.

Key words: Oral cancer. Tumor progression. Biomarkers. Tumor lymphocytic infiltrate. Methylation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Região gênica responsável pelo transcrito de FoxM1 e suas isoformas (FoxM1a, FoxM1b e FoxM1c). Representação do mRNA de *FOXM1* contendo os 10 éxons (azul claro e cinza). No mRNA é possível evidenciar os éxons Va (A1) e VIIa (A2) responsáveis pela diferenciação nas isoformas. FoxM1a apresenta nos domínios FKD (azul) e TAD (amarelo), respectivamente os éxons A1 e A2, com tamanho total de 801 aa. FoxM1b não contém os éxons A1 e A2, sendo formado por 748 aa. FoxM1c possui 763 aa, com a presença do éxon A1 no domínio FKD. FoxM1d apresenta na região TAD o éxon A2, com tamanho de 786 aa. Fonte: adaptado de JAISWAL; CHAKRABORTY; NAG (2014); LIAO et al. (2018a) e (KLINHOM-ON et al., 2021).28

Figura 2 Atuação de FoxM1 no ciclo celular. A partir da fosforilação e ligação do complexo Cdk1/Ciclina B/FoxM1 à proteína coativadora CBP ocorre a transcrição de proteínas e ativação de vias que regulam a progressão de G2/M, como a Polo like cinase 1 (Plk1), CENP-F, fosfatase Cdc25B, Aurora B cinase e ciclina B. Plk1 promove a fosforilação de ciclina B no início da fase G2, o leva a sua migração para o núcleo e promoção à fase M. Além de ser responsável por facilitar a saída mitótica através do estímulo indireto ao complexo Cdc20-APC/C, permitindo a degradação do complexo Cdk1/ciclina B. A proteína Aurora B cinase transcrita proporciona a regulação da localização de outras proteínas de ponto de verificação de montagem do fuso e posição do cinetocoro, como BubR1, Mad1, Mad2 e CENP-F sendo importantes na citocinese e na segregação dos cromossomos. Fonte: Adaptado de Macmillan Publishers Limited, part Nature (2016).....30

Figura 3 Funções de Plk no ciclo celular. Nos processos do ciclo celular têm-se a participação das Plk1-4, na duplicação dos centríolos (Plk2 e Plk4); na replicação do DNA (Plk3); na separação e maturação do centrossoma (Plk1); na entrada da fase de mitose (Plk1); na formação do fuso, na segregação dos cromossomos e na citocinese (Plk1). No entanto, a Plk2 e Plk5 (e, provavelmente, Plk3) estão relacionadas com funções não-proliferativas, por exemplo, na diferenciação neuronal (Plk2 e Plk5) e homeostase sináptica (Plk2). DDR (resposta a danos ao DNA); SAC

(ponto de checagem de montagem do fuso). Fonte: Adaptado de Cárcer et al. (2011).....32

Figura 4 Estrutura da proteína em humanos dos domínios da família Plk. Comprimento dos aminoácidos (aa) mostrados à direita, e as posições dos domínios cinase (vermelho) e polo-box 1 e 2 (azul). Localização nuclear (NLS) das sequências indicados em verde, e o do domínio D-box (ou PBing) indicado em amarelo. Os resíduos que são críticos para a ligação de ATP e ativação enzimática (t-circular) dentro dos domínios de cinase e fosfo-seletividade dentro das polo-boxes são indicados. Fonte: Adaptado de Macmillan Publishers Ltd (2006).....33

Figura 5 Plk1 na progressão do ciclo celular. Diagrama esquemático da representação de algumas vias em que Plk1 atua como regulador de etapas ao longo da progressão mitótica. Interações ativadoras, demonstradas na caixa de texto rosada e as interações inibitórias na caixa azul. Fonte: Adaptado de Cárcer et al. (2011).....35

Figura 6 Ativação de Plk1. Representação esquemática da ativação de Plk1, por meio da fosforilação de Aurora A/Bora, com posterior ativação de Cdc25c promovendo a fosforilação do complexo Cdk1/Ciclina B e, assim, a progressão do ciclo celular. Fonte: Adaptado de Jacek Z. Kubiak (2011).36

Figura 7 Fluxograma ilustrando a origem dos espécimes clínicos coletados. A partir de 118 pacientes com diagnóstico conclusivo de CEO foram obtidos 109 blocos parafinizados, provenientes do Brasil (57) e Reino Unido (52), 21 fragmentos tumorais, 30 amostras de soro e cinco amostras de plasma de indivíduos do Brasil. Com base nas 30 amostras de soro e seis de plasma, o grupo foi subdividido em três grupos: três indivíduos saudáveis (controles) com amostras de soro e plasma; 17 indivíduos com amostras de soro antes do início do tratamento inicial com suas respectivas amostras dos acompanhamentos (F1 e/ou F2) após a conclusão do tratamento inicial (13 amostras); e cinco pacientes com amostras plasma antes do início do tratamento.....39

Figura 8 Fluxograma do acompanhamento clínico dos 118 pacientes com CEO. A partir do laudo da biópsia o diagnóstico clínico e o tratamento do paciente são definidos pelo médico. O acompanhamento inicial (1º seguimento – F1) acontece

após um intervalo de tempo entre 6 e 18 meses da data do diagnóstico clínico, seguido pelo 2º seguimento (F2) que compreende 6 meses após o 1º seguimento. Após 30 e 60 meses do diagnóstico clínico, os pacientes permanecem em acompanhamento, encerrando com 5 anos. No 1º e 2º seguimentos são coletadas amostras de sangue do paciente, e em todos os acompanhamentos informações clínicas.50

Figura 9 Expressão nuclear de Plk1 na progressão tumoral em CEO. Imunomarcação fraca em epitélio adjacente ao tumor (A), imunomarcação forte no tecido displásico (B), tecido tumoral com intensidade forte (C) e fraca (D), controle positivo com adenocarcinoma de cólon humano (E) e controle negativo (F). Magnificações originais de 400x.53

Figura 10 Quantitativo de amostras analisadas para a expressão de Plk1 nas diferentes regiões. O número total de pacientes analisados foram 109, apresentando 24 indivíduos com amostras nos três segmentos (epitélio adjacente ao tumor e displasia e tumor), 26 indivíduos com amostras nos segmentos epitélio adjacente ao tumor e displasia, 39 indivíduos com amostras nos segmentos epitélio adjacente ao tumor e tumor, e 51 indivíduos com amostras nos segmentos displasia e tumor.54

Figura 11 Expressão Relativa de *PLK1* em carcinoma epidermoide oral. * diferem significativamente do controle através do teste de Dunnett ($p < 0,0001$). # diferem significativamente da amostra 230 através do teste de Tukey ($p < 0,0001$). ° diferem significativamente da amostra 317 através do teste de Tukey ($p < 0,0001$) Aplicação de ANOVA seguida do teste de Dunnett ou Tukey nas análises estatísticas. Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), usando o gene constitutivamente expresso β -actina como controle endógeno. As reações de RT-qPCR foram preparadas em triplicata e os resultados sendo demonstrados como média \pm desvio padrão.....57

Figura 12 Status da metilação do DNA na região promotora de *PLK1*. Representação dos pacientes que apresentaram amplificação do gene alvo nas regiões do DNA metiladas (1), não-metiladas (2) e em ambas as regiões (3) em amostras de soro, assim como o gene endógeno (0), nas coletas de material ocorridas no momento do diagnóstico, 1º seguimento (F1) e 2º seguimento (F2) dos

acompanhamentos e os controles de reação metilado e apenas modificado por bissulfito. As amostras que apresentaram amplificação nas regiões foram: metilada - diagnóstico (455); F1 (402); F2 (432 e 754); não-metilada - diagnóstico (401 e 658); F1 (370 e 455); e ambas as regiões - diagnóstico (182, 402 e 577).59

Figura 13 Curva de sobrevida global (SG) pelo método Kaplan-Meier e log-rank. (A) SG em relação ao tamanho do tumor primário ($p < 0,001$). (B) SG em relação estadiamento ($p = 0,001$).61

Figura 14 Curva de sobrevida livre de doença (SLD) pelo método Kaplan-Meier e log-rank. (A) SLD em relação ao tamanho do tumor primário ($p = 0,022$). (B) SLD em relação ao acometimento linfonodal ($p = 0,013$). (C) SLD em relação ao estadiamento ($p = 0,019$).62

Figura 15 Curva de SG e SLD pelo método Kaplan-Meier e log-rank. (A) SG em relação à expressão de Plk1 na superfície tumoral ($p = 0,112$). (B) SLD em relação à expressão de Plk1 na superfície tumoral ($p = 0,717$).63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Oligonucleotídeos iniciadores usados para a amplificação dos genes <i>FOXM1</i> , <i>PLK1</i> e <i>Beta-actina</i>	45
Tabela 2 Oligonucleotídeos iniciadores e sondas selecionados para o ensaio <i>MethyLight</i>	49
Tabela 3 Características clínico-patológicas dos indivíduos com CEO (n=118).	52
Tabela 4 Perfil de expressão da proteína Plk1 entre os pares epitélio adjacente ao tumor, displasia e CEO (n=109).	55
Tabela 5 Análise da expressão de Plk1 no tumor e sua associação com as variáveis clínicas e fatores de risco (n=94).	56
Tabela 6 Características clínico-patológicas dos indivíduos com amostras de soro no momento do diagnóstico (n=6) de CEO e o status de metilação do DNA da região promotora de <i>PLK1</i>	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFECC	Associação Feminina de Educação e Combate ao Câncer (Hospital Santa Rita de Cássia)
AJCC	Comitê Americano de Câncer (do inglês <i>American Joint Committee on Cancer</i>)
B2M	Beta-2-microglobulina
CEO	Carcinoma epidermoide oral
CENPF	Proteína F do centrômero
CTC	Célula tumoral circulante
ctDNA	DNA tumoral circulante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
DOI	Profundidade de invasão (do inglês <i>depth of invasion</i>)
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EEN	Extensão extranodal
FFPE	Fixado em formalina e embebido em parafina (do inglês <i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>)
FOXM1	<i>Forkhead box M1</i>
FKH	Domínio hélice alada (do inglês <i>fork head</i>)
HUCAM	Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes
IHQ	Imuno-histoquímica
LVI	Invasão linfática e vascular (do inglês <i>lymphovascular invasion</i>)

NK	Células natural killer
NRD	Domínio repressor N-terminal
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>PLK1</i>	Cinase polo-like 1
PNI	Invasão perineural
POI	Padrão de invasão
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RPS8	Proteína ribossomal S8 (do inglês <i>ribosomal protein S8</i>)
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase após Transcrição Reversa (do inglês <i>Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
SAM	S-metil adenosina
SG	Sobrevida global
SLD	Sobrevida livre de doença
TAD	Domínio de transativação
TIL	Linfócitos Infiltrantes tumorais
TMA	Microarrays de tecidos

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 EPIDEMIOLOGIA	20
2.2 LINFÓCITOS INFILTRANTES TUMORAIS (TIL)	21
2.3 METILAÇÃO	24
2.4 DNA TUMORAL CIRCULANTE (ctDNA)	25
2.5 <i>Forkhead box M1 (FOXM1)</i>	27
2.6 <i>Cinase polo-like 1 (PLK1)</i>	31
3 OBJETIVOS	37
3.1 OBJETIVO GERAL	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Casuística	38
4.2 Análise Histopatológica	40
4.3 Tissue microarray	41
4.4 Validação TMA	42
4.5 Imuno-histoquímica	42
4.6 Extração de RNA	43
4.7 Obtenção cDNA	44
4.8 <i>Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)</i>	44
4.9 Obtenção e extração do DNA tumoral circulante (ctDNA)	46
4.10 Metilação <i>in vitro</i> de DNA	47
4.11 Tratamento com Bissulfito	47
4.12 <i>MethyLight</i>	48

4.13 Análise de sobrevida	49
4.14 Análise estatística	50
5 RESULTADOS	51
5.1 Imuno-histoquímica	52
5.2 RT-qPCR.....	57
5.3 <i>MethyLight</i>	58
6 DISCUSSÃO	64
6.1 Manuscrito 1 – Tumor-infiltrating lymphocytes are related to early-stage oral squamous cell carcinoma	67
7 CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
ANEXO.....	97

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide oral (CEO) é o principal tipo histológico encontrado em tumores da cavidade oral, com estimativa de 377.713 novos casos, no mundo, para cada ano do triênio 2020-2022 (SUNG et al., 2021).

Pacientes com diagnóstico avançado de CEO apresentam desenvolvimento clínico complexo e pior prognóstico, com a sobrevida média em 50% no intervalo de 5 anos. A delimitação atual da conduta terapêutica a ser estabelecida baseia-se na análise do sítio anatômico acometido, estadiamento clínico, parâmetros histopatológicos e gradação tumoral (AMIN et al., 2017; EL-NAGGAR et al., 2017; FARNEBO et al., 2013; HSU et al., 2014).

Nota-se que indivíduos com diagnóstico em estádios iniciais são capazes de apresentar maiores chances de responder a doença, e assim aumentar a taxa de sobrevivência (BRENER et al., 2007). Assim, parâmetros mais aplicáveis à rotina clínica precisam ser investigados a fim de estratificar os pacientes para a melhor escolha do tratamento e fornecer maiores informações prognósticas aos indivíduos com CEO.

Dessa forma, a regulação da resposta imune celular no microambiente tumoral realizado pelos linfócitos Infiltrantes tumorais (TILs) demonstrou contribuir na inibição e/ou promoção da progressão tumoral (MITTAL et al., 2015). Para avaliar a dinâmica entre a resposta imunológica e o tumor, trabalhos analisando TILs sugeriram melhor sobrevida quando há níveis elevados de TIL, no entanto, seu valor prognóstico ainda não foi bem estabelecido (BALERMPAS et al., 2014; LEI et al., 2017; NGUYEN et al., 2016). Acredita-se que os TILs forneçam melhor valor preditivo em comparação com o estadiamento clínico TNM e outras características histopatológicas conhecidas, como a gradação tumoral (RAJJOUR et al., 2007).

Contudo, o CEO apresenta desenvolvimento variado, multifatorial e contínuo, sofrendo interferências de fatores endógenos (mutações) e exógenos (álcool e tabaco, principalmente) ao organismo, que permitem alterações genéticas e epigenéticas no microambiente tumoral, iniciando a carcinogênese (IRIMIE et al., 2015; LEMOS JUNIOR et al., 2013; RUSSO et al., 2018).

Alterações epigenéticas, como a metilação, foram observadas em genes associados à progressão tumoral em CEO (CASTILHO, 2017). A identificação destas variações pode ser observada através da análise do DNA tumoral circulante (ctDNA), proveniente dos processos de apoptose e necrose tumoral, o qual pode ser encontrado no plasma e soro do paciente, e podem apresentar informações acerca da neoplasia. Assim, a detecção de modificações em genes envolvidos na progressão tumoral pode ser útil para a identificação de biomarcadores tumorais que auxiliem na detecção e recorrência precoce da neoplasia (IRIMIE et al., 2015).

Dentre os genes envolvidos na progressão tumoral, os genes *FOXM1* e *PLK1* se destacam por serem responsáveis pela fosforilação e regulação de proteínas ligadas à ativação de diversas vias celulares que permitem a progressão do ciclo celular. Em condições normais esses genes expressam as proteínas FoxM1 e Plk1, que estão limitadas a células em proliferação. A desregulação dessas proteínas provoca deficiência na formação dos fusos, desalinhamento dos cromossomos, defeito na citocinese e falha na verificação do checkpoint do fuso mitótico. Essas modificações acarretam a formação de células defeituosas promovendo a progressão tumoral (UMAIR et al., 2015), além da superexpressão estar associada ao pior prognóstico da doença em CEO (BACH et al., 2018; COLICINO; HEHNLY, 2018; LI, Weizhe et al., 2019; LIAO et al., 2018a). Visto isso, é necessário a compreensão do papel de TIL, *FOXM1* e *PLK1* na progressão tumoral e a avaliação da aplicabilidade como biomarcadores de prognóstico em CEO.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EPIDEMIOLOGIA

O câncer é a principal doença crônica não-transmissível que apresenta número crescente anual de novos casos e mortes no mundo. Dentre os diversos tipos estima-se que para cada ano do triênio 2020-2022, para o câncer de cavidade oral, a ocorrência de 377.713 novos casos, de ambos os gêneros, com 177.757 óbitos mundialmente (SUNG et al., 2021).

O carcinoma epidermoide oral tem origem no epitélio de revestimento da mucosa oral, sendo o tipo histológico predominante neste sítio, correspondendo a cerca de 95% dos casos (BRENER et al., 2007; GUPTA; METGUD, 2013). Estes tumores acometem principalmente a língua e soalho de boca, mas podem se desenvolver também em outros sítios anatômicos como a gengiva, mucosas jugal e vestibular, área retromolar e palato duro (DORSEY; AGULNIK, 2013; FERLAY et al., 2015; NOGUTI et al., 2012; SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND, 2011; SOUTO et al., 2014).

Indivíduos com CEO apresentam comportamento clínico heterogêneo e pior prognóstico quando diagnosticados nos estádios avançados da doença, o que leva a tratamentos mais debilitantes com custos elevados, quando comparados àqueles diagnosticados em estágios iniciais. Nas últimas décadas, a sobrevida média dos pacientes com estes tumores não apresentou aumento significativo, mesmo com novas abordagens terapêuticas e avanços nas técnicas cirúrgicas. Assim, a taxa de sobrevida da doença, em um período de 5 anos, tem permanecido em torno de 50% (FARNEBO et al., 2013; HSU et al., 2014). A detecção do CEO em estágios iniciais é capaz de aumentar em até 80% a sobrevida média dos pacientes (BRENER et al., 2007).

Os critérios utilizados para definir a conduta terapêutica de primeira linha a ser instituída em indivíduos com CEO estão baseados no sítio anatômico, estadiamento

clínico no momento do diagnóstico e tipo histológico do tumor (FARNEBO et al., 2013; HSU et al., 2014).

A *American Joint Committee on Cancer* (AJCC 8th edition) propõem para a avaliação, diagnóstico e tratamento o sistema de classificação para o Estadiamento de Tumores Malignos - TNM, enquanto a OMS utiliza os parâmetros histopatológicos e gradação tumoral como determinantes de prognóstico (AMIN et al., 2017; EL-NAGGAR et al., 2017).

A análise das características do tumor para a classificação do estadiamento baseia-se no subsítio do tumor primário, relacionando-o ao tamanho tumoral (T0 a T4), comprometimento da cadeia linfática associada à drenagem do sítio primário (N0 a N3) e metástase à distância (M0 a M1). Estes parâmetros refletem a taxa de crescimento e a extensão da neoplasia (PATEL; SHAH, 2005).

Para análise de prognóstico são considerados, além do estadiamento clínico, a avaliação histopatológica das margens após excisão cirúrgica, a presença de invasão perineural, padrão de invasão tumoral, profundidade de invasão e extensão extranodal (EEN) nos linfonodos cervicais acometidos. Com o tratamento do tumor primário e das metástases regionais, é possível observar o aumento da sobrevida em mais da metade dos casos (AMIN et al., 2017). Porém, são comuns as recidivas e a resistência aos tratamentos radio e quimioterápicos (ANATÔMICAS, 2001).

2.2 LINFÓCITOS INFILTRANTES TUMORAIS (TIL)

A neoplasia apresenta um microambiente tumoral intricado e variado, sendo composto por fibroblastos, estroma e células do sistema imunológico (HORI et al., 2021). A infiltração de células do sistema imunológico é uma característica patológica representativa desse tumor constituindo-se como componente integral da lesão devido à sua proximidade com o anel linfático de Waldeyer, responsável pela primeira linha de defesa imunológica do sistema aero digestivo (LEI et al., 2017). A regulação da resposta imune neste microambiente é realizada principalmente pela família dos linfócitos infiltrantes tumorais (TILs - células T CD4+, CD8+ e reguladores), como também por macrófagos (macrófagos M1 e M2), células natural

killer (NK) e linfócitos B que podem atuar na inibição ou promoção da progressão tumoral (MOREIRA et al., 2010; PALUCKA; COUSSENS, 2016).

A atuação do sistema imunológico na modulação da carcinogênese é denominada de imunoedição, em que o sistema imune exerce uma seleção a partir do reconhecimento de antígenos tumorais por células T levando à eliminação ou delimitação do câncer, representado por três fases: eliminação, equilíbrio e escape. Inicialmente, tanto alterações no microambiente tumoral como as células neoplásicas induzem ligantes que aumentam o reconhecimento imunológico, o que pode levar ao processo de eliminação da neoplasia, ou resultar em um equilíbrio entre o sistema imune e os elementos neoplásicos restantes. Na fase de equilíbrio, as células tumorais, que foram capazes de evadir à eliminação, e o sistema imune atingem certa estabilidade dinâmica, em que o TIL exerce uma pressão seletiva sobre as células neoplásicas contendo-as, porém, sem conseguir destruí-las completamente. Dentre as três fases, estima-se que essa apresente maior duração sendo capaz de perdurar por anos. O prolongamento desse estado permite a evolução dos mecanismos de escape, onde ocorre a seleção de subclones neoplásicos com menor imunogenicidade, com regulação negativa ou perda de expressão de antígenos tumorais, regulação positiva da resistência contra a neoplasia levando ao aumento da expressão de genes pró-sobrevivência e ao desenvolvimento de um microambiente tumoral imunossupressor, estabelecendo assim uma condição de tolerância imunológica central e periférica que irá promover a progressão tumoral (MITTAL et al., 2015; SILVA et al., 2021).

Visto a importância do estudo da dinâmica entre o sistema imunológico e o câncer, trabalhos vêm empregando TIL como potencial marcador prognóstico por sugerir melhor sobrevida na presença de densidades elevadas de TIL, como observado em tumores sólidos, incluindo carcinomas de pulmão, gastrointestinal, geniturinário, ginecológico e cabeça e pescoço (HENDRY et al., 2017). Estudos mostram que o TIL tem um valor preditivo melhor em comparação a algumas características histopatológicas conhecidas, como o grau do tumor, auxiliando o estadiamento TNM convencional. No entanto, carecem melhores evidências sobre o real valor prognóstico da magnitude de TIL em CEO, e nenhum consenso foi alcançado até o momento sobre sua aplicação (MITTAL et al., 2015).

A carcinogênese dos tumores da cavidade oral é um processo complexo, multifatorial e contínuo, em que o epitélio escamoso de revestimento é afetado por fatores endógenos e exógenos ao organismo. Os principais fatores de risco associados a doença são o uso de tabaco e consumo de bebidas alcóolicas, que apresentam efeito sinérgico (IRIMIE et al., 2015).

O tabaco apresenta mais de 7000 substâncias tóxicas, tendo uma parte delas efeito carcinogênico. No organismo, as substâncias carcinogênicas são convertidas em metabólitos reativos, sendo muitos deles enzimas oxidativas, capazes de interagir com o material genético promovendo modificações. O cigarro sozinho é responsável por cerca de 42% dos óbitos e uma maior probabilidade de desenvolvimento de tumores neste sítio anatômico (MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2017; RUSSO et al., 2018; SINGH, Sandeep; PILLAI; CHELLAPPAN, 2011).

O consumo de bebidas alcóolicas pode exercer efeitos locais e sistêmicos, os quais podem estar relacionados ao desenvolvimento do CEO. Localmente modificam a permeabilidade da mucosa, dificultando a organização da barreira pelas células epiteliais responsáveis por evitar a desidratação e penetração de agentes externos. Assim, o álcool atua como um solvente para o ingresso das substâncias carcinogênicas e tóxicas provenientes do tabaco. Além de provocar danos celulares indiretos pela ação do acetaldeído nos tecidos-alvos e hipossalivação, provocando o aumento da exposição aos agentes carcinógenos de ação local. Sistemicamente o etanol reduz a atividade metabólica hepática de primeira passagem das substâncias tóxicas, podendo ocasionar supressão imunológica e deficiências nutricionais, além de potencializar em até 30 vezes o risco da doença (GALBIATTI et al., 2013; MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2017; RUSSO et al., 2018).

Além do tabagismo e etilismo, outros fatores têm sido citados como possíveis envolvidos na progressão do CEO, interferindo diretamente no microambiente celular, como as infecções virais, fatores ocupacionais, deficiências nutricionais, condições precárias de higiene bucal, condição socioeconômica, alterações genéticas e epigenéticas, que podem, ao longo do tempo, promover uma combinação que desencadeará a progressão tumoral (ALVES et al., 2013; CHUANG et al., 2012; LEMOS JUNIOR et al., 2013).

Alterações no microambiente celular desempenham importante função na iniciação e progressão da tumorigênese. As transformações aberrantes são capazes de gerar um estresse oxidativo local originado pela formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e uma condição de hipóxia (baixa concentração de oxigênio) o que torna este microambiente propício à progressão tumoral, possibilitando a ação de genes modificados induzidos epigeneticamente em diversos tipos de tumores (LING et al., 2012).

2.3 METILAÇÃO

Os mecanismos epigenéticos fazem parte no processo do desenvolvimento embrionário com funções na plasticidade e dinâmica celular, acompanhando o indivíduo ao longo da vida, sendo um sistema com potencial reversível. Os eventos epigenéticos ocorrem a partir de três processos básicos: modificação de histonas, atuação de RNAs não codificantes e metilação do DNA (BISWAS; RAO; RAO, 2017; STRICKER; KÖFERLE; BECK, 2016). Estas alterações, que podem ser herdadas ou decorrentes da exposição aos fatores ambientais, ocorrem em proto-oncogenes, genes supressores tumorais e nos genes de reparo ao DNA, culminando assim, na modificação dos mecanismos de expressão gênica, crescimento desordenado e desenvolvimento do potencial invasivo das células modificadas (ALVES et al., 2013; KARASIK; NEWMAN, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA, 2014).

A metilação do DNA é o principal mecanismo epigenético em mamíferos responsável pela repressão e ativação de genes, a partir da adição covalente de um grupamento metil doado pela S-metil adenosina (SAM) ao carbono 5' da base citosina, por uma família de enzimas conhecidas como DNA metiltransferases (DNMTs), predominantemente em regiões promotoras ricas em dinucleotídeos de citosina-fosfato-guanina (ilhas CpG). As regiões promotoras apresentam cerca de 60% de ilhas CpGs não metiladas o que favorece a expressão gênica. Entretanto, quando a metilação encontra-se presente em mais de 20% destas regiões promotoras, estas são consideradas hipermetiladas. Esse estado metilado do DNA contribui para o recrutamento de proteínas ligantes da metilação (methyl-CpG binding domain/MBD), modificando a estrutura da cromatina e permitindo a repressão da transcrição gênica (BORGES et al., 2010; PORTELA; ESTELLER, 2010). A manutenção do padrão de

metilação do DNA ocasionado por DNMT1 promove a recuperação do perfil de metilação herdado da fita molde (progenitores), o que permite a promoção do status de metilação à prole. A inserção de metilações *de novo* no DNA em regiões previamente não metiladas é realizada pela DNMT3a e DNMT3b, possibilitando uma superfície de ancoragem para proteínas de ligação metil que influenciam na dinâmica da cromatina. Assim, essas alterações desencadeiam efeitos em diversos processos, como na transcrição de genes, reparo do DNA, modulação na estrutura da cromatina e estabilidade do genoma, sendo importantes na regulação e empacotamento de informações genéticas em condições normais (CASTILHO, 2017; ROBERTSON, 2001).

A metilação anormal consiste na hipometilação global do DNA e na hipermetilação de regiões promotoras, estando relacionadas ao desenvolvimento de alguns tumores. A hipermetilação das regiões promotoras de ilhas CpG leva ao silenciamento de genes supressores de tumor. Já a hipometilação tem por alvo sequências genômicas que estão associadas ao aumento da expressão de proto-oncogenes, instabilidade genômica e a progressão tumoral. A alteração do perfil de metilação do DNA em genes relacionados tanto à progressão quanto à supressão do ciclo celular tem sido observada em muitos tumores, inclusive no carcinoma epidermoide oral (CASTILHO, 2017; GAŹDZICKA; GOŁĄBEK; KATARZYNA, 2019; UMAIR et al., 2015).

2.4 DNA TUMORAL CIRCULANTE (ctDNA)

A detecção de alterações genéticas e epigenéticas específicas do tumor vêm ganhando força por sua capacidade de ser empregada como potenciais marcadores tumoral. É notório o aumento no número de trabalhos que fazem uso de marcadores tumorais, como DNA tumoral circulante (ctDNA) presentes no plasma e soro humano, para auxiliar a detecção de diversos tipos de câncer e sua recorrência, bem como monitorar a resposta ao tratamento (SCHMIDT et al., 2016). Por estarem circulantes, estas moléculas podem ser facilmente obtidas por venipunção, um procedimento minimamente invasivo. Este procedimento tem funcionado como “biópsia líquida”, permitindo analisar fragmentos de ctDNA encontrados no sangue periférico (plasma/soro), provenientes do processo de apoptose e necrose de células

tumorais, lise de células tumorais circulantes e secreção ativa espontânea de DNA pelo tumor. Assim, seria possível detectar alterações genéticas específicas do tumor bem como quantificar a concentração do ctDNA absoluto em pacientes com câncer. No entanto, esta técnica ainda apresenta limitações, como o tamanho do ctDNA, menos que 160 pb, sua meia-vida de 2 horas quando eliminado na circulação sanguínea e sua concentração no plasma/soro, que podem ser muito baixas, dificultando sua detecção (GINKEL et al., 2017; SCHMIDT et al., 2016; TOMITA et al., 2007).

Inicialmente, os estudos tiveram como foco a análise da quantificação das concentrações de células tumorais circulantes (CTCs) na circulação sanguínea para utilização clínica, por apresentar níveis mais elevados em pacientes com câncer (~180 ng/mL) e doença residual quando comparado a indivíduos saudáveis (~30 ng/mL). Observou-se que no processo de metástase é possível fazer a quantificação e avaliação das CTCs, permitindo uma melhor compreensão dos mecanismos da doença e monitoramento da resposta terapêutica. No entanto, a utilização apenas da quantificação de CTCs para diagnóstico não mostrou ser útil sem a informação do perfil tumoral (ARANTES et al., 2017; HEITZER; ULZ; GEIGL, 2015).

A partir da caracterização das alterações genéticas provenientes do tumor primário, é possível a análise do ctDNA do plasma/soro coletado do paciente em diferentes períodos no decorrer do acompanhamento clínico após a conclusão do tratamento (quimioterapia, radioterapia ou ressecção primária do tumor). Trabalhos evidenciam a importância do ctDNA e sua alta associação com alterações epigenéticas em neoplasias hematológicas, auxiliando no rastreo e monitoramento do câncer. Além de sua possível utilização clínica como um biomarcador, o que fornece elevada sensibilidade e especificidade para detecção da doença, refletindo diretamente a carga tumoral e a dinâmica genética em diversos tipos de câncer (ARANTES et al., 2017; GINKEL et al., 2017; HEITZER et al., 2017; SCHMIDT et al., 2016; TOMITA et al., 2007; VAN GINKEL et al., 2017).

Em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, ctDNA demonstrou ser um possível biomarcador de diagnóstico, a partir da utilização de amostras de sangue e saliva, na identificação de mutações somáticas. Assim como, fornece informações acerca da presença de doença residual ou aparecimento de populações subclonais

resistentes, podendo ser um provável marcador de prognóstico e persistência da doença. A partir dos tumores primários ou através da seleção terapêutica surgem populações subclonais e seu desenvolvimento pode ser resultado de metástases ou recorrente, exibindo diferenças epigenéticas e características fenotípicas quando comparados ao tumor primário (GINKEL et al., 2017; HEITZER et al., 2017; SCHMIDT et al., 2016; TOMITA et al., 2007; VAN GINKEL et al., 2017).

Estudos que utilizam técnicas moleculares na detecção precoce de alterações proteicas e em fatores envolvidos na regulação do ciclo celular estão se destacando, a fim de auxiliar a implementação de abordagens terapêuticas específicas e individualizadas, bem como na construção de painéis de biomarcadores de prognóstico e biópsias líquidas direcionadas à determinados genes e proteínas (IRIMIE et al., 2015). Dentre os genes envolvidos na progressão tumoral, neste trabalho abordaremos a atuação e importância de *FOXM1* e *PLK1* em CEO.

2.5 Forkhead box M1 (*FOXM1*)

O gene *FOXM1* (*forkhead box M1*) é composto por 10 éxons no cromossomo 12p13.33, e apresenta as isoformas FoxM1a, -b, -c e -D provenientes do splicing alternativo localizados nos éxons Va (A1) e VIIa (A2) (Figura 1). As isoformas FoxM1a e -d apresentam localização citoplasmática tendo o éxon VIIa no terminal C do seu domínio de transativação, que atua como um inibidor tornando-as transcricionalmente inativas. As variantes, também, podem funcionar como um regulador negativo dominante para as outras isoformas, por conter um domínio funcional de ligação ao DNA. As isoformas FoxM1b, que não possui os éxons (A1 e A2), e FoxM1c que contém apenas o éxon Va, são capazes de promover diretamente a expressão do gene alvo de maneira específica, por serem transcricionalmente ativas com localização predominante nuclear (JAISWAL; CHAKRABORTY; NAG, 2014; KLINHOM-ON et al., 2021; KOO; MUIR; LAM, 2012). Nas regiões promotoras centrais são encontradas diversos elementos regulatórios clássicos (E-boxes e elementos de ação cis) que podem atuar em resposta a outros fatores de transcrição. A maior parte dos locais de ligação à esses elementos com ativação cis, encontra-se na região adjacente ao início da transcrição de *FOXM1*,

porém sem apresentar os mesmos mecanismos básicos de ativação (LIAO et al., 2018a).

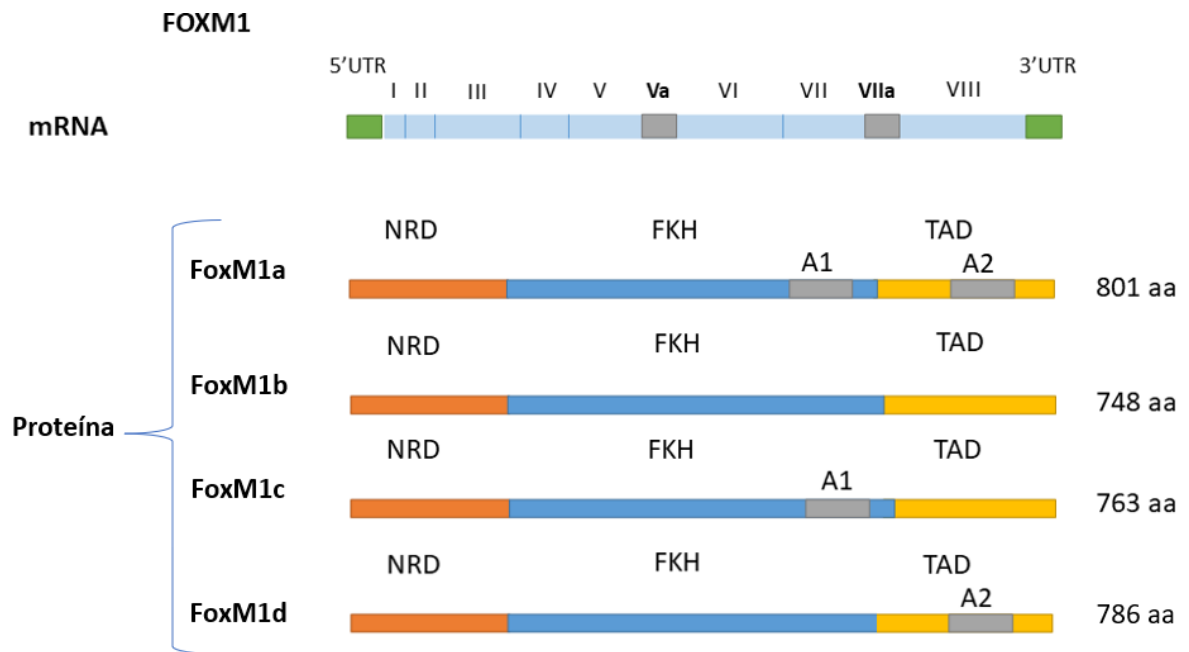


Figura 1 Região gênica responsável pelo transcrito de FoxM1 e suas isoformas (FoxM1a, FoxM1b e FoxM1c). Representação do mRNA de *FOXM1* contendo os 10 éxons (azul claro e cinza). No mRNA é possível evidenciar os éxons Va (A1) e VIIa (A2) responsáveis pela diferenciação nas isoformas. FoxM1a apresenta nos domínios FKD (azul) e TAD (amarelo), respectivamente os éxons A1 e A2, com tamanho total de 801 aa. FoxM1b não contém os éxons A1 e A2, sendo formado por 748 aa. FoxM1c possui 763 aa, com a presença do éxon A1 no domínio FKD. FoxM1d apresenta na região TAD o éxon A2, com tamanho de 786 aa. Fonte: adaptado de JAISWAL; CHAKRABORTY; NAG (2014); LIAO et al. (2018a) e (KLINHOM-ON et al., 2021).

A proteína FoxM1 é codificada pelo gene *FOXM1*, pertencente à família de fatores de transcrição Forkhead box (fox) que partilham um domínio “hélice alada” ou fork head (FKH) evolutivamente conservado de ligação ao DNA. FoxM1 é um importante regulador na progressão do ciclo celular apresentando expressão variada ao longo do processo, presente na transição de G1/S, G2/M e na fase M (KOO; MUIR; LAM, 2012). A expressão da proteína, em condições normais, é limitada às células em proliferação, como células progenitoras e tecidos em regeneração, estando ausente em células indiferenciadas (KOO; MUIR; LAM, 2012; YU, Chao et al., 2015). A proteína contém três domínios principais sendo sua regulação realizada por dinâmicas modificações pós-traducionais (fosforilação e ubiquitinação) com

feedback positivo, mediada por cinases e fosfatases de neutralização. As modificações são responsáveis pela localização celular, estabilidade proteica e atividade transcricional da proteína em condições normais e alteradas (LV et al., 2016).

O domínio FKH é responsável pela transativação (domínio TAD), no auxílio da atividade de ligação ao DNA sendo bem conservado em todas as proteínas forkhead box, e tendo NRD (domínio repressor N-terminal) função na atividade autoregulatória de FoxM1 (JAISWAL; CHAKRABORTY; NAG, 2014). Assim, a fosforilação da proteína muda ao longo do crescimento e desenvolvimento celular, sendo responsável pela regulação da expressão de Cdc25B, ciclina B, Aurora B cinase, cinase polo-like 1 (Plk1) e proteína F do centrômero (CENPF), participantes na transição G2/M, manutenção da estabilidade e segregação cromossômica adequada durante a mitose (Figura 2). A maximização do potencial da atividade transcricional de FoxM1 é dependente de sua localização nuclear, do nível proteico e da exibição do TAD (JAISWAL; CHAKRABORTY; NAG, 2014; LIAO et al., 2018a).

Na fase G1 tardia, os complexos de ciclina D - cdk4/6 fosforilam diversas regiões de FoxM1, possibilitando a transição da fase G1 para S. A proteína, em G1/S, apresenta o status hipofosforilada devido a sua localização citoplasmática e ao domínio NRD estar inibindo o domínio TAD, enquanto o mRNA de FoxM1 encontra-se elevado. Ao longo do ciclo celular, na fase S e na transição G2/M, ocorre a translocação nuclear de FoxM1 por meio de sua fosforilação pela transcrição da cinase polo like 1 (Plk1) via Raf/MEK/MAPK, o que leva ao aumento da expressão, estando hiperfosforilada na fase M. Na fase G2 a atividade de transativação do TAD é restaurada, a inibição da região por NRD é atenuada pelo complexo ciclina A/E - cdk2 que promove a fosforilação de FoxM1. Assim como, a fosforilação de ciclina B1 - cdk1 que recruta Plk1, e CBP (proteína de ligação do co-ativador transcricional p300/CREB) que promovem a atividade transcricional da proteína. FoxM1 fosforilado, também, desempenha importante função no segundo checkpoint do ciclo celular, possibilitando maior estabilidade da proteína. Ao final da fase M ocorre a desfosforilação de FoxM1 (JAISWAL; CHAKRABORTY; NAG, 2014; LIAO et al., 2018a).

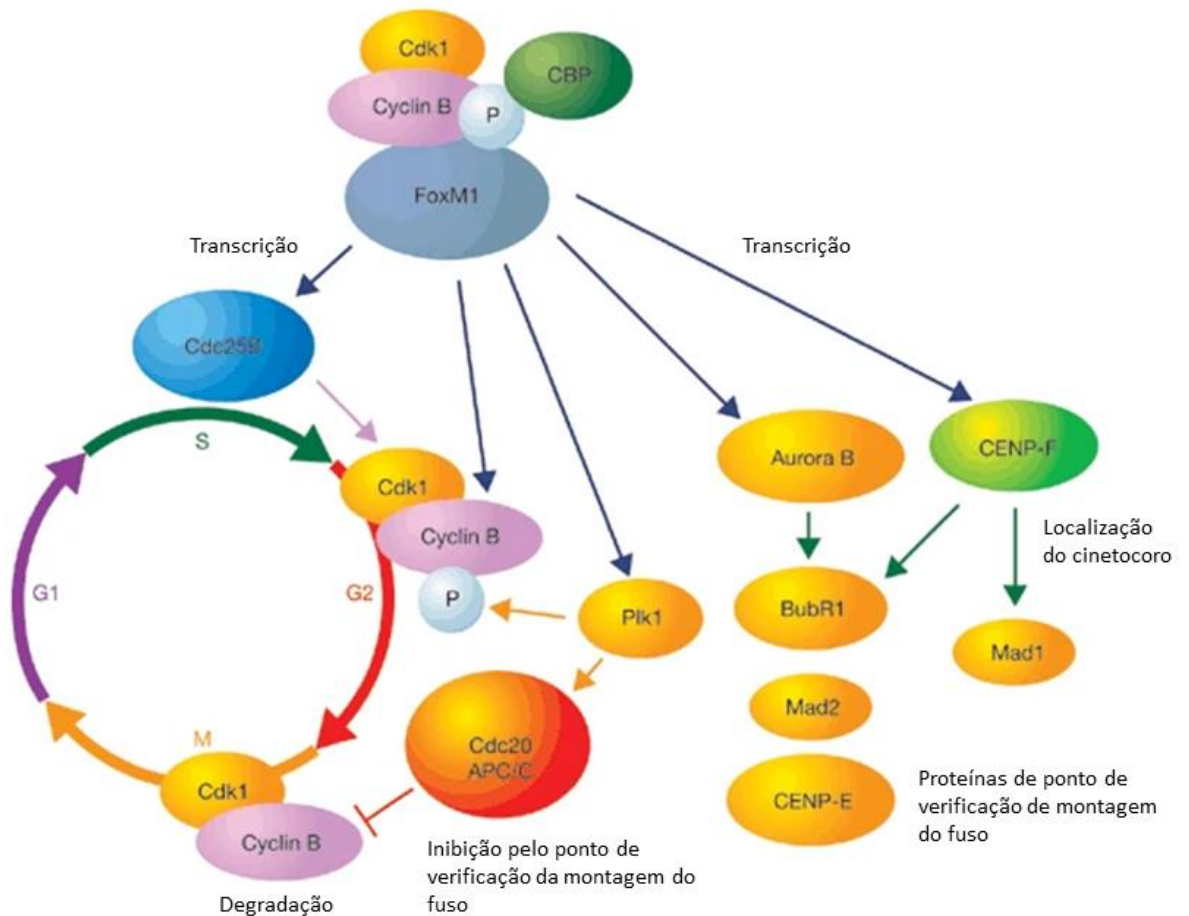


Figura 2 Atuação de FoxM1 no ciclo celular. A partir da fosforilação e ligação do complexo Cdk1/Ciclina B/FoxM1 à proteína coativadora CBP ocorre a transcrição de proteínas e ativação de vias que regulam a progressão de G2/M, como a Polo like cinase 1 (Plk1), CENP-F, fosfatase Cdc25B, Aurora B cinase e ciclina B. Plk1 promove a fosforilação de ciclina B no início da fase G2, o leva a sua migração para o núcleo e promoção à fase M. Além de ser responsável por facilitar a saída mitótica através do estímulo indireto ao complexo Cdc20-APC/C, permitindo a degradação do complexo Cdk1/ciclina B. A proteína Aurora B cinase transcrita proporciona a regulação da localização de outras proteínas de ponto de verificação de montagem do fuso e posição do cinetocoro, como BubR1, Mad1, Mad2 e CENP-F sendo importantes na citocinese e na segregação dos cromossomos. Fonte: Adaptado de Macmillan Publishers Limited, part Nature (2016).

A regulação aberrante da expressão de FoxM1 ocasiona uma instabilidade genômica e a reprogramação epigenética ativando diversas vias que levam à progressão tumoral. A desregulação da proteína promove um retardo na entrada da fase G2 acarretando em deficiência na formação dos fusos, desalinhamento dos cromossomos, defeito na citocinese e falha na verificação do checkpoint do fuso

mitótico. Estas alterações propiciam a formação de células defeituosas, o que pode conferir vantagens proliferativas e suscetíveis à transformação celular por oncogenes. Assim como, desempenha papel inicial na tumorigênese com a promoção de diversas etapas da progressão tumoral através da indução de sinais mitogênicos e de sobrevivência, promovendo a invasão, migração e angiogênese do tumor (HWANG et al., 2013; KOO; MUIR; LAM, 2012; UMAIR et al., 2015).

A superexpressão de FoxM1 foi observada em diversos tipos tumorais dentre os quais podemos citar mama, cabeça e pescoço, pâncreas, pulmão e tireóide (LIAO et al., 2018b). Em tumores, FoxM1 é considerado um regulador primordial para a progressão e metástase, estando associado à proliferação, metástase, pior prognóstico e maior resistência a fármacos (BACH et al., 2018). Visto que, ocorre a redução da proliferação, metástase, migração e angiogênese tumoral quando há inibição da proteína. Assim, FoxM1 demonstra sua importância nestas etapas, sendo um possível alvo terapêutico e biomarcador de prognóstico em carcinoma epidermoide oral (WANG et al., 2016; YU, Chao et al., 2015; ZHONG et al., 2017).

2.6 Cinase polo-like 1 (PLK1)

As proteínas pertencentes à família Plk são importantes na regulação de diversos passos no processo da mitose e na proliferação celular, desde a fosforilação dos cinetócoros defeituosos, participação no ponto de checagem G2/M, preparação do vínculo com o cinetócoro, até a conclusão do ciclo celular (Figura 3). A partir da obtenção do clone de *Drosophila melanogaster*, do gene *Polo*, em 1988, foram identificados cinco homólogos de mamífero para esse gene (*PLK1*; *PLK2*; *PLK3*; *PLK4*; *PLK5*) e pode-se observar que mutações induziam a formação de fusos anormais nos polos das células ao longo da fase de mitose (GODINHO; TAVARES, 2008; LIU, 2015).

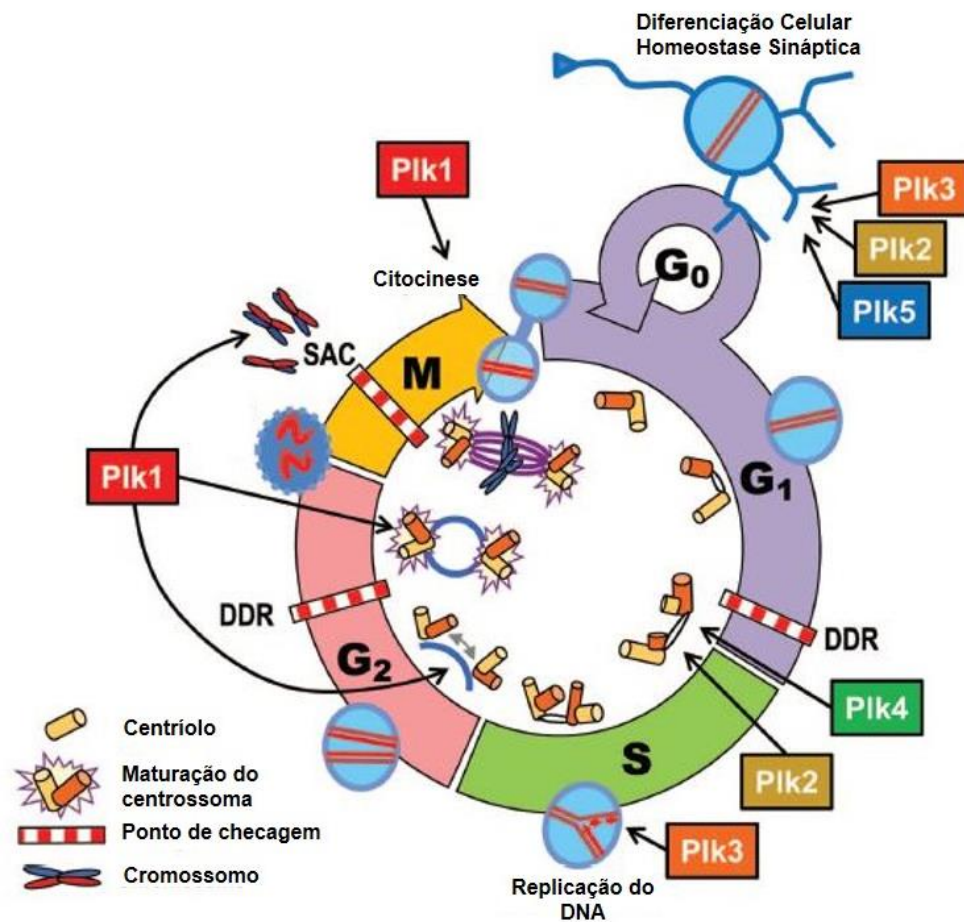


Figura 3 Funções de Plk no ciclo celular. Nos processos do ciclo celular têm-se a participação das Plk1-4, na duplicação dos centríolos (Plk2 e Plk4); na replicação do DNA (Plk3); na separação e maturação do centrossoma (Plk1); na entrada da fase de mitose (Plk1); na formação do fuso, na segregação dos cromossomos e na citocinese (Plk1). No entanto, a Plk2 e Plk5 (e, provavelmente, Plk3) estão relacionadas com funções não-proliferativas, por exemplo, na diferenciação neuronal (Plk2 e Plk5) e homeostase sináptica (Plk2). DDR (resposta a danos ao DNA); SAC (ponto de checagem de montagem do fuso). Fonte: Adaptado de Cárcer et al. (2011).

As proteínas Plk1 a Plk4 apresentam estruturas similares, com um domínio Serina-treonina cinase conservado localizado na porção amino-terminal, e outro domínio de regulação formado por um (Plk4) ou dois (Plk1 a Plk3) domínios polo-box (PBDs) na porção carboxi-terminal. Divergente das outras proteínas da família, Plk5 carece do domínio cinase funcional e contém a porção PBD parcialmente degenerada, como pode ser observado na Figura 4 (ARCHAMBAULT; GLOVER, 2009; LIU, 2015).

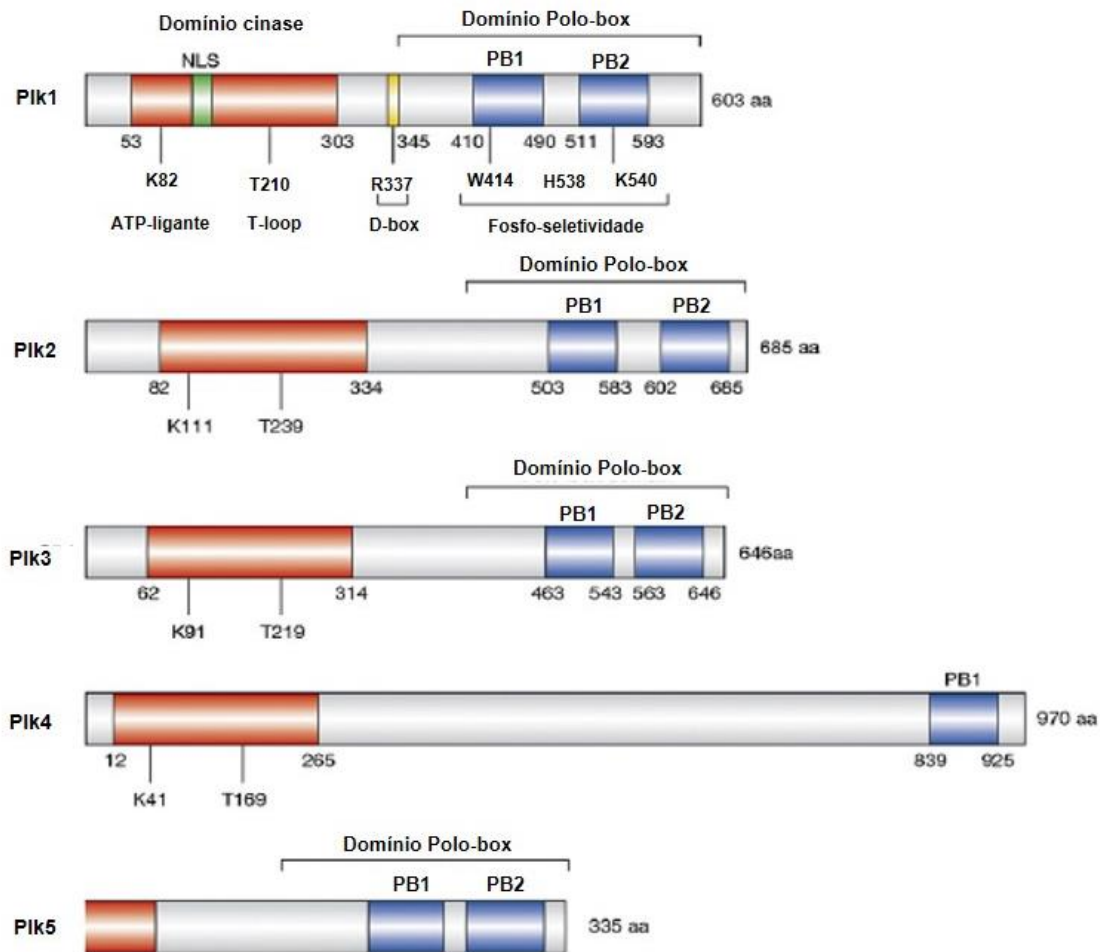


Figura 4 Estrutura da proteína em humanos dos domínios da família Plk. Comprimento dos aminoácidos (aa) mostrados à direita, e as posições dos domínios cinase (vermelho) e polo-box 1 e 2 (azul). Localização nuclear (NLS) das sequências indicados em verde, e o do domínio D-box (ou PBing) indicado em amarelo. Os resíduos que são críticos para a ligação de ATP e ativação enzimática (t-circular) dentro dos domínios de cinase e fosfo-seletividade dentro das polo-boxes são indicados. Fonte: Adaptado de Macmillan Publishers Ltd (2006).

A fosforilação de variados substratos pela Plk1 modula diversas vias no ciclo celular, dessa forma, durante a interfase localiza-se no citoplasma e nos centrossomas, e na divisão celular, nos cinetócoros e no fuso mitótico. A sua inibição ocasiona o não estabelecimento do fuso bipolar e a falha na união do cinetócoro aos microtúbulos corretamente, isto ocorre por meio de inibidores de interferência de RNA ou pequenas moléculas (VAN VUGT; BRÁS; MEDEMA, 2004; YU et al., 2020) Estudos realizados por Cárcer et. al (2011) verificaram que a ausência dessa proteína acarreta a interrupção da mitose levando a morte de camundongos na fase de

mórula, posto isto, *PLK1* é um gene essencial para a progressão celular (DE CÁRCER; MANNING; MALUMBRES, 2011).

Elia et al. (2003) mostraram que a porção PBD-dependente de ligação é necessária para a localização subcelular e a atividade de Plk. Observa-se que mutações singulares em resíduos cruciais na porção PBD são capazes de provocar mudanças na posição de Plk1 em leveduras e mamíferos, e assim, alterar sua função sem prejudicar a atividade cinase (ELIA; CANTLEY; YAFFE, 2003). Essa porção apresenta um sítio de ligação fosfolipídica que exibe uma forte afinidade para com o substrato, estruturalmente, apresentam duas caixas polo conservadas que podem se dimerizar intramolecularmente e formar uma “bolsa ou pinça” para a ligação fosfoserina e fosfotreonina. Com isso, induzem mudanças conformacionais que irão promover a sua fosforilação por outras cinases (Cdk1 ou Cdk5) que sucederá a um local de ancoragem, e assim, possibilitar Plk fosforilar outro substrato (PARK et al., 2015).

No entanto, outros estudos mostram que para a regulação e localização de Plk a porção PBD não é necessariamente exigida, visto que Plk1 consegue ligar substratos não fosforilados e mutantes que não se ligam a resíduos fosforilados. De modo similar, a interação entre Plk1-Bora não requer obrigatoriamente a fosforilação inicial, sendo os domínios PBD ou cinase suficientes para a ação. Em *Drosophila* a localização ocorre através da interação com uma proteína associada a microtúbulos, Map205, de modo que não seja fundamental a fosforilação inicial (DE CÁRCER; MANNING; MALUMBRES, 2011; LIU et al., 2012; NAKAJIMA et al., 2003).

Dessa forma, considerando o mecanismo de ação das Plks, tem-se observado em células que estão em divisão normal a expressão de Plk1 com função crucial na regulação de numerosas fases do ciclo celular, fato comprovado em modelos de ratos e em linhagens celulares humanas, com expressão circundante baixa e nenhuma translocação ou mutação no gene. Assim, é possível notar a percepção da atividade essencial da proteína na maturação funcional dos centrossomos e na formação do fuso bipolar, a entrada na fase M, desagregação do envelope nuclear (NEBD), coesão da cromátide irmã, formação de vínculos cinetócoro-microtúbulo, a saída da mitose e a citocinese (Figura 5). Tanto Plk1 quanto Plk4 são altamente expressas em tecidos embrionários (alta taxa de proliferação), e prevalentemente,

em adultos, encontrados em tecidos proliferativos como, por exemplo, medula óssea e testículos. Em outros tecidos como pulmão, fígado, rim e cérebro não apresentam expressão significativa, sugerindo que a proliferação celular seja o principal promotor da expressão de Plk1 (DE CÁRCER; MANNING; MALUMBRES, 2011; GJERTSEN; SCHÖFFSKI, 2014; LIU, 2015).

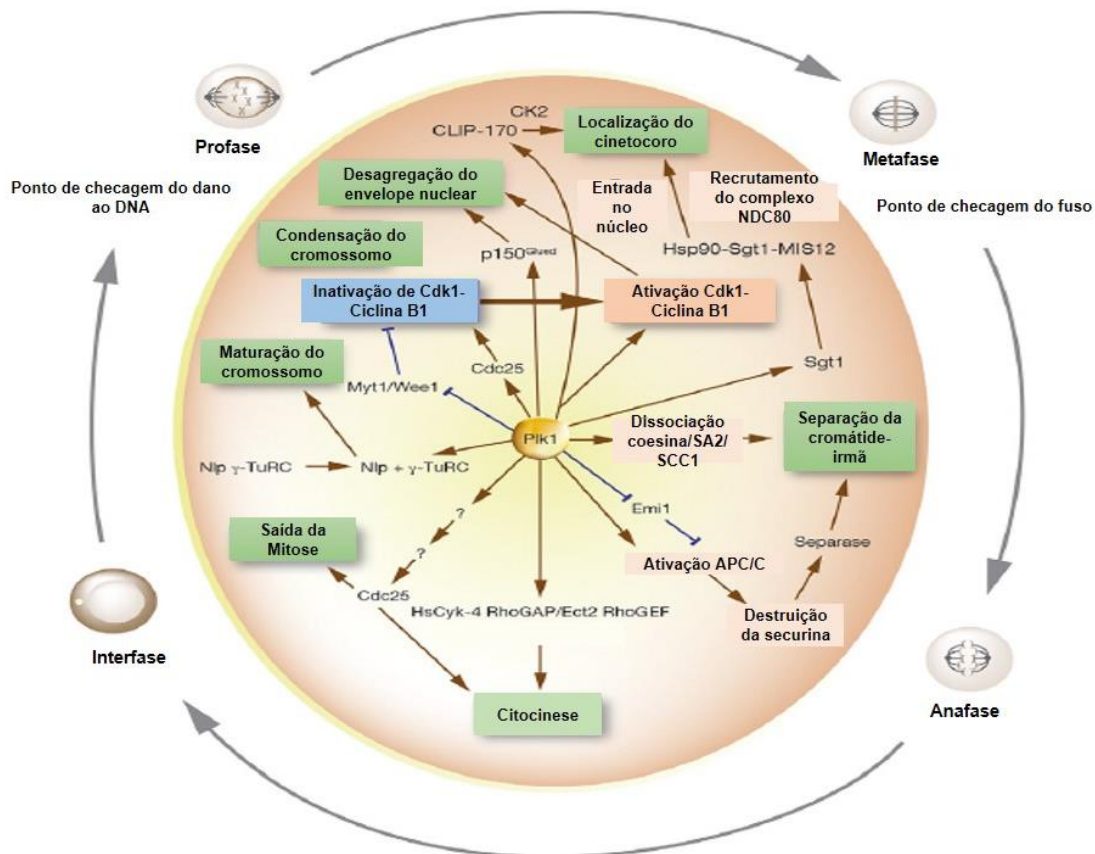


Figura 5 Plk1 na progressão do ciclo celular. Diagrama esquemático da representação de algumas vias em que Plk1 atua como regulador de etapas ao longo da progressão mitótica. Interações ativadoras, demonstradas na caixa de texto rosada e as interações inibitórias na caixa azul. Fonte: Adaptado de Cárcer et al. (2011).

O controle da ativação de Plk1 ocorre por meio de diversos fatores de transcrição dentre os quais as proteínas FoxM1, p53, a família de E2F e outras durante o ciclo celular. A sua transcrição pode ocorrer através da fosforilação de um resíduo de Thr conservado (Thr210) em que é mediado pela Aurora A/Bora, a qual permite a ativação da fosfatase Cdc25, responsável pela atividade do complexo ciclina-Cdk que atua no final de G2 (Figura 6). Assim como sua ativação através da transcrição de FoxM1, como evidenciado na figura 2, o que permite o início da mitose por meio

da fosforilação dos complexos M-Cdk e da regulação mediante interações entre o domínio PBD de Plk1 e outras proteínas (LIU, 2015; LU et al., 2011).

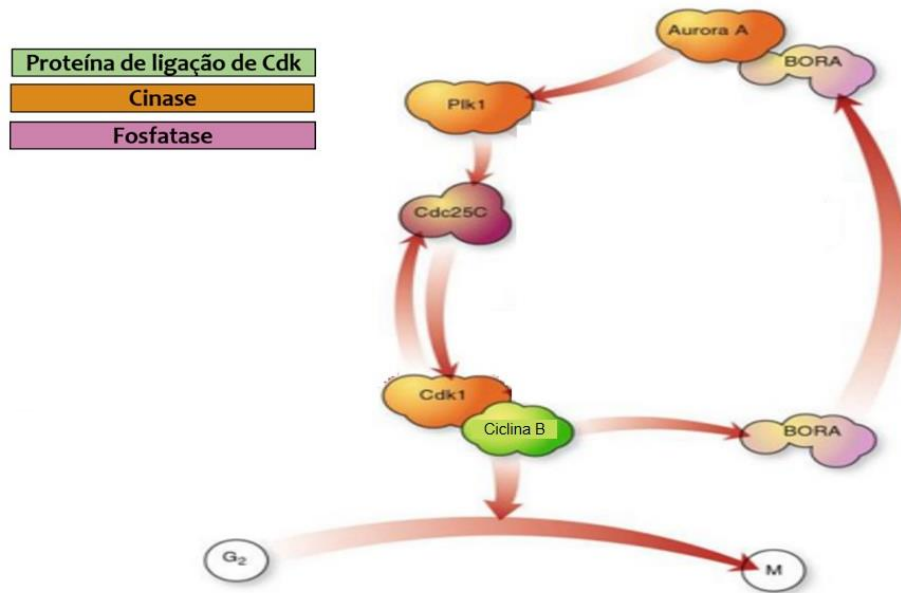


Figura 6 Ativação de Plk1. Representação esquemática da ativação de Plk1, por meio da fosforilação de Aurora A/Bora, com posterior ativação de Cdc25c promovendo a fosforilação do complexo Cdk1/Ciclina B e, assim, a progressão do ciclo celular. Fonte: Adaptado de Jacek Z. Kubiak (2011).

Um aspecto observado em células tumorais é a instabilidade genômica e cromossômica que irão gerar uma desregulação no ciclo celular. A metilação do DNA nas regiões promotoras de *PLK1* foi relacionada à sua expressão em carcinoma hepatocelular, neoplasias hematológicas e colangiocarcinoma, nos quais foram observados que a hipometilação detectada em tecidos tumorais estava correlacionada a alta expressão da proteína (WARD et al., 2011, 2015; ZHANG et al., 2019). Estudos anteriores relataram o aumento da mitose e proliferação celular acelerada na ausência de metilação em dois resíduos de lisina de Plk1, resultando no aumento de sua atividade (FELDMAN et al., 2019; LI, Weizhe et al., 2019). Logo, nota-se a localização nuclear de Plk1, antes da fase G₂/M até a fase G₁/S, e a sua superexpressão associada a um pior prognóstico e menor sobrevida global para o paciente em diversos tipos de cânceres, incluindo cabeça e pescoço. Uma série de alvos terapêuticos mitóticos contra o câncer tem sido propostos para essa proteína e com isso, têm-se desenvolvido moléculas com ação inibidora. Estes fármacos são

concorrentes ATP clássicos e capazes de inibir a Plk1 alostericamente, dificultando a porção PBD de se ligar aos substratos (LIU, 2015).

Plk1 representa um marcador de prognóstico e alvo para a terapia de câncer por apresentar forte expressão em tecidos neoplásicos, mas apenas fraca/rara expressão em tecidos normais. Por causa do seu envolvimento global em várias fases do ciclo celular e, devido à dependência de células transformadas, numerosos aspectos funcionais da Plk1 têm sido investigados em pesquisas biológica, médica e farmacológica (HELMKE; BECKER; STREBHARDT, 2016).

A utilização de biomarcadores como uma ferramenta auxilia na detecção de alterações genéticas e moleculares em diferentes estágios da tumorigênese, e assim, vem a contribuir para o diagnóstico e o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos (TANAKA; ISHIGAMORI, 2011). Assim, o uso do TIL, *PLK1* e *FOXM1* como biomarcadores de prognóstico em CEO poderiam ser de grande utilidade para auxiliar na determinação do comportamento tumoral e na indicação de tratamentos mais individualizados.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a densidade de TIL, o status de metilação da região promotora do gene *PLK1*, a expressão gênica de *PLK1* e *FOXM1* no tecido tumoral como indicadores de prognóstico, assim como a expressão proteica de Plk1 ao longo da progressão tumoral em carcinoma epidermoide oral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a densidade de TIL em tecido tumoral como marcador de prognóstico em pacientes com CEO;
- Averiguar a expressão proteica de Plk1 em tecido tumoral como marcador de progressão em pacientes com CEO;

- Avaliar a expressão gênica de *PLK1* e *FOXM1* em tecido tumoral como marcador de prognóstico em pacientes com CEO;
- Investigar o status de metilação da região promotora do gene *PLK1* em ctDNA a partir do soro e plasma em CEO.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Trata-se de estudo multicêntrico de corte longitudinal onde foram realizadas coleta de amostras biológicas e obtenção de dados clínicos de pacientes com carcinoma epidermoide oral. As amostras foram provenientes de pacientes atendidos nos serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia (AFECC) e Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) do Brasil, e pelo Study of Head and Neck Cancer in South America (InterCHANGE), coordenado pela International Agency for Research on Cancer (França); e University Hospitals Coventry & Warwickshire (Reino Unido) pelo Improving treatment selection using Predictive Classifiers of Treatment Response for Head and Neck Cancers and dysplasia (PREDICT). A partir da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde, Vitória - ES (Processo nº 318/2011) e NRES Committee West Midlands – Coventry & Warwickshire - EC.10.H1210.9. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado pelos participantes desta pesquisa.

Foram selecionados no total 118 pacientes com diagnóstico conclusivo de carcinoma epidermoide oral, de ambos os sexos, grupos étnicos e faixa etária, seguimento mínimo de 24 meses ou óbito, os quais não realizaram nenhum tipo de tratamento antineoplásico prévio ao estudo, com lâminas e blocos em bom estado de conservação apresentando mais de 75% da área tecidual total do tumor íntegro, tecido tumoral a fresco e soro em boas condições de armazenamento.

Dentre o número total de pacientes foram obtidos 109 blocos parafinizados (57 amostras do Brasil e 52 amostras do Reino Unido), 21 fragmentos tumorais, 30 amostras de soro e cinco de plasma, sendo 17 pacientes com amostras de soro antes do início do tratamento e seus acompanhamentos (1º e/ou 2º seguimentos)

após a conclusão do tratamento inicial (13 amostras) e cinco amostras de plasma antes do início do tratamento de pacientes do Brasil (Figura 7). Como controles de reação foram utilizados um fragmento de gengiva normal e três amostras de soro e plasma de indivíduos saudáveis.

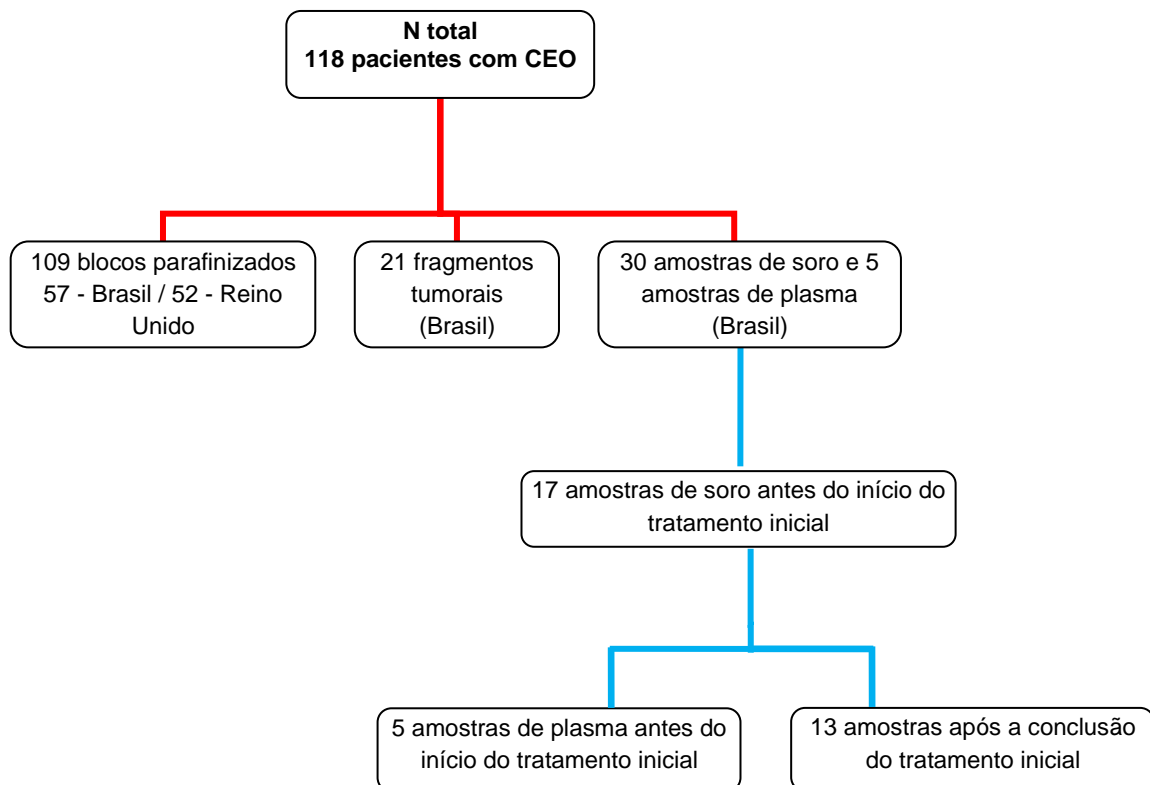


Figura 7 Fluxograma ilustrando a origem dos espécimes clínicos coletados. A partir de 118 pacientes com diagnóstico conclusivo de CEO foram obtidos 109 blocos parafinizados, provenientes do Brasil (57) e Reino Unido (52), 21 fragmentos tumorais, 30 amostras de soro e cinco amostras de plasma de indivíduos do Brasil. Com base nas 30 amostras de soro e seis de plasma, o grupo foi subdividido em três grupos: três indivíduos saudáveis (controles) com amostras de soro e plasma; 17 indivíduos com amostras de soro antes do início do tratamento inicial com suas respectivas amostras dos acompanhamentos (F1 e/ou F2) após a conclusão do tratamento inicial (13 amostras); e cinco pacientes com amostras plasma antes do início do tratamento.

Mediante entrevistas, consulta médica e busca em prontuários foram analisadas as

variáveis clínicas como idade, sexo, cTNM, sítio anatômico da lesão e histórico do consumo de bebidas alcóolicas e uso de tabaco dos pacientes.

As avaliações das lâminas obtidas foram desempenhadas por 2 patologistas e confirmado o diagnóstico de acordo com os critérios de Estadiamento de Tumores Malignos (pTNM) (AMIN et al., 2017).

Os pacientes diagnosticados com CEO foram acompanhados a cada 6 a 12 meses, ao longo 60 meses ou até óbito, com os quais foram realizadas entrevistas, consulta médica e/ou busca de informações em prontuários.

4.2 Análise Histopatológica

Os espécimes selecionados (109), fixados previamente em solução tamponada de formol a 10% (pH 7,4), foram incluídos em parafina e posteriormente seccionados em micrótomo (Leica RM2165). Obteve-se de cada bloco cortes consecutivos de 5 µm, colocados sobre lâminas histológicas e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE). As lâminas coradas em HE que apresentaram um percentual de tumor acima de 75% da área total do tecido (áreas representativas) foram analisadas em microscópio óptico Zeiss® quanto à gradação tumoral, padrão de Infiltração Linfocitária Tumoral (TIL), padrão de invasão tumoral, invasão vascular, linfática e perineural. Amostras provenientes de biópsia foram avaliadas apenas em casos onde foi possível avaliar margem com tecido subjacente livre de doença.

O grau de diferenciação tumoral foi analisado de acordo com os critérios de classificação de tumores estabelecidos pela OMS (EL-NAGGAR et al., 2017), tendo sido agrupados em três categorias: bem diferenciado, em que a arquitetura tecidual assemelha-se ao padrão normal do epitélio escamoso; moderadamente diferenciado, apresenta certo grau de pleomorfismo celular e nuclear, atividade mitótica e pouca queratinização; e pouco diferenciado, com predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas e ausência de queratinização.

O padrão de Infiltração Linfocitária Tumoral (TIL) foi analisado no aumento de 25x sendo categorizado em: alto, quando verificada a presença de linfócitos em > 80% da área do tumor/estroma; moderado, com presença de infiltrado heterogêneo e irregular de linfócitos ocupando entre 20 e 80% da área tumor/estroma; baixo,

infiltrado discreto distribuído em < 20% de tumor/estroma ou inexistente (MARSH et al., 2011).

O padrão de invasão tumoral foi avaliado conforme proposto por Brandwein-gensler e Rolnitzky (2005) que consiste na avaliação do front de invasão tumoral utilizando aumento de 200x. O front de invasão tumoral foi então classificado em quatro categorias: padrão I, compressivo e bordas infiltrantes bem delineadas; padrão II - infiltrante com cordões sólidos; III - pequenos grupos ou cordões de células infiltrantes; padrão IV - marcante dissociação em grupos pequenos ou células individualizadas (BRANDWEIN-GENSLER; ROLNITZKY, 2005).

Os tumores também foram avaliados quanto à invasão linfovascular, caracterizada pela presença de células neoplásicas dentro de vasos/artérias sanguíneas e linfáticas; e invasão perineural, de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo The Royal College of Pathologists (HIRSCHOWITZ et al., 2010), tendo sido descritas como presença ou ausência.

As análises histopatológicas foram realizadas por dois examinadores, em casos de discrepância, as lâminas foram revisadas e um consenso foi obtido como resultado final.

4.3 Tissue microarray

Como descrito por Parsons e Grabsch (2009), lâminas de Tissue microarrays (TMAs) foram confeccionadas a partir de blocos de tecidos incluídos em parafina (PARSONS; GRABSCH, 2009). As lâminas coradas em HE foram digitalizadas na plataforma Panoramic digital slide scanner (3DHISTECH®, Budapeste, Hungria) e amostras do tecido com áreas representativas do tumor (frente de invasão e porção mediana), displasia e epitélio adjacente ao tumor foram identificadas e selecionadas utilizando a ferramenta de análise de imagens Panoramic Viewer software (versão 1.15 3DHISTCH®, Budapeste, Hungria).

Em seguida, os blocos correspondentes às lâminas selecionadas (blocos doadores) foram inseridos no equipamento TMA Master II (3DHISTCH Ltd®, Hungria) e digitalizados. As imagens geradas das lâminas com as áreas de TMA selecionadas foram alinhadas às imagens dos blocos, e então fragmentos cilíndricos de 0,6 mm

foram obtidos dos blocos doadores e inseridos em um bloco inicialmente vazio (bloco receptor). A transferência de tecidos das regiões selecionadas para o bloco receptor ocorreu de forma automatizada pelo TMA Master II, em uma matriz previamente construída e locais pré-determinados. Triplicatas das amostras em cada região (tumor, displasia e epitélio adjacente ao tumor) foram obtidas, e após a finalização da construção do TMA, os blocos receptores foram seccionados em micrótomo para a obtenção de cortes histológicos sequenciais de 3 μ de espessura, dispostos em lâminas polarizadas (StarFrost® Advanced Polycat, Braunschweig, Alemanha). O processo de construção do TMA foi realizado no The Nottingham Health Science Biobank, localizado no Reino Unido.

4.4 Validação TMA

Para a validação do emprego da imuno-histoquímica (IHQ) em TMA, 10 lâminas convencionais contendo tecido tumoral de CEO imunomarcadas foram submetidas à técnica para análise de Plk1. As avaliações de expressão da proteína foram realizadas por dois patologistas independentes. Os valores de expressão proteica dos mesmos casos, analisados em TMA e lâminas convencionais por dois patologistas independentes, foram comparados com os obtidos da leitura realizada nos TMAs utilizando análise de concordância Kappa, não sendo observada diferença significativa entre leituras efetuadas em lâminas convencionais e lâminas de TMA.

4.5 Imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas nas lâminas de TMA utilizando o sistema automatizado BOND (Leica), com o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-plk1 (Clone Plk1, Leica, 1:50). Foram empregados como controle positivo da reação, a marcação do adenocarcinoma de cólon humano. O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário, o qual foi substituído por soro não-imune de camundongo (X501-1, DAKO) diluído em solução diluente de anticorpo (S0809, DAKO). A reação com o anticorpo utilizado foi previamente submetida a testes para padronização.

Para avaliar a expressão da Plk1 foi considerada a marcação nuclear e citoplasmática das células utilizando o método H-score (PICKHARD et al., 2014).

Este método consiste em uma análise semi-quantitativa obtida pelo produto da intensidade da coloração utilizando uma escala de 0 a 3 (0, representa ausência de imunomarcação; 1, imunomarcação de fraca intensidade; 2, imunomarcação de intensidade moderada e 3, imunomarcação de intensidade forte) pela porcentagem de células marcadas em cada nível de intensidade (0 a 100%). Todas as secções foram analisadas por 2 examinadores, usando um microscópio de luz (200x) e um consenso foi obtido nos casos discordantes.

Avaliou-se a expressão tecidual de Plk1 em células tumorais de CEO (front e porção mediana), displasia e epitélio adjacente ao tumor. A categorização quanto à expressão em alta e baixa de Plk1 ocorreu através da instituição do ponto de corte, baseado na mediana (valor de 30) obtida pelo cálculo do H-score na região do epitélio adjacente ao tumor, sendo adotada para todas as regiões analisadas. A expressão de Plk1 nas regiões com H-score ≤ 30 foi considerada baixa, enquanto o H-Score > 30 foi considerado alta expressão.

4.6 Extração de RNA

Um total de 21 amostras de fragmentos tumorais provenientes de biópsia ou da ressecção cirúrgica do tumor, obtidas nos serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia (AFECC) e HUCAM foram armazenadas em microtubos contendo RNAlater®. Como controle de reação (amostra normalizadora) foi utilizado amostra de gengiva de indivíduo saudável. Os fragmentos foram mantidos em temperatura de 2 a 8°C overnight, com posterior retirada do reagente e armazenamento à -80°C no Laboratório de Patologia Molecular da UFES até processamento.

Os fragmentos de tumor foram macerados e incubados com 1,5 mL de TRIzol™ Reagent (Invitrogen™) por 5 minutos em uma placa de petri, sendo transferidos para tubos de polipropileno livres de RNase e DNase. Foram adicionados 0,3 mL de clorofórmio em cada amostra, com consecutiva agitação dos eppendorfs por 15 segundos e mantidos a temperatura ambiente por 3 minutos. Em seguida, a 10.200 rpm por 15 min a 4°C, os tubos foram centrifugados e a fase aquosa que apresentava o RNA foi realocada em tubos estéreis. Adicionou-se 0,75 mL de álcool isopropílico gelado nos tubos, sendo as amostras mantidas a temperatura ambiente

por 10 minutos, com posterior centrifugação a 10.200 rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e, ao precipitado de RNA formado no fundo foi adicionado 1 mL de álcool a 75% gelado nos tubos. Os tubos foram centrifugados a 8.400 rpm por 5 minutos a 4°C, em seguida o etanol foi descartado e para a evaporação eficaz do álcool, os tubos permaneceram abertos por 15 minutos. A ressuspensão do pellet ocorreu em 20 µL de água DEPC (água livre de DNase e RNase), com fracionamento de 4 µL de cada amostra para quantificação e análise da integridade, e 16 µL para armazenamento no - 80°C.

A quantificação das amostras foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop 2000® (Thermo Scientific), com razão 260/280 entre 1,8 - 2,0 sendo considerada aceitável.

4.7 Obtenção cDNA

Para as amostras extraídas de RNA foram confeccionados o cDNA através dos kits Deoxyribonuclease I (DNase I) - Amplification Grade (Sigma-Aldrich®) e High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™) no Laboratório de Patologia Molecular da UFES. Para cada amostra foram acondicionados em eppendorfs RNase free 1 µL de DNase + 1 µL do Buffer 10x + o equivalente a 1 µg de RNA das respectivas amostras, com a adição de água DEPC para o volume final de 10 µL. Os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 15 minutos, com posterior adição de 1µL de EDTA pH 8, inibição da DNase e, em seguida, foram colocados no termociclador por 10 minutos a 65°C. Posteriormente, foram pipetados em cada eppendorf 2 µL de 10X RT Buffer; 0,8 µL de 25X dNTP Mix; 2 µL de 10X RT Random Primers; 1 µL de MultScrib Reverse Transcriptase; 1 µL de RNase Inhibitor e 3,2 µL de água DEPC. Ao final, as amostras foram posicionadas no termociclador seguindo a programação Step 1 (T 25°C Time 10 minutos), Step 2 (T 37°C Time 120 minutos), Step 3 (T 85°C Time 5 minutos) e Step 4 (T 4°C infinito). O cDNA obtido foi armazenado em freezer -20°C para posterior análise da expressão dos genes através de RT-qPCR.

4.8 *Reverse Transcriptase Quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR)

O levantamento e consulta das sequências dos genes *PLK1*, *FOXM1* e *Beta-actina* (constitutivo) foram realizados pelas plataformas NCBI, Ensembl e Blast. O programa de informática IDT (Integrated DNA Technologies) foi utilizado para o

desenho dos primers dos genes (Tabela 1) obedecendo as condições ótimas para melhor eficiência. Para a escolha do gene endógeno foram testados os genes *Beta-actina*, *GAPDH*, *RPS8* e *B2M* em que a *Beta-actina* apresentou menor variação e melhor Ct (< 24) dentre os analisados.

Tabela 1 Oligonucleotídeos iniciadores usados para a amplificação dos genes *FOXM1*, *PLK1* e *Beta-actina*

Gene	Sequência (5' - 3')	Tamanho (pb)
FOXM1-F	GGA TAG CTC CTC TTT CTT CT	20
FOXM1-R	TCC TCC TTG ATA GTC TGA AC	20
PLK1-F	GGG TAT CAG CTC TGT GAT AA	20
PLK1-R	GTC ACC ATC ATT GTA GAG GA	20
Beta-actina-F	AGG GTG TGA TGG TGG GTA TG	20
Beta-actina-R	TGC CGT GTT CAA TGG GGT AC	20

F: forward; R: reverse.

Para a análise da expressão dos genes, o produto da transcrição reversa (cDNA) de cada amostra foi amplificado por RT-qPCR, em triplicata, no aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA), sendo a média dos três exemplares considerada para análise. Em placas ópticas foram pipetados os reagentes: 0,5 µL dos primers forward e reverse para *FOXM1* e *Beta-actina* (controle endógeno); 0,4 µL dos primers forward e reverse para *PLK1*; 5 µL Syber Green Master Mix® (Applied Biosystems); o equivalente a 1 µg de cDNA das amostras e água ultrapura para completar o volume final de 10 µL. Como controle da pureza da reação foram pipetados para cada par de primer água ultrapura no lugar das amostras. Após a incubação das placas a 95°C por 10 minutos, ocorreu à amplificação das amostras durante 45 ciclos a 95°C por 15 segundos, 55°C por 15 segundos e 68°C por 1 minuto. A fim de conferir a ausência de sinais anormais de amplificação, a curva de melting (dissociação) das amostras foi analisada. O método de Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) foi empregado na análise quantitativa da expressão gênica de *FOXM1* e *PLK1*.

4.9 Obtenção e extração do DNA tumoral circulante (ctDNA)

A separação e o armazenamento do soro foram realizados seguindo protocolo modificado e padronizado no Laboratório de Patologia Molecular UFES, com a coleta do sangue total em um tubo primário de coleta com ou sem ativador de coágulo, mas sem anticoagulantes como EDTA ou citrato, onde foram mantidos em temperatura ambiente (15-25 ° C) entre 20 minutos a 1 hora para uma coagulação completa. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 1.900 xg e 4°C. A fase sérica superior (amarela) foi transferida para um novo tubo sem perturbar o sedimento que contém material celular. As amostras de soro foram centrifugadas por 15 min a 3.000 x g a 4°C, com posterior transferência do sobrenadante para um novo tubo, sem perturbar o sedimento, e armazenadas a 2-8°C até o processamento para purificação de ácido nucleico no mesmo dia e a -80°C para armazenamento prolongado.

A extração do ctDNA de 33 amostras de soro e oito plasmas humano foi realizada pela utilização do kit QIAamp ccfDNA/RNA (Qiagen, Hilden, Alemanha) modificado. As amostras foram divididas em três grupos: controle (indivíduo saudável), antes do tratamento inicial (diagnóstico clínico) e após a conclusão do tratamento (12 a 24 meses - 1º e 2º seguimentos). Foram transferidos 600 µL de soro de cada amostra para seus respectivos tubos de coleta de 15 ml, adicionados 180 µl de tampão RPL e agitados no vortex por 5 segundos, com posterior repouso em temperatura ambiente por 3 min. Adicionou-se 60 µl de buffer RPP e agitação no vortex por 20 s, em seguida foram incubados no gelo por 3 min. Para granular o precipitado as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 3 min e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Isopropanol gelado (1 volume) foi adicionado aos tubos e misturados em vórtice. Logo após as amostras foram transferidas para uma coluna de centrifugação RNeasy Midi em um tubo de coleta de 15 ml e centrifugadas a 5000 x g por 1 min à temperatura ambiente, sendo descartado o fluxo. Posteriormente foram adicionados 4 ml de tampão RWT à coluna de rotação RNeasy Midi, centrifugadas por 1 min a 5000 x g com descarte do fluxo ao final. Por conseguinte, foram pipetados 2,5 ml de tampão RPE na coluna de rotação RNeasy Midi repetindo a centrifugação anterior, ao final a coluna foi alocada em um novo tubo de coleta de 15 ml e adicionado 200 µl de água livre de RNase diretamente no centro da membrana da coluna de rotação. Os tubos foram incubados por 1 min em

temperatura ambiente e depois centrifugados por 1 min para eluir o DNA. No tubo com o eluído foram adicionados 200 µl de tampão RPL, 800 µl de etanol e misturados por vortex. Em uma coluna de centrifugação RNeasy MinElute em um tubo de coleta de 2 ml foram pipetados 1000 µl de amostra, sendo centrifugadas a 8000 x g por 15 segundos em temperatura ambiente, ao final o fluxo foi descartado. Em seguida foram adicionados 500 µl de tampão RPE na coluna de centrifugação RNeasy MinElute e centrifugadas por 15 s a 8000 x g. Adicionou-se 500 µl de etanol a 80% à coluna de centrifugação RNeasy MinElute e centrifugadas por 15 s a 8000 x g, com o descarte do fluxo e do tubo de coleta. A coluna de rotação RNeasy MinElute foi colocada em um novo tubo de coleta de 2 ml com a tampa aberta sendo centrifugada por 5 minutos para secar a membrana. Posteriormente a coluna foi inserida em um novo tubo de coleta de 1,5 ml e adicionado 20 µl de água livre de RNase diretamente no centro da membrana da coluna, sendo incubada por 1 min e centrifugada por 1 min a toda velocidade para eluir o DNA.

A quantificação do ctDNA foi realizada no espectrofotômetro NanoDrop 2000® (Thermo Scientific) e armazenado a -20° C para posterior modificação.

4.10 Metilação *in vitro* de DNA

A metilação total do ctDNA de soro e plasma de três indivíduos saudáveis foi realizada por meio do kit CpG Methylase-SssI (Thermo Scientific, Delaware, EUA), segundo instruções do fabricante. Foram utilizados 10 µl de DNA, 2 µl de M. SssI buffer 10x, 0,4 µl de SAM 50x, 1 µl de M. SssI e 6,6 µl de água ultrapura, totalizando 20 µl de reação. O conteúdo foi incubado por 15 min à 37° C parando a reação à 65° C por 20 min e estocado a -20° C.

4.11 Tratamento com Bissulfito

A modificação do ctDNA por bissulfito das 33 amostras do soro e oito amostras de plasma foram realizadas pelo kit Qiagen de conversão bissulfito EpiTect utilizando o protocolo do fabricante (Qiagen, Valência, CA), permitindo a metilação do DNA. O bissulfito de sódio converte as bases de citosinas não metiladas em uracilas, não ocorrendo a alteração das citosinas metiladas. A reação iniciou com 1 a 50 ng de DNA das amostras extraídas em uma mistura de bissulfito, tampão de proteção de DNA e água ultrapura provenientes do kit totalizando um volume de 140 µl. A

conversão foi realizada através do termociclador Bio-Rad MyCycler (Applied Biosystems, California, EUA), com as seguintes condições de termociclagem: Etapa inicial de desnaturação a 95°C por 5 min; incubação 60°C por 25 min; segunda etapa de desnaturação a 95°C por 5 min; incubação 60°C por 85 min; terceira etapa de desnaturação a 95°C por 5 min; incubação 60°C por 175 min e finalizando a 20°C por 10 min. Após o procedimento de conversão as amostras passaram pelo processo de limpeza consistindo em etapas de centrifugações e lavagens com tampões em colunas spin de DNA MinElute; adição do RNA transportador poli-A (aumento da ligação do DNA à membrana da coluna de spin); sulfonação de DNA ligado à membrana com posterior limpeza com tampão de dessulfonação para a remoção do agente de sulfonação, e eluição com tampão EB, totalizando 40 µl de eluído sendo armazenado a -20° C. O ctDNA totalmente metilado *in vitro* e tratado com bissulfito de sódio foi utilizado como controle positivo.

4.12 *MethyLight*

A técnica de *MethyLight* permite quantificar a metilação do DNA das amostras baseada em sondas específicas com dupla marcação, locais metilados e não metilados, com a utilização de um par de primer (EADS, 2000). As sondas e primers foram desenhados para as regiões promotoras do gene *PLK1* com o auxílio do programa de bioinformática Blast e do software *MethPrimer Design for Methylation PCR* (LI, Long-cheng; DAHIYA, 2022) e confeccionadas por meio da ferramenta *Pre-designed qPCR Assays* (Integrated DNA Technologies, Inc) baseada na região da expressão gênica nos tecidos tumorais. Os primers e sonda para avaliar o gene endógeno *COL2A1* (constitutivo) foram previamente descritos por SINGH, Alka et al. (2020), como observado na Tabela 2. As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 20 µl contendo 10 µl de EpiTect MethyLight Master Mix 2x; 0,4 µl solução de corante ROX 50x; 0,4 µl de sonda (0,2 µM de *COL2A1*, *PLK1* met e *PLK1* unMet); 0,4 µl do primer forward (0,2 µM) e 0,8 µl do primer reverse para *PLK1* e 0,8 µl dos primers forward e reverse (0,4 µM) para *COL2A1*; 3 µl de DNA (10 ng/µl) e água ultrapura para completar o volume. Como controle de reação foi utilizado DNA totalmente metilado e para controle negativo DNA não metilado, ambos convertidos com bissulfito, de amostras de soro de indivíduos saudáveis. Como controle de pureza da reação água ultrapura foi adicionada no lugar das amostras.

A padronização das concentrações ideais dos primers foi realizada antes das reações de qPCR, visando a otimização. Assim como, uma curva padrão foi estabelecida com o DNA totalmente metilado e convertido a partir de uma concentração inicial de 20 ng/μl em diluições seriadas de 1:10, 1:100 e 1:1000. As amplificações foram realizadas no aparelho 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems Carlsbad, CA, USA), com o kit EpiTect MethyLight PCR+ROX Vial seguindo recomendações do fabricante (Qiagen®, Hilden, Alemanha) com modificação na concentração do primer forward de *PLK1*. As amostras foram submetidas à 45 ciclos de amplificação a 95° C por 5 min, 95° C por 15 segundos e 60° C por 1 min. Para a análise do status de metilação do DNA as amostras foram consideradas metiladas ou não-metiladas quando foi possível detectar amplificação das respectivas sequências nas amostras e do gene endógeno.

Tabela 2 Oligonucleotídeos iniciadores e sondas selecionados para o ensaio *MethyLight*.

Gene	Primer sense (5' - 3')	Primer antisense (5' - 3')	Sonda (5' - 3')
<i>PLK1</i>	GTGCTCTTCAATGAC	TCATCAAGGAGTTGGGA	Met: VIC- TGCAGTACATAGAGCGTGACGGCA-
	TCAAC	TG	MGB UnMet: 6-FAM- TG I AGTA I ATAGAGCGTGACGG I A-
<i>COL2A1</i>	TCTAACAATTATAAAC	GGGAAGATGGGATAGAA	NED-
	TCCAACCACCAA	GGGAATAT	CCTTCATTCTAACCCAATACCTATCCCA CCTCTAAA-QSY

4.13 Análise de sobrevida

Os pacientes diagnosticados com CEO foram acompanhados ao longo de 60 meses. O seguimento dos pacientes foi realizado em etapas, sendo o primeiro seguimento realizado entre 6 e 18 meses após a consulta de diagnóstico e término do tratamento de primeira linha; o segundo seguimento foi registrado 6 meses após o primeiro seguimento e o terceiro e quarto seguimentos em 30 e 60 meses subsequentes à data do diagnóstico clínico (Figura 8).

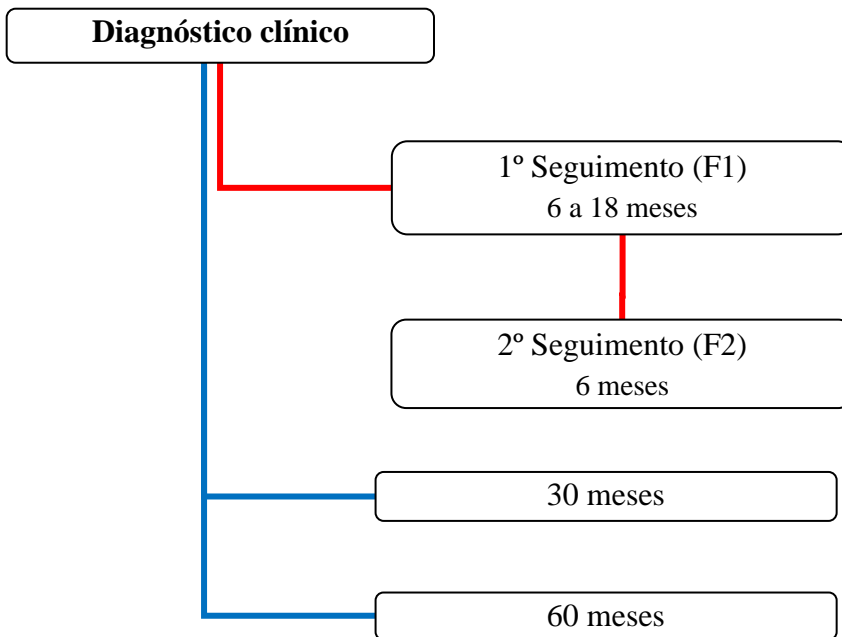


Figura 8 Fluxograma do acompanhamento clínico dos 118 pacientes com CEO. A partir do laudo da biópsia o diagnóstico clínico e o tratamento do paciente são definidos pelo médico. O acompanhamento inicial (1º seguimento – F1) acontece após um intervalo de tempo entre 6 e 18 meses da data do diagnóstico clínico, seguido pelo 2º seguimento (F2) que compreende 6 meses após o 1º seguimento. Após 30 e 60 meses do diagnóstico clínico, os pacientes permanecem em acompanhamento, encerrando com 5 anos. No 1º e 2º seguimentos são coletadas amostras de sangue do paciente, e em todos os acompanhamentos informações clínicas.

A avaliação do seguimento foi realizada pela equipe médica e os resultados da avaliação clínica foram anotados em formulário específico e complementados com entrevista e análise dos prontuários. O tratamento realizado foi registrado e subdivido nas seguintes categorias: Cirurgia exclusiva; Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia; e Radioterapia + Quimioterapia. A análise da progressão tumoral considerou três condições clínicas pós-tratamento: remissão tumoral, recidiva e óbito.

4.14 Análise estatística

Para a análise da associação entre as variáveis clínicas, fatores de risco e histopatológicas o teste do Qui-Quadrado e Exato de Fisher foram empregados, e para a comparação da expressão proteica média dos segmentos estudados foi

utilizado o teste U de Mann-Whitney e pós-teste de Bonferroni para ajustes de comparação múltipla através do software SPSS (Statistic Package for Social Sciences) versão 20.0. A análise de variância One-Way (ANOVA), e aplicação dos testes de Dunnett e/ou Tukey foram utilizados para verificar os padrões de expressão gênica por meio do software GraphPad Prism® v.6.0 (GraphPad Software Incorporation).

O teste de Kaplan–Meier, com Log-Rank foi utilizado para avaliar a Sobrevida global (SG) e a sobrevida livre de doença (SLD). As datas referentes ao óbito (evento) e período da sobrevida total foram analisados para a curva de SG, enquanto a data da recorrência (evento) e a duração do acompanhamento livre da doença foram empregados na avaliação da SLD. Os casos que atingiram os desfechos (óbito e recorrência), respectivos a cada curva, dentro do período de análise foram considerados “não censurados”, assim como os casos que não atingiram o evento foram classificados em “censurados”. Para todos os cálculos e modelos estatísticos foi considerado a relação significativa do valor de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

A descrição das características clínico-patológicas referentes aos casos incluídos no estudo está detalhada na Tabela 3. Observamos na população analisada, predomínio de indivíduos do sexo masculino (76,47%), com idade inferior a média de 60 anos (52,1%; IC = 32 – 98 anos). Um total de 74,73% dos indivíduos eram tabagistas e 78,02%, etilistas, enquanto 42% dos indivíduos eram etilistas e tabagistas concomitantemente, sendo 86% deles do sexo masculino.

O sítio anatômico mais acometido foi a língua, com 68,90% dos casos, sendo seguido pelo assoalho bucal (13,44%) e outros subsítios (palato duro, área retromolar, gengiva, vestíbulo e mucosa jugal). Tumores de tamanho T1/T2 foram observados em 60 indivíduos (53,09%), sem metástase linfonodal (N0; 58,87%). Estádio avançado (estádios III/IV) no momento do diagnóstico foi observado em 61,68% dos casos.

Tabela 3 Características clínico-patológicas dos indivíduos com CEO (n=118).

Características clínico-patológicas		N	(%)
Sexo	Masculino	91	77,12
	Feminino	27	22,88
Idade (anos)	≤ 60 anos	62	52,54
Tabagismo	Sim	71	74,73
	Não	24	25,26
Etilismo	Sim	71	78,02
	Não	20	21,97
Sítio Anatômico	Língua	82	69,49
	Assoalho	16	13,56
	Outros	20	16,95
Tamanho do Tumor	T1/2	60	53,09
	T3/4	53	45,68
Metástase linfonodal	N0	63	58,87
	N+	44	41,12
Estadiamento	I/II	41	38,31
	III/IV	66	61,68

*Não informado: Tabagismo (n=23); Etilismo (n=27); Tamanho do tumor (n=5); Metástase linfonodal (n=11); Estadiamento (n=11). N0: ausência de metástase linfonodal; N+: presença de metástase linfonodal

5.1 Imuno-histoquímica

A análise da expressão de Plk1 pela técnica de imuno-histoquímica foi realizada em 109 amostras de CEO. Imunomarcção nuclear de Plk1 nos espécimes de epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor (superfície tumoral e front de invasão tumoral) está representada na Figura 9. Observa-se a imunomarcção da proteína nas camadas basal e parabasal no epitélio adjacente ao tumor na intensidade fraca (Figura 9A) e imunomarcção forte na região de displasia (Figura 9B). Na região tumoral verifica imunomarcção forte (9C) e fraca (9D), seguidas pelos controles positivo (9E) e negativo (9F). O ponto de corte para caracterização das amostras em alta e baixa expressão foi baseado na mediana da expressão da proteína na região do epitélio adjacente ao tumor, H-score em 30.

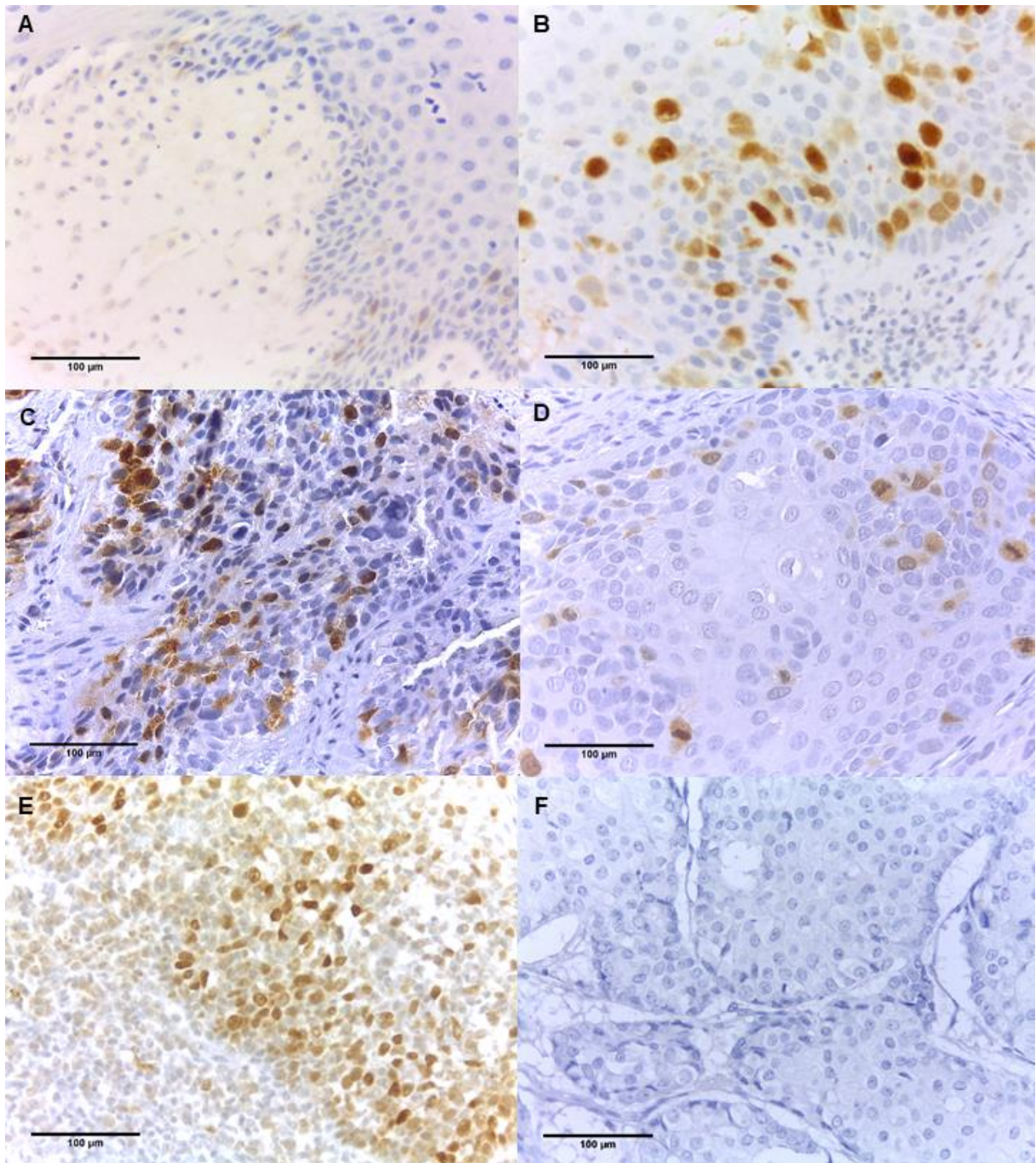


Figura 9 Expressão nuclear de Plk1 na progressão tumoral em CEO. Imunomarcção fraca em epitélio adjacente ao tumor (A), imunomarcção forte no tecido displásico (B), tecido tumoral com intensidade forte (C) e fraca (D), controle positivo com adenocarcinoma de cólon humano (E) e controle negativo (F). Magnificações originais de 400x.

A expressão de Plk1 nos diferentes segmentos do tecido (epitélio adjacente ao tumor, displasia e tumor) foi analisada com o intuito de avaliar a sua aplicação como biomarcador de progressão tumoral. Do total de 109 amostras de CEO, 43 amostras apresentavam epitélio adjacente ao tumor e 56 tecido displásico. Quando

agrupamos os segmentos provenientes de um mesmo indivíduo, foi possível avaliar as regiões de epitélio adjacente ao tumor e displasia de 26 indivíduos; epitélio adjacente ao tumor e tumor (n = 39); displasia e tumor (n = 51) e com os três segmentos em um mesmo indivíduo presente em 24 casos, como pode ser observado na Figura 10.

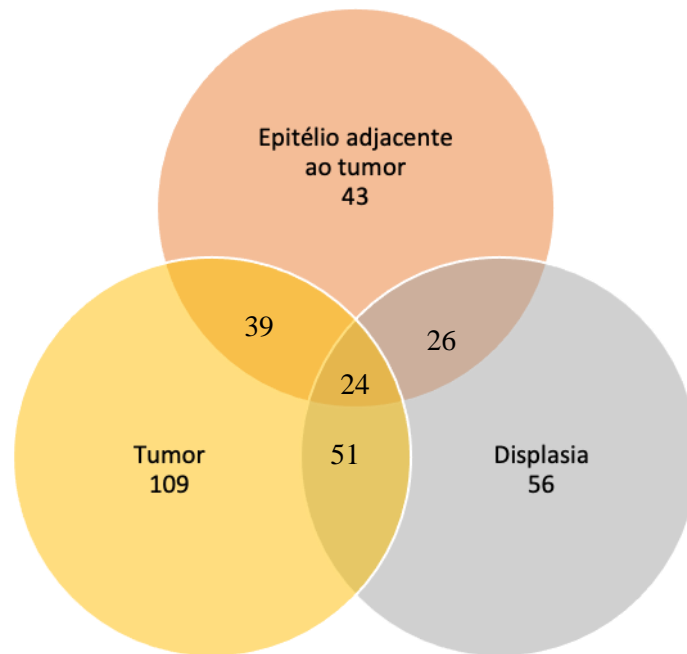


Figura 10 Quantitativo de amostras analisadas para a expressão de Plk1 nas diferentes regiões. O número total de pacientes analisados foram 109, apresentando 24 indivíduos com amostras nos três segmentos (epitélio adjacente ao tumor e displasia e tumor), 26 indivíduos com amostras nos segmentos epitélio adjacente ao tumor e displasia, 39 indivíduos com amostras nos segmentos epitélio adjacente ao tumor e tumor, e 51 indivíduos com amostras nos segmentos displasia e tumor.

Na tabela 4, nota-se o aumento da expressão da proteína nos diferentes segmentos, com relação significativa entre os pares, epitélio adjacente ao tumor e os outros dois segmentos (displasia e tumor) ($p = 0,001$). Dado publicado pelo grupo em conjunto com outros marcadores estudados em pacientes com CEO (PANSINI et al., 2021).

Tabela 4 Perfil de expressão da proteína Plk1 entre os pares epitélio adjacente ao tumor, displasia e CEO (n=109).

Segmentos	Média	SD	P
Eptélio adjacente	29,54 ^{a,b}	28,63	0,001**
Displasia	47,14 ^a	35,49	
Tumor	69,05 ^b	62,68	

SD: desvio padrão

^{a, b} Refere-se ao resultado do teste post-hoc de Bonferroni. A média de letras diferentes entre os grupos indica diferença significativa entre eles.

A partir da análise da expressão de Plk1 no tecido tumoral (Tabela 5), observamos a associação da alta intensidade com as variáveis tamanho do tumor (T3/4), metástase linfonodal (N+) e estadiamento (III/IV) ($p = 0,0001$). Em contrapartida a baixa expressão mostrou correlação ao menor tamanho do tumor (T1/2), ausência de comprometimento linfonodal (N0) e estádios iniciais (I/II) ($p = 0,0001$). Estes resultados indicam que a maior expressão da proteína está relacionada a estádios mais avançados do tumor.

Tabela 5 Análise da expressão de Plk1 no tumor e sua associação com as variáveis clínicas e fatores de risco (n=94).

Variáveis clínicas		Plk1				P
		Baixa	(%)	Alta	(%)	
Sexo	Masculino	54	57,44	19	20,21	0,036*
	Feminino	20	21,27	1	1,06	
Tabagismo	Sim	32	34,04	11	11,70	0,484
	Não	24	25,53	7	7,44	
Etilismo	Sim	32	34,04	13	13,82	0,590
	Não	14	14,89	4	4,25	
Sítio Anatômico	Língua	54	57,44	14	14,89	0,887
	Assoalho	6	6,38	2	2,12	
	Outros	14	14,89	4	4,25	
Tamanho do Tumor	T1/2	50	53,19	2	2,12	0,0001*
	T3/4	20	21,27	18	19,14	
Metástase linfonodal	N0	43	45,74	4	4,25	0,0001*
	N+	21	22,34	16	17,02	
Estadiamento	I/II	39	41,48	1	1,06	0,0001*
	III/IV	34	36,17	19	20,21	
Profundidade de invasão (DOI)	> 5	46	48,93	12	12,76	0,680
	5 < 10	9	9,57	1	1,06	
	< 10	6	6,38	2	2,12	
Gradação tumoral	Bem diferenciado	25	26,59	10	10,63	0,340
	Moderadamente	41	43,61	10	10,63	
	Pouco diferenciado	6	6,38	0	0	
Invasão Linfovascular	Sim	60	63,82	17	18,08	0,575
	Não	7	7,44	3	3,19	
Invasão perineural	Sim	6	6,38	2	2,12	0,764
	Não	3	3,19	1	1,06	
Padrão de invasão	I/II	17	18,08	3	3,19	0,480
	III/IV	56	59,57	16	17,02	
Linfócitos Infiltrantes de Tumor (TIL)	Baixa	17	18,08	3	3,19	0,194
	Moderada	38	40,42	15	15,95	
	Alta	17	18,08	2	2,12	
Óbito	Sim	31	32,97	11	11,70	0,134
	Não	41	43,61	7	7,44	
Recidiva	Sim	21	22,34	6	6,38	0,326
	Não	39	41,48	7	7,44	

*Teste de Qui-quadrado (p < 0,05)

5.2 RT-qPCR

A expressão dos genes *PLK1* e *FOXM1* foi realizada em 21 fragmentos tumorais, dos quais foram evidenciados expressão em 17 tecidos tumorais. Expressão elevada de *PLK1* foi observada em 11 amostras (11, 48, 109, 114, 182, 207, 230, 241, 245, 317 e 402) em relação ao controle de reação, gengiva de indivíduo saudável. Contudo, as amostras 230 e 317 tiveram uma variação significativa quando comparada ao controle (teste de Dunnett $p < 0,0001$), assim como essas amostras tiveram uma expressão diferenciada quando em paridade às demais pelo teste de Tukey ($p < 0,0001$), como mostrado na Figura 11. *FOXM1* não apresentou expressão relativa no grupo amostral, com isso não foi realizada a imunohistoquímica e a análise do status metilação do DNA para *FOXM1*.

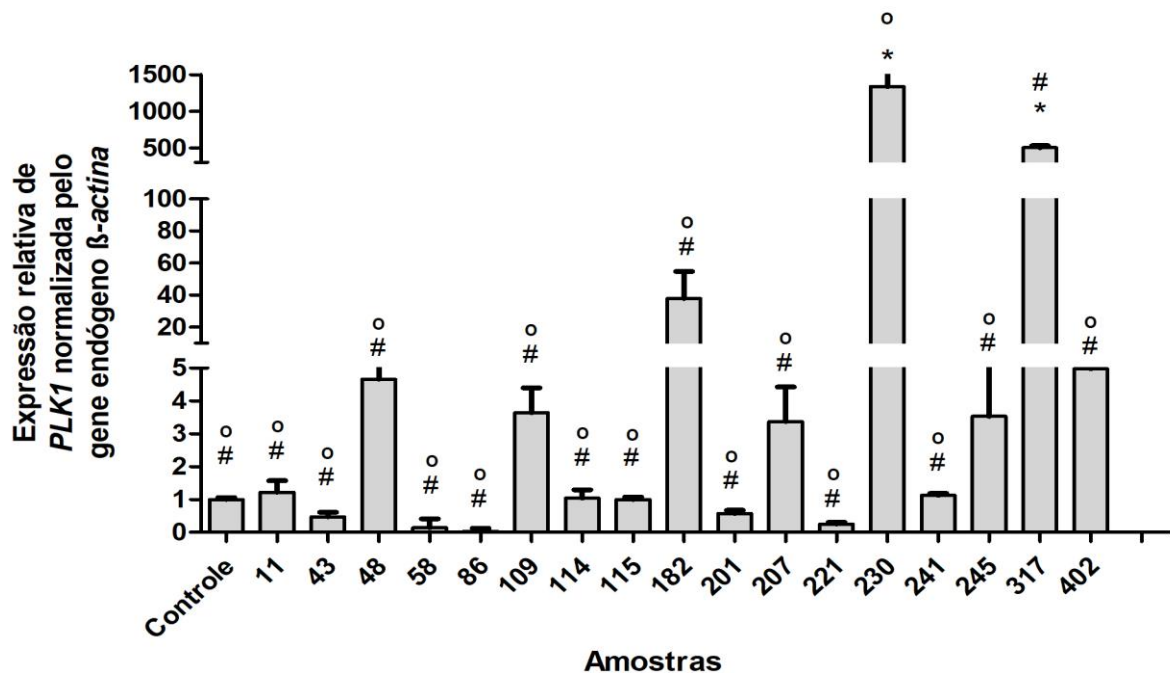


Figura 11 Expressão Relativa de *PLK1* em carcinoma epidermoide oral. * diferem significativamente do controle através do teste de Dunnett ($p < 0,0001$). # diferem significativamente da amostra 230 através do teste de Tukey ($p < 0,0001$). ° diferem significativamente da amostra 317 através do teste de Tukey ($p < 0,0001$) Aplicação de ANOVA seguida do teste de Dunnett ou Tukey nas análises estatísticas. Os níveis de expressão foram calibrados de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), usando o gene constitutivamente expresso β -actina como controle endógeno. As reações de RT-qPCR foram preparadas em triplicata e os resultados sendo demonstrados como média \pm desvio padrão.

5.3 MethyLight

O status de metilação da região promotora do gene *PLK1* foi avaliado em 17 indivíduos, sendo retirado das análises os pacientes que não apresentaram amplificação do gene *COL2A1* (n = 2). Do total analisado três pacientes dispunham de amostras de plasma e soro, 13 indivíduos com amostras de soro antes do início do tratamento inicial (diagnóstico), dentre os quais oito apresentavam soro do 1º acompanhamento (F1) e cinco pacientes amostras de soro do 2º acompanhamento (F2), dois indivíduos não apresentaram amplificação dos alvos e do endógeno. Como controle foram analisadas amostras de soro (n = 3) e plasma (n = 3) de indivíduos saudáveis.

Os controles metilados modificados por bissulfito apresentaram status de metilação do DNA para amostras de soro, enquanto amostras de plasma somente o gene endógeno amplificou. Os controles de soro modificados por bissulfito apresentaram amplificação das duas regiões de *PLK1* (metilada e não-metilada). Em relação às amostras de soro e plasma pareadas dos pacientes, apenas um indivíduo obteve amplificação das duas regiões na amostra de soro; um demonstrou status metilado no soro e não-metilado no plasma; um paciente apresentou apenas amplificação do gene endógeno nas amostras (soro e plasma), os outros três não apresentaram o gene endógeno. Quando avaliadas as amostras coletadas no momento do diagnóstico observou-se que duas tiveram status não-metilado, enquanto um apresentou status metilado e três amplificaram as duas regiões. Avaliando os pacientes que dispunham de amostras coletadas nos acompanhamentos foi verificado que dois indivíduos amplificaram a sequência não-metilada e um paciente a região metilada em F1, e dois apresentaram status de metilação em F2 (Figura 12).

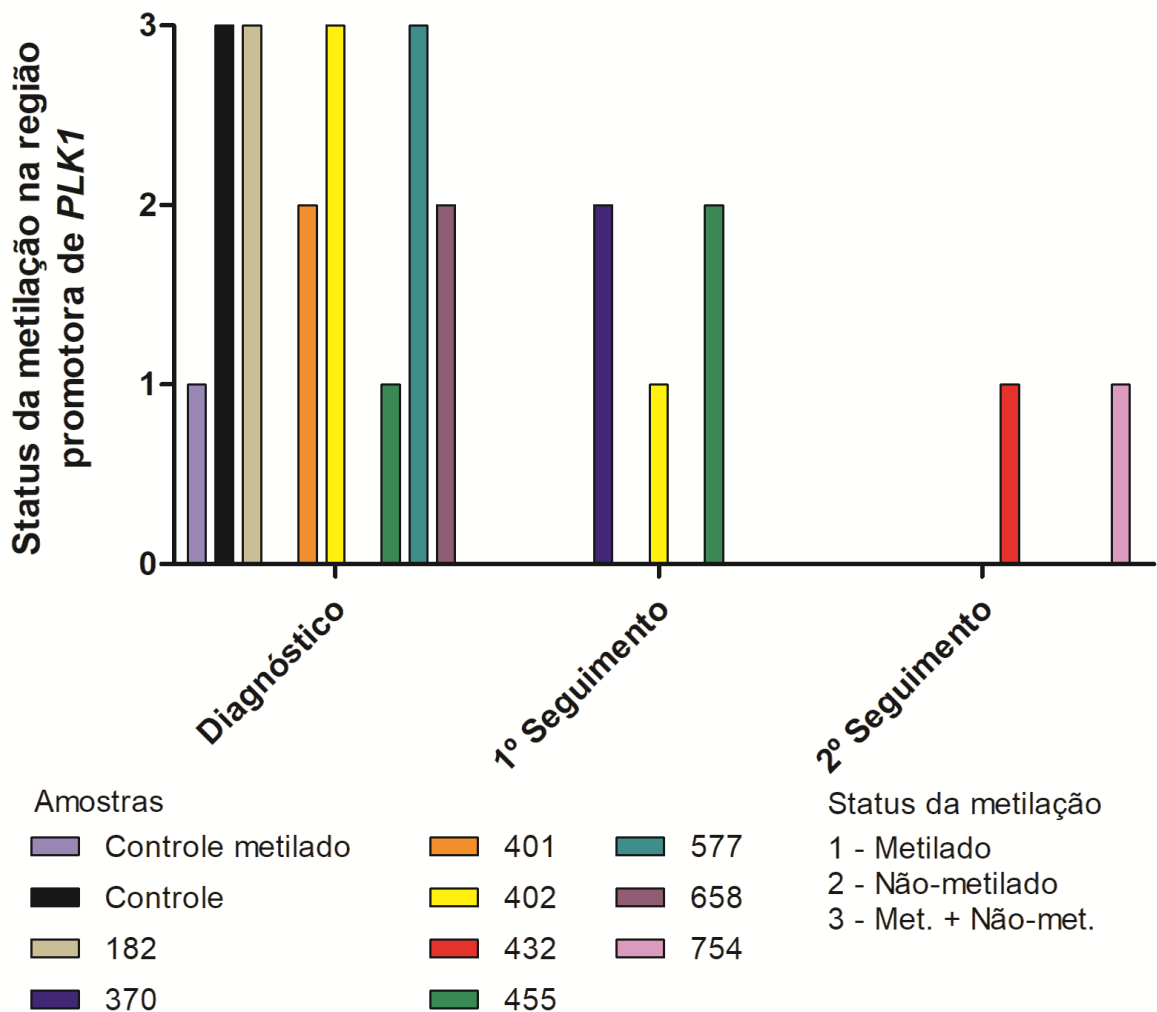


Figura 12 Status da metilação do DNA na região promotora de *PLK1*. Representação dos pacientes que apresentaram amplificação do gene alvo nas regiões do DNA metiladas (1), não-metiladas (2) e em ambas as regiões (3) em amostras de soro, assim como o gene endógeno (0), nas coletas de material ocorridas no momento do diagnóstico, 1º seguimento (F1) e 2º seguimento (F2) dos acompanhamentos e os controles de reação metilado e apenas modificado por bissulfito. As amostras que apresentaram amplificação nas regiões foram: **metilada** - diagnóstico (455); F1 (402); F2 (432 e 754); **não-metilada** - diagnóstico (401 e 658); F1 (370 e 455); e **ambas as regiões** - diagnóstico (182, 402 e 577).

A Tabela 6 mostra o status de metilação da região promotora de *PLK1* analisado em seis indivíduos com amostras de soro no momento do diagnóstico e suas características clínico-patológicas, onde podemos notar que não houve correlação significativa entre as variáveis ($p > 0,05$). Observa-se que em amostras que amplificaram a região não-metilada os pacientes apresentavam idade superior à média de 58 anos (20%; IC = 35 – 82 anos), sendo do sexo masculino (33,3%), etilistas (33,3%) em estágio inicial da doença (33,3%).

Tabela 6 Características clínico-patológicas dos indivíduos com amostras de soro no momento do diagnóstico (n=6) de CEO e o status de metilação do DNA da região promotora de *PLK1*.

Variáveis clínicas		<i>PLK1</i>						P
		Metilada	(%)	Não-metilada	(%)	Metilada + Não-metilada	(%)	
Idade	<58	0	0	0	0	1	16,6	0,549
	≥58	1	16,6	2	33,3	2	33,3	
Sexo	Masculino	1	16,6	2	33,3	2	33,3	0,549
	Feminino	0	0	0	0	1	16,6	
Tabagismo	Sim	0	0	1	16,6	1	16,6	0,687
	Não	1	16,6	1	16,6	2	33,3	
Etilismo	Sim	0	0	2	33,3	1	16,6	0,189
	Não	1	16,6	0	0	2	33,3	
Sítio Anatômico	Língua	0	0	0	0	3	50,0	0,112
	Assoalho	1	16,6	1	16,6	0	0	
	Outros	0	0	1	16,6	0	0	
Estádio	I/II	1	16,6	2	33,3	1	16,6	0,223
	III/IV	0	0	0	0	2	33,3	
Gradação tumoral	Bem diferenciado	0	0	1	16,6	3	50,0	0,083
	Moderadamente	1	16,6	0	0	0	0	
	Pouco diferenciado	0	0	1	16,6	0	0	
Tratamento Inicial	Cirurgia	0	0	1	16,6	2	33,3	0,384
	Cirurgia + Radio/Cirurgia + Radio + Químio	1	16,6	1	16,6	0	0	
	Radio/Radio + Químio	0	0	0	0	1	16,6	
		0	0	0	0	0	0	
Óbito	Sim	0	0	1	16,6	0	0	0,517
	Não	1	16,6	1	16,6	2	33,3	
Recidiva	Sim	1	16,6	1	16,6	2	33,3	0,687
	Não	0	0	1	16,6	1	16,6	

Teste de Qui-quadrado ($p < 0,05$)

Dentre o total dos indivíduos analisados ($n = 118$), seis pacientes dispunham de material para a realização das três metodologias (IHQ, RT-qPCR e *MethyLight*), em que todos apresentaram superexpressão proteica de Plk1 na região do tumor, três com expressão gênica e dois com status de metilação de ambas as regiões metilada e não-metilada do gene *PLK1* antes do início do tratamento.

5.4 Sobrevida Global e Sobrevida Livre de Doença

Avaliando os dados relativos à sobrevida em um tempo médio de 60 meses, identificamos que, na análise univariada, as variáveis maior tamanho do tumor primário e estádios avançados da doença estavam associados a piores taxas de sobrevida global (SG), $p < 0,001$ e $p = 0,001$, respectivamente. Aproximadamente metade dos pacientes com o maior tamanho do tumor primário (T3/4) e estadiamento avançado (III/IV), evoluíram com maior rapidez a óbito no período de 20 meses quando comparado ao acompanhamento no total dos meses. Estes resultados estão representados nas curvas de SG (Figura 13).

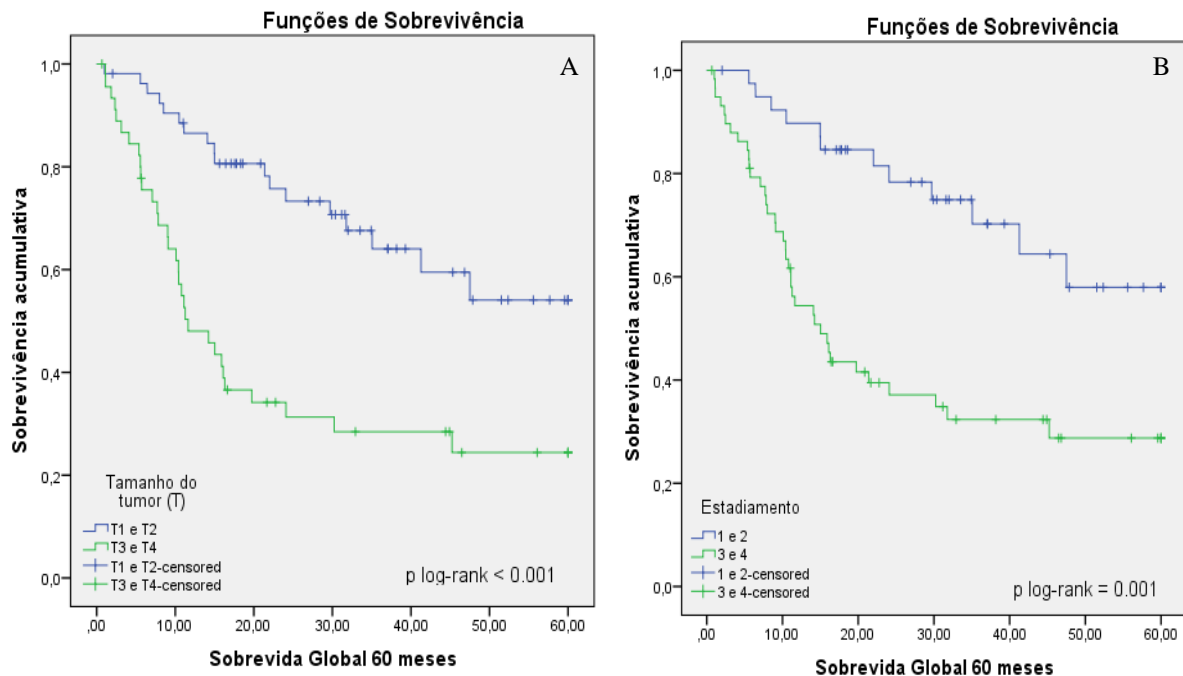


Figura 13 Curva de sobrevida global (SG) pelo método Kaplan-Meier e log-rank. (A) SG em relação ao tamanho do tumor primário ($p < 0,001$). (B) SG em relação estadiamento ($p = 0,001$).

Tendo por desfecho final a ocorrência de recidiva, a sobrevida livre de doença (SLD) foi correlacionada com as variáveis tamanho do tumor ($p = 0,022$), acometimento linfonodal ($p = 0,013$) e estadiamento ($p = 0,019$). Dentro do período de aproximadamente 20 meses, nota-se um número maior de casos de recidivas no grupo amostral nas variáveis maior tamanho do tumor (T3/4), metástase linfonodal (N+) e estádios avançados (III/IV) quando comparado ao período total analisado (Figura 14).

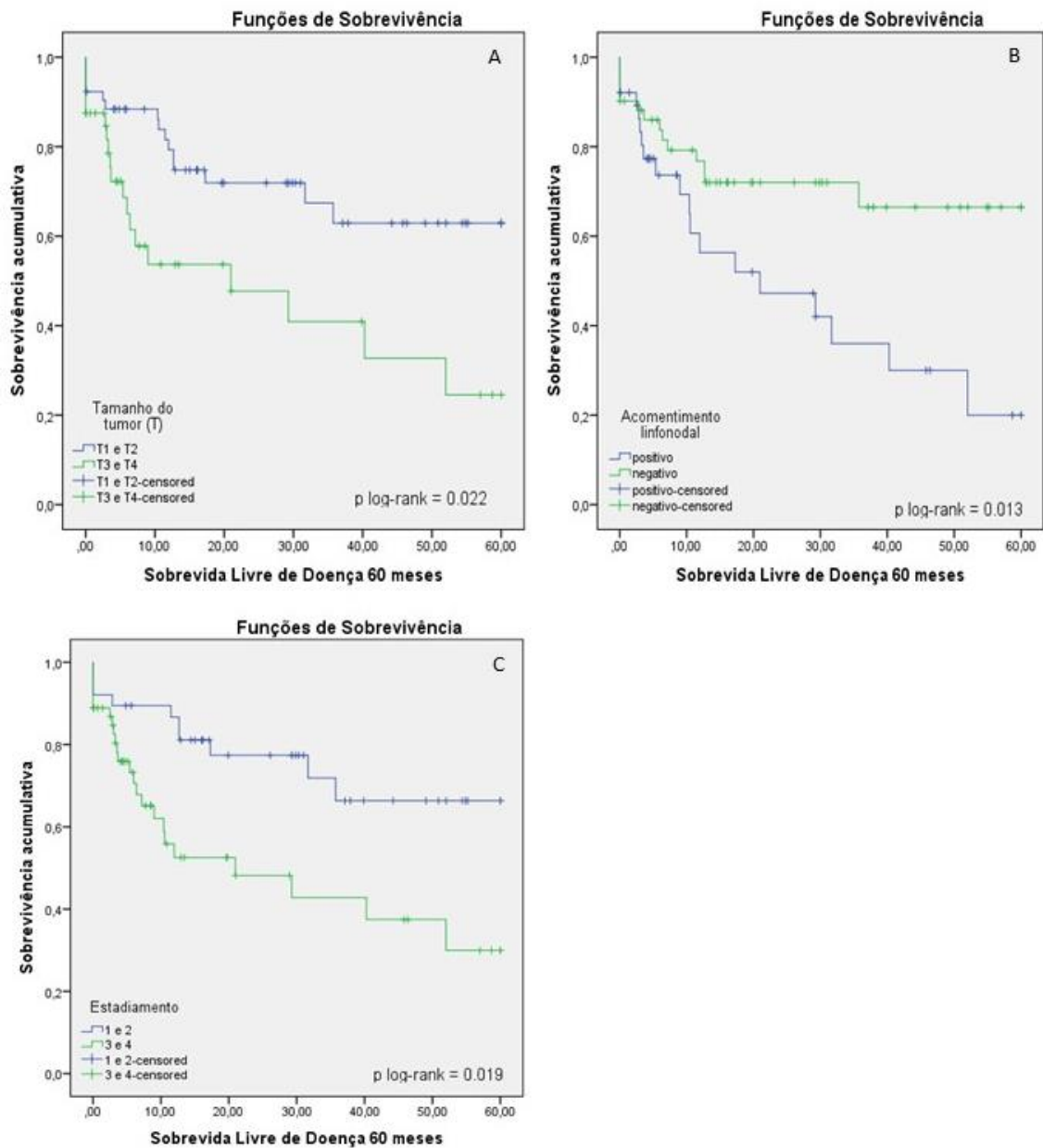


Figura 14 Curva de sobrevida livre de doença (SLD) pelo método Kaplan-Meier e log-rank. (A) SLD em relação ao tamanho do tumor primário ($p = 0,022$). (B) SLD em relação ao acometimento linfonodal ($p = 0,013$). (C) SLD em relação ao estadiamento ($p = 0,019$).

A expressão de Plk1 no tumor não mostrou ser um fator de prognóstico significativo para as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença (Figura 15).

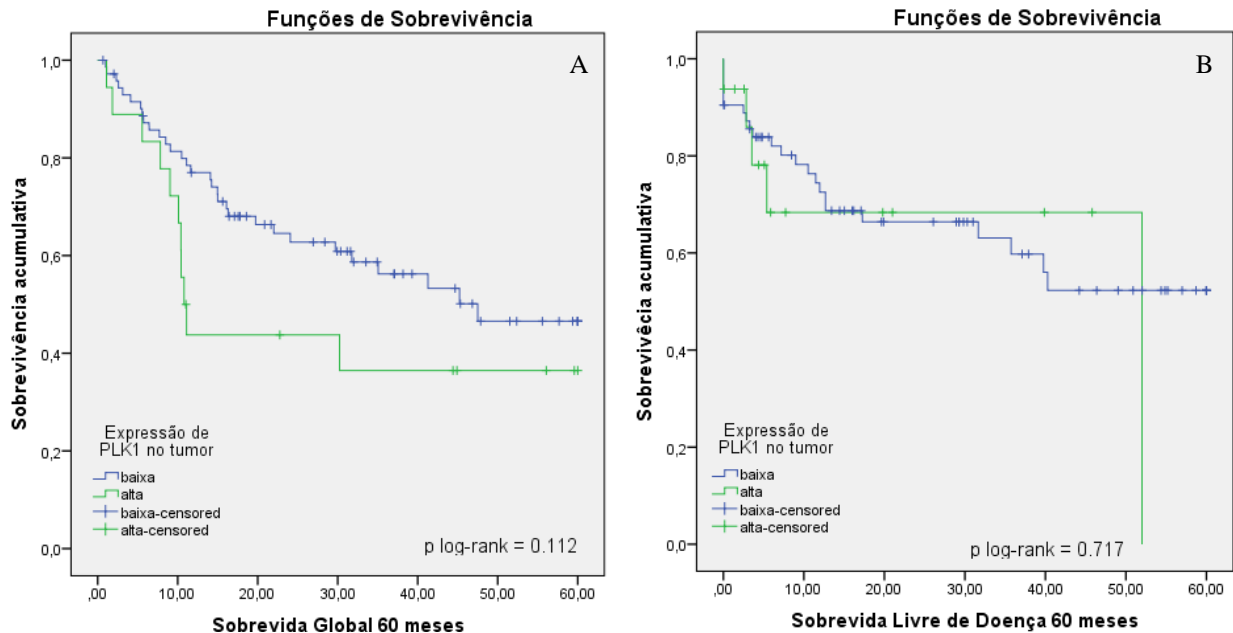


Figura 15 Curva de SG e SLD pelo método Kaplan-Meier e log-rank. (A) SG em relação à expressão de Plk1 na superfície tumoral ($p = 0,112$). (B) SLD em relação à expressão de Plk1 na superfície tumoral ($p = 0,717$).

Dentre os pacientes que apresentavam amostras de soro no momento do diagnóstico apenas um apresentou o desfecho óbito em aproximadamente 57 meses, tendo o status não-metilado evidenciado. Quatro indivíduos apresentaram recidiva em menos de 20 meses de acompanhamento, independente do status de metilação. Entretanto o status de metilação da região promotora de *PLK1* não demonstrou ter correlação com as curvas de SG ($p = 0,472$) e SLD ($p = 0,08$).

Observa-se então a presença de metilação e não-metilação da região promotora de *PLK1* antes do início do tratamento em amostras de soro, assim como sua expressão gênica aumentada em tumores quando comparada ao controle de reação, tendo a superexpressão da proteína ao longo dos segmentos epitélio adjacente ao tumor, displasia e região tumoral. Contudo Plk1 não mostrou ser um fator de prognóstico significativo para CEO pelo método Kaplan-Meier.

6 DISCUSSÃO

A fim de explorar os mecanismos epigenéticos que conduzem a expressão diferencial de *PLK1* em CEO, investigamos o status de metilação da região promotora, e sua expressão gênica e proteica no tumor. Em nosso estudo não foi possível associar a metilação do DNA na região promotora de *PLK1* com as variáveis clínico-patológicas ($p > 0,05$), entretanto quando comparadas a presença de metilação observamos que o estado não-metilado manifesta maior frequência em amostras antes do tratamento inicial, o que propicia a expressão gênica, enquanto no acompanhamento (F1 e F2 - final do tratamento inicial), nota-se o predomínio do status metilado. Nas amostras em que foram avaliadas a expressão gênica observou-se, também, a alta expressão proteica no tumor. A elevada expressão de Plk1 foi associada com tumores maiores (T3/4), ocorrência de metástase linfonodal (N+) e estadiamento avançado da doença (III/IV). Por outro lado, a baixa expressão apresentou correlação com o menor tamanho do tumor (T1/2), ausência de comprometimento linfonodal (N0) e estádios iniciais (I/II). Porém não apresentou associação com as curvas de sobrevida global e livre de doença. Verificamos que a expressão de Plk1 diferiu nos segmentos teciduais analisados, tendo um aumento nas regiões de displasia e tumor quando comparados ao epitélio adjacente ao tumor. A expressão relativa de *FoxM1* não foi expressiva nas amostras analisadas, podendo não exercer influência na ativação de Plk1. Identifica-se, então, o envolvimento da expressão de Plk1 com a progressão tumoral, onde a região do tumor e pacientes com diagnósticos mais avançados exibem a superexpressão da proteína.

A regulação de Plk1 ocorre através da dinâmica entre os processos de metilação e fosforilação. A taxa de metilação da região promotora de *PLK1* proporciona a ativação ou inativação de sua transcrição, estando relacionada à regulação do ciclo celular através da fosforilação de diversas vias responsáveis pela progressão celular (FELDMAN et al., 2019). Em nosso trabalho observamos o status não-metilado do DNA da região promotora de *PLK1* em amostras coletadas antes do início do tratamento de pacientes com CEO, o que contribui para o aumento da expressão da proteína. Estudos relatam que a falta de metilação em dois resíduos de aminoácidos de Plk1 (K209 e K413) possibilitam o aumento de sua atividade quinase contribuindo

para a aceleração da mitose, reparo de danos ao DNA, alinhamento e segregação cromossômica correta, e assim a proliferação celular (FELDMAN et al., 2019; LI, et al., 2019; YU, et al., 2020). Assim como a regulação aberrante propicia o desenvolvimento e progressão de células anormais, contribuindo para a evolução do câncer (HAN; LIU; XIANG, 2020). Deng et al. (2021), associaram o menor nível de metilação de *PLK1* em tumores primários de adenocarcinoma de pulmão à elevados níveis de transcrição e superexpressão de Plk1 quando comparado a amostras normais, porém em CE de pulmão o nível de metilação apresentava-se mais elevado. Diferença que pode ser explicada devido a expressão distinta da família de enzimas DNMT's por modificações pós-transcricionais, trasnlacionais ou pós-traducionais, como também a catalisação do sítio de metilação sem impacto na transcrição de *PLK1* (DENG et al., 2021).

Em tecidos proliferativos é comum a presença da alta expressão de Plk1, e sua ausência ou baixa expressão em tecidos normais. A ativação de Plk1, em níveis habituais, ocorre por estruturas de ligação ou “andaimes” (*scaffolds*), sendo o mais conhecido o complexo Auroa A/Bora que permite a fosforilação do resíduo de Thr210, possibilitando a continuidade da progressão celular, com o início da fase de mitose (COLICINO; HEHNLY, 2018).

Neste estudo, exploramos a estrutura de ligação de Plk1 com a proteína FoxM1, visto que é uma das vias responsáveis por sua transcrição. A expressão de FoxM1 é encarregada de regular diversas proteínas que estão relacionadas à progressão do ciclo celular, como também a manutenção da estabilidade e segregação cromossômica. *FOXM1* apresenta isoformas que podem levar à inativação (FoxM1a e -d) ou ativação (FoxM1b e -c) da expressão da proteína, podendo influenciar na regulação de Plk1 (JAISWAL; CHAKRABORTY; NAG, 2014). A superexpressão dessa proteína leva a um atraso no início da fase G2 que ocasiona erros na formação dos fusos, desalinhamento dos cromossomos, defeito na citocinese e falha na verificação do checkpoint do fuso mitótico. Assim como aumento no nível de expressão da proteína Plk1 na fase G2/M, também responsável pela correta formação dos fusos (LAOUKILI et al., 2005), gerando um feedback positivo aumentando ainda mais os níveis de Plk1 e a atividade de FoxM1 (FU; WEN, 2017) Níveis elevados de FoxM1 foram observados e correlacionados ao desenvolvimento de câncers de mama, cabeça e pescoço, pâncreas, pulmão e tireóide (LIAO et al.,

2018b). Em contra partida, com o silenciamento da expressão de FoxM1 é possível verificar a inibição do crescimento e metástase do câncer de nasofaringe (YU, Chao et al., 2015). Liao et al. (2018) apontaram vias de inibição de FoxM1 e seus efeitos na proliferação tumoral em níveis transcricionais, traducionais e pós-traducionais, além de interações com sítios específicos da proteína, como interação proteína-proteína, nuclear, localização e porção DBD (LIAO et al., 2018a). Em nosso trabalho, não distinguimos as isoformas de *FOXM1*, não sendo evidenciada expressão significativa na ativação de Plk1, indicando que a proteína FoxM1 possa estar inativada e outras vias exercendo maior efetividade em sua regulação.

Níveis elevados de Plk1 levam à propagação de anomalias referentes a formação do fuso e segregação cromossômica, ocasionada pela anulação do ponto de checagem G2/M (DE CÁRCER; MANNING; MALUMBRES, 2011; LIU, 2015), o que demonstra a correlação da alta expressão nos segmentos com a progressão do tumor observada em nosso estudo. Wu et al. (2016) relatam a influência de Plk1 como um regulador crítico na transição epitélio-mesenquimal no câncer de próstata, em que promove alterações morfológicas nas células epiteliais da próstata favorecendo a migração e invasão celular (WU et al., 2016). Kim et al. (2010), evidenciaram em seu trabalho a ação significativa de Plk1 na progressão tumoral em CEO, onde observaram maiores níveis da proteína na região do tumor quando comparado com tecidos normais, assim como a inibição da proteína ocasionando a diminuição da proliferação celular (KIM et al., 2010). Em pacientes com carcinoma epidermoide do esôfago foi verificada elevada expressão de Plk1 quando comparada ao tecido adjacente normal (ZHAO et al., 2010). Bem como, a alta expressão da proteína associada com graus de diferenciação e invasão tumoral, levando a maior recorrência e progressão do câncer de nasofaringe (SHI et al., 2010). Yamamoto et al. (2006) relatam uma sinergia entre elevados níveis de Plk1 e o carcinoma urotelial mais agressivo, devido a instabilidades cromossômicas geradas, propiciando maior capacidade de invasão a tecidos adjacentes pelas células mutadas (YAMAMOTO et al., 2006). Evidencia-se em nosso trabalho o papel primordial de Plk1 na progressão tumoral em CEO, estando sua expressão diferenciada nas regiões de epitélio-displasia-tumor e relacionada a estádios mais avançados da doença o que corrobora com a literatura sobre a atuação de Plk1 na transição epitélio-mesenquima e desenvolvimento do câncer.

6.1 Manuscrito 1 – Tumor-infiltrating lymphocytes are related to early-stage oral squamous cell carcinoma

Artigo submetido a Brazilian Oral Research – Qualis Capes B3

Author names and affiliations

Thabata Coeli Dias Damasceno¹ (Email address: thabata.damasceno@gmail.com)

Paola Fernandes Pansini¹ (Email address: paolafpansini@gmail.com)

Priscila Marinho de Abreu¹ (Email address: priscilamarinho84@gmail.com)

Isabella Bittencourt do Valle^{1,2} (Email address: isabellabdv@gmail.com)

José Roberto Vasconcelos de Podestá³ (Email address: podestajr@gmail.com)

Jeferson Lenzi³ (Email address: jefersonlenzi@hotmail.com)

Evandro Duccini de Souza³ (Email address: evandroduccini@gmail.com)

Ricardo Mai Rocha³ (Email address: ricardomai@gmail.com)

Hisham Mehanna⁴ (Email address: h.mehanna@bham.ac.uk)

Sandra Ventorin von Zeidler¹ (Email address: sandra.zeidler@ufes.br)

1 Biotechnology Post-graduation Program, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Espírito Santo, Brazil.

2 Department of Oral Pathology and Surgery, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

3 Oral Cancer Prevention and Early Detection Program, Head and Neck Surgery Division, Hospital Santa Rita de Cássia - SESA, Vitória, Espírito Santo, Brasil.

4 Institute of Head & Neck Studies and Education, University of Birmingham, Birmingham, UK.

Corresponding author: Sandra Ventorin von Zeidler D.D.S., MS, PhD

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia

Centro de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Espírito Santo.

Av. Marechal Campos, 1468 Maruípe, Vitória, ES, Brazil. ZIP Code 29.040-090. Telephone number: + 55 27 3335-7299 Fax number: + 55 27 3335-7290.

E-mail address: sandra.zeidler@ufes.br

ABSTRACT

Introduction: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is associated with high mortality rates and a worse prognosis. Thus, parameters that are more effective for patient stratification and that provide better prognostic information are essential. We proposed to evaluate tumor infiltrating lymphocytes (TIL) as prognostic markers for OSCC and their association with histopathological parameters.

Methods: TIL density was measured on hematoxylin and eosin slides of 106 individuals with OSCC recruited from Brazil (n=56) and United Kingdom (n=50). Clinicopathological features (e.g. sex, age, smoker, drinker, staging of malignant tumors, tumor grade and depth of invasion), pattern of invasion, lymphovascular and perineural invasion were analyzed. Survival curves were generated using the Kaplan–Meier method and the Cox proportional hazards model to identify prognostic factors.

Results: Patients with T1/T2 tumor size, no lymph node metastasis (N0), early stages and who had undergone surgery showed high TIL density and greater overall survival, whereas clinical stage III/IV and T3/T4 tumors had low TIL.

Conclusion: High-TIL density seem to influence tumor development by inhibiting cell proliferation. However, TIL did not prove to be a satisfactory prognostic marker for OSCC patients.

Keywords: oral cancer, tumor infiltrating lymphocytes, survival, prognostic marker, tumor development.

INTRODUCTION

The worldwide incidence of oral squamous cell carcinoma (OSCC) is 377,713 cases and the condition is substantially associated with high morbidity and mortality rates [1]. Over the last decades, the average survival of individuals with OSCC has shown no significant increase, even with new therapeutic approaches and advances in diagnostic and surgical techniques. Thus, the five-year survival rate for the disease has remained around 50 [2].

One of the main reasons for these high mortality rates is the lack of prognostic markers needed to support the clinical decision for more personalized treatment. In a simultaneous analysis of all criteria, the currently validated prognostic indicators for clinical care of OSCC patients are analysis of worst pattern of invasion (WPOI), lymphovascular invasion (LVI) and perineural invasion (PNI). However, these histopathological parameters are generally omitted in medical routine because they require surgical material, whereas most patients are referred to chemoradiation. Thus, the clinical staging system remains the most accurate method used to predict clinical outcome and to drive treatment decision in patients with OSCC. Certainly, the addition of depth of invasion (DOI) analysis and extranodal extension (ENE) to the 8th TNM Stage Edition is contributing to improved patient selection for treatment [3]. However, individuals with the same staging and submitted to the standard treatment protocol can show different outcomes, sometimes still showing reduced survival rates. Thus, more feasible parameters for clinical routine need to be investigated in order to stratify patients for best treatment choice, providing prognostic information essential for improving OSCC survival [4,5].

Immune cell infiltration into the tumor microenvironment is a representative pathological feature found in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC), with dense infiltrates often being considered to be an integral component of the lesion [6]. The cellular immune response in this microenvironment is regulated by the family of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) that can contribute to tumor inhibition or progression [7]. The premise of cancer immunoediting reveals that the elimination of cancer cells or immunological modulation of a developing cancer occurs through the recognition of tumor antigens by T cells, leading to the removal of initial tumor cells through the immune response. However, the immunosuppressive tumor microenvironment is also able to promote mechanisms of evasion from the immunological system, leading to tumor growth and aggressiveness [8].

In order to evaluate the dynamics between the immune system and cancer cells, studies using TILs as a prognostic tool have suggested better survival in the presence of elevated TIL density, as described in solid tumors, including carcinomas of the lung, gastrointestinal tract, genitourinary system, gynecologic system, and head and neck [9].

Recent studies have linked the role of TILs to favorable outcomes in individuals with OSCC in response to chemoradiotherapy [10,11]; however, so far their prognostic value has not been well established [6,10,11]. Some pathologists believe that TILs have a better predictive value compared to conventional TNM staging and other known histopathological features such as tumor grade. However, there is a lack of evidence about the prognostic value of TIL magnitude in OSCC [8] and no consensus has been reached thus far about its application. Thus, the aim of this study was to evaluate TILs as prognostic markers and to compare TIL density to the histopathological parameters most frequently used in OSCC.

MATERIALS AND METHODS

Individuals and clinicopathological data

We conducted a longitudinal analytical prospective study based on 106 individuals with a diagnosis of OSCC. The subjects were recruited between 2010 and 2015 at the Head and Neck Surgery Division of Santa Rita de Cássia Hospital (AFECC) and at the University Hospital Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM), both located in Espírito Santo (Brazil), and at the University Hospitals Coventry and Warwickshire NHS Trust (United Kingdom). Samples and data were obtained from 57 individuals from Brazil (51.8%) and 51 from the United Kingdom (48.2%). The study was approved by the Research Ethics Committee of the Integrated Center for Health Care, Vitória - ES (Protocol No 318/2011) and the NRES Committee West Midlands - Coventry & Warwickshire (EC.10.H1210.9).

Eligibility criteria included individuals who had not undergone any previous antineoplastic treatment and whose tissue samples were available for histological analysis. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumors were selected when in good condition with more than 75% of the tumor located in the tissue area. Only primary oral cavity tumors were included, comprising tongue (C02.0-C02.3, C02.8, C02.9), gingiva (C03.0, C03.1, C03.9), floor of the mouth (C04.0, C04.1, C04.8, C04.9), hard palate (C05.0), cheek (C06.0), mouth vestibule (C06.1), and retromolar area (C06.2), in accordance with the International Classification of Diseases (ICD-10) version 10.

Clinical stage was classified according to the American Joint Committee on Cancer

(AJCC 8th edition), that proposed the Staging of Malignant Tumors – TNM with the incorporation of depth of invasion (DOI) and extranodal extension (ENE). The DOI was measured in millimeters and a "plumb line" perpendicular to the basement membrane adjacent to the mucosal tumor was marked at the deepest site of invasion, ranging from 0 to 10 mm, using the Case Viewer software for Windows (version 2.4 3DHISTCH Ltd®, Hungary)[3].

Demographic and lifestyle data such as sex, age and alcohol and tobacco consumption were obtained by interviewing the patients. Individuals without a history of alcohol or tobacco consumption for at least one year were considered to be former alcoholics and former smokers, respectively.

Patient treatment modalities included: exclusive surgery; surgery associated with radiotherapy and/or chemoradiotherapy; and radiotherapy alone or combined with chemotherapy. Patients were followed for at least 24 months or until death. Clinical outcomes were recorded as tumor remission, tumor relapse or death.

Histopathological analysis

The FFPE tumor specimens selected were cut into 5 µm sections on a microtome (Leica RM2165), stained with hematoxylin & eosin (H&E) and analysed with a Zeiss® light microscope (Jena, Germany). The more representative slides were scanned on the Panoramic digital slide scanner platform (3DHISTECH®, Budapest, Hungary) and evaluated with the Case Viewer image analysis software (version 2.4 3DHISTCH®, Budapest, Hungary).

The TIL pattern was measured in the whole section at 25X magnification considering peritumoral and intratumoral regions. TIL density was scored as high (diffuse; present in >80% of tumor/stroma), moderate (patchy; present in 20-80% of tumor/stroma) or low (weak/absent; present in <20% of tumor/stroma) according to the criteria established and validated by Marsh et al. (2011) [12,13].

Pattern of invasion (POI) of the tumor was evaluated in at 200X magnification and classified into four categories: I, compressive and well delineated infiltrating borders; II, infiltrating with solid cords; III, small groups or strings of infiltrating cells; IV, marked dissociation into small groups or individualized cells [14].

Lymphovascular Invasion (LVI) and Perineural Invasion (PNI) were characterized according to the parameters established by The Royal College of Pathologists (UK) [15], considering the presence of neoplastic cells within blood vessels and/or lymphatic arteries and perineural space, respectively.

Tumor grade was evaluated according to the 2017 criteria of the World Health Organization and defined as: well differentiated, tissue architecture resembles the normal pattern of the squamous epithelium; moderately differentiated, with some degree of cellular and nuclear pleomorphism, mitotic activity and little keratinization; and poorly differentiated, with the predominance of immature cells, numerous typical and atypical mitoses, and absence of keratinization [16].

Histopathological analysis was performed independently by two experienced pathologists. In cases of discrepancy, the slides were reviewed, and a consensus was obtained as the final result.

Statistical analysis

The SPSS software v. 25 (Statistical Package for the Social Sciences, Chicago, USA) was used for data analysis. The association of clinical and histopathological features was determined by the Chi-square test and Fisher's exact probability test. Overall Survival (OS) and Disease-Free Survival (DFS) curves were calculated using the Kaplan–Meier method and compared by the log-rank test. The Cox proportional hazards model was used to estimate variables with a significant independent prognostic model. The level of significance was accepted at $p \leq 0.05$ in all analyses.

RESULTS

The mean age of the 108 patients was 60.5 years (CI = 32 - 98 years) and most subjects were males (77.7%). The investigation of risk factors revealed that 47.2% of the patients were heavy smokers, 48.1% had a history of excessive alcohol consumption and 39.8% were both smokers and excessive alcohol drinkers. The most common anatomical subsite was the tongue, as observed in 69.4% of the cases. Clinical staging was T1/T2 in 53 individuals (49%) and 60 (55.5%) patients did not show lymph node metastasis (N0). Most patients (56.4%) were in advanced stages (stages III/IV) at the time of diagnosis.

TIL density in the peritumoral and intratumoral region was categorized as low (24%), moderate (55.5%) and high (18.5%) (Figure 1). The association between TIL and clinicopathological features is summarized in Table 1. Low TIL density was found to correlate with tumor size T3/T4 ($p = 0.001$) and clinical stage III/IV ($p = 0.011$); while high TIL density was associated with T1/T2 tumor size ($p = 0.001$) and clinical stage I/II ($p = 0.01$), with these patients being surgically treated ($p = 0.046$). TIL density was higher in POI III/IV (79.1%) in the presence of lymphovascular (87.9%) and perineural invasion (63.8%). Most of the tumors analysed were moderately differentiated (55.5%), while 35.1% were well differentiated.

Mean survival time was 25.42 months (range: 0.67 to 60 months). Local recurrence occurred in 32% of cases (37.6 months/CI = 31.6 - 43.6 months) and 47.2% of the individuals evaluated died (34.8 months/CI = 29.9 - 39.6 months).

Additionally, estimates of overall survival and disease-free survival did not show a correlation with TIL density ($p = 0.145$ and $p = 0.103$, respectively), as illustrated in Figure 2. However, we observed an increase in average overall survival in patients with high TIL density (41.69 months /CI = 30.84 - 52.54 months) when compared to patients with low TIL density (27.88 months/CI = 19.06 - 36.70 months). Recurrence was late in patients with high TIL density (46.87 months/CI = 36.59 - 57.15) when compared to other densities (moderate, 32.10 months/CI = 23.63 - 40.56 months; low, 40.71 months/CI = 30.06 - 51.36 months).

Primary tumor size, lymph node metastasis, clinical stage and surgical treatment were significantly related to overall survival. Individuals with tumor size T1/T2 ($p = 0.0001$) had fewer lymph node metastases ($p = 0.005$) and, as expected, had a higher overall survival rate than individuals with larger tumors (T3/T4) and more lymph node metastases (N+). Clinical stages I/II ($p = 0.0001$) and surgery ($p = 0.006$) as the first choice treatment were also related to better overall survival at 60 months, as can be seen in the survival data shown in Table 1 (supplementary material). Furthermore, clinical stage III/IV remained a significant prognostic factor in multivariate analysis for OS, increasing the risk of patient death by 40x (Table 2, HR 40.29; 95% C.I. = 2.71, 599.18; $p = 0.007$).

DISCUSSION

Immune cells infiltrating tumors have been considered to be prognostic indicators in several human malignancies. In order to promote the application of TIL density to clinical practice, studies have addressed various methods for TIL quantification [9,17,18]. In the present study, we quantified TIL density on H&E slides, widely available in clinical routine. This method was validated by Ward et al. [13] who quantified TIL density in triplicate on H&E slides of representative intratumoral areas from patients with OSCC compared to immunohistochemistry of T lymphocyte markers such as FoxP3, regulatory T cells and B lymphocytes, demonstrating the effectiveness of H&E application and TIL density classification.

Our results showed that high TIL density is correlated with T1/T2 primary tumor and clinical stage I/II. These findings suggest that during cancer progression the cell immune response is reduced, with a consequent increase in lymphocytic infiltrate in the region of neoplastic proliferation, retarding tumor growth. Hori et al. [19] observed that the percentage of CD4+ is higher in patients with early stages than in healthy individuals, and decrease in advanced stages. Similarly, Suárez-Sánchez et al. [20] observed a correlation between a high degree of inflammatory infiltrate (stromal CD20+ TIL) in smaller tumors and early stages. Zhou et al. [4] reported that high densities of CD3+ and CD8+ TILs were associated with better survival in OSCC patients. Taken together, these lines of evidence support the idea that TIL density influences tumor progression, with the immune system allowing the destruction of tumor cells in the elimination phase (immunoediting theory), possibly reflecting an antitumor effect against OSCC that could be exploited for therapeutic intervention [21].

Our data confirmed a correlation between low TIL density and larger tumors (T3/T4). It has been proposed that larger tumors may have a reduced TIL density due to progressive immune escape mechanisms of tumor cells. Cancer cells release immunosuppressive or pro-apoptotic factors against T lymphocytes and their receptors [22]. It has been demonstrated that surface protein (PDL-1) expressed in neoplastic cells blocks the function of T lymphocytes, reducing the amount of infiltrated lymphocytes in T3/T4 size tumors [23].

Another mechanism that contributes to the reduction of TIL density leading to cellular

immunosuppression is the continuous exposure to toxic substances, many of them carcinogenic, present in tobacco which are related to damage and mutations of oral keratinocytes and antigen-presenting cells of the oral mucosa [24,25]. In the present study, 42% of the OSCC patients were both smokers and alcoholics, conditions that may contribute to the reduction of TIL density. Although smokers had a reduced TIL density (25.3%) compared to non-smokers (14.5%), the difference was nonsignificant (Table 1). Russo et al. [26] argued that a higher occurrence of OSCC has been associated with smoking, this being considered one of the main risk factors for the occurrence of the disease. In the present study, TIL density showed no significant relationship with alcohol consumption. Since alcoholic beverage intake may act as an immunosuppressive factor in the inflammatory response and as a solvent, it could facilitate the absorption of the carcinogens found in tobacco by the oral mucosa, leading to the increased effect of these substances on cancer progression [27].

Of note, high TIL density was observed here in POI III/IV and in cases with lymphovascular and perineural invasion, supporting the influence of tumor stroma together with the lymphocytic infiltrate on the release of substances in the tumor microenvironment that can act as extracellular signals and play a fundamental role in the tumor invasion pattern [28]. However, we did not observe a correlation between TIL and POI, LVI and PNI, possibly due to the small number of cases with available surgical resection blocks, this being a limitation of the present study. This result was also observed in the study of Chen et al. [29], who analyzed PNI and LVI as risk factors, but did not find significant correlations for disease control and overall survival of OSCC individuals.

Our results confirmed that smaller tumors, absence of lymph node involvement and early staging showed a stronger correlation with better overall survival in OSCC patients. Individuals with clinical stage III/IV have a 40-fold higher risk of death compared to those with early stages, underscoring the importance of these variables in determining treatment [3]. In our study, there was no correlation between TIL density, overall survival and disease-free survival. However, we observed that, the higher the TIL density, the greater the patient's survival and the later the time of disease recurrence. This evidence was also obtained by Affonso et al. [30] and can be explained by the mechanisms of tumor elimination and escape from immune suppression present in the immunoediting theory. From the recognition of tumor

antigens, the immune system can lead to the elimination of tumor cells or to the modulation of cancer development. An effective immune response leads to increased immune recognition for tumor elimination by conventional mechanisms. This distinguishes the relationship between tumor cells and immune cells, with the immune system having a positive effect by eliminating tumor cells and higher TIL density favoring the prognosis. However, the immune response can have a controversial effect since the immunological microenvironment can stimulate the aggressiveness of tumor cells, enabling them to prevent the immune response by the occurrence of errors in the processing and expression of low immunogenic antigens, undue interactions and the development of an immunosuppressive microenvironment [23].

In the present investigation, the surgical treatment modality was associated with higher TIL density and better survival of these patients compared to radiation or chemoradiation. Studies have suggested that lymphocyte infiltrates act more predictively on primary treatment outcomes and stratification than on prognosis [17]. Currently, only tumor staging is used for the choice of treatment and therefore individuals with early staging usually undergo surgery, which is related to lower recurrence rates and a better prognosis. Thus, TIL density could be a useful marker for the stratification of patients with early OSCC, contributing to therapeutic management [9].

In summary, accumulated evidence demonstrates that high TIL density influences tumor development, limiting tumor growth. Thus, our findings improve the understanding of the oral cancer immune response according to disease progression, highlighting the central role of lymphocyte infiltration in the tumor microenvironment. Nonetheless, in our study, TIL density was not a satisfactory predictor of prognosis in patients with OSCC and its use should be limited to patient stratification. Hence, further studies are required to determine how to better indicate treatment based on cellularity content, as demonstrated here by TIL density evaluation.

REFERENCES

1. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality

- Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer Journal for Clinicians*. 2021;71: 209–249. doi:10.3322/caac.21660
2. Hsu H, Wall NR, Hsueh C, Kim S, Ferris RL, Chen C, et al. Combination antiangiogenic therapy and radiation in head and neck cancers. *Oral Oncology*. 2014;50: 19–26. doi:10.1016/j.oraloncology.2013.10.003
 3. Amin MB, Edge SB, Gfeene FL, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al., editors. *AJCC Cancer Staging Manual* [Internet]. 8a. 2017. doi:10.1007/978-3-319-40618-3
 4. Zhou C, Wu Y, Jiang L, Li Z, Diao P, Wang D, et al. Density and location of CD3+and CD8+tumor-infiltrating lymphocytes correlate with prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2018;47: 359–367. doi:10.1111/jop.12698
 5. Diao P, Wu Y, Li J, Zhang W, Huang R, Zhou C, et al. Preoperative systemic immune-inflammation index predicts prognosis of patients with oral squamous cell carcinoma after curative resection. *Journal of translational medicine*. 2018;16: 365. doi:10.1186/s12967-018-1742-x
 6. Lei Y, Xie Y, Tan YS, Prince ME, Moyer JS, Wolf GT. Telltale Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Oral, Head & Neck Cancer. *Oral Oncol*. 2017;61: 159–165. doi:10.1016/j.oraloncology.2016.08.003.Telltale
 7. Moreira G, Fulgêncio LB, Mendonça EF De, Leles CR, Batista AC, Aparecida T. T regulatory cell markers in oral squamous cell carcinoma: Relationship with survival and tumor aggressiveness. *Oncology Letters*. 2010;1: 127–132. doi:10.3892/ol
 8. Mittal D, Gubin MM, Schreiber RD, Smyth MJ. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape Deepak. *Current opinion In Immunology*. 2015;27: 16–25. doi:10.1016/j.coi.2014.01.004.New
 9. Hendry S, Salgado R, Gevaert T, Russell PA, John T, Thapa B, et al. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-

Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinom. *Advances in Anatomic Pathology*. 2017;24: 311–335. doi:10.1097/PAP.0000000000000161

10. Nguyen N, Bellile E, Thomas D, Mchugh J, Rozek L, Virani S, et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Head and Neck*. 2016;38: 1074–1084. doi:10.1002/hed.24406.TUMOR

11. Balermipas P, Michel Y, Wagenblast J, Seitz O, Weiss C, Ro F, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. *British journal of cancer*. 2014;110: 501–509. doi:10.1038/bjc.2013.640

12. Marsh D, Suchak K, Moutasim KA, Vallath S, Hopper C, Jerjes W, et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. *Journal of pathology*. 2011;223: 470–481. doi:10.1002/path.2830

13. Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, Riley R, Harris S, Suchak K, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *British journal of cancer*. 2014;110: 489–500. doi:10.1038/bjc.2013.639

14. Brandwein-gensler M, Rolnitzky L. Oral squamous cell carcinoma: Histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *American Journal of Surgical Pathology*. 2005;29: 167–178. doi:10.1097/01.pas.0000149687.90710.21

15. Hirschowitz L, Ganesan R, Naveena S, McCluggage WG. Standards and datasets for reporting cancers Dataset for histological reporting of vulval neoplasms (3rd edition). Mount Vernon Cancer Network Gynaecology NSSG Gynaecological Oncology Clinical Guidelines. 2010;G071: 1–26.

16. El-Naggar A, Chan J, Grandis J, Takata T, Slotweg P, Editors. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th ed. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis; JR, Takata T, Slotweg PJ, editors. International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon 2017; 2017.

17. Spector ME, Bellile E, Amlani L, Zarins K, Smith J, Brenner JC, et al. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg*. 2019;145: 1012–1019.

doi:10.1001/jamaoto.2019.2427

18. Shaban M, Khurram SA, Fraz MM, Alsubaie N, Masood I, Mushtaq S, et al. A Novel Digital Score for Abundance of Tumour Infiltrating Lymphocytes Predicts Disease Free Survival in Oral Squamous Cell Carcinoma. *Scientific Reports*. 2019; 1–13. doi:10.1038/s41598-019-49710-z
19. Hori Y, Kubota A, Yokose T, Furukawa M, Matsushita T, Katsumata N, et al. Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Tumor Budding in Early Oral Tongue Carcinoma. *Laryngoscope*. 2021;131: 2512–2518. doi:10.1002/lary.29589
20. Suárez-Sánchez FJ, Lequerica-Fernández P, Rodrigo JP, Hermida-Prado F, Suárez-Canto J, Rodríguez-Santamarta T, et al. Tumor-Infiltrating CD20+ B Lymphocytes: Significance and Prognostic Implications in Oral Cancer Microenvironment. *Cancers*. 2021;13: 395. doi:10.3390/cancers13030395
21. Ribatti D. The concept of immune surveillance against tumors: The first theories. *Oncotarget*. 2017;8: 7175–7180. doi:10.18632/oncotarget.12739
22. Barnes TA, Amir E. HYPE or HOPE: The prognostic value of infiltrating immune cells in cancer. *British Journal of Cancer*. Nature Publishing Group; 2017;117: 451–460. doi:10.1038/bjc.2017.220
23. Xu Q, Wang C, Yuan X, Feng Z, Han Z. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes for Patients With Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Translational Oncology*. 2017;10: 10–16. doi:10.1016/j.tranon.2016.10.005
24. Costa NL, Gonçalves AS, Martins AFL, Arantes DAC, Silva TA, Batista AC. Characterization of dendritic cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. 2016;45: 418–424. doi:10.1111/jop.12380
25. Abbas A, Benoist C, Bluestone J, Campbell D, Ghosh S, Hori S, et al. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat Immunol*. 2013;14: 307–308. doi:10.1038/ni.2554
26. Russo D, Merolla F, Varricchio S, Salzano G, Zarrilli G, Mascolo M, et al. Epigenetics of oral and oropharyngeal cancers (Review). *Oncogene*. 2018; 275–283. doi:10.3892/br.2018.1136

27. Zhang H, Zhu Z, Zhang F, Meadows GG. Biological Basis of Alcohol-Induced Cancer [Internet]. Vasiliou V, Zakhari S, Seitz HK, Hoek JB, editors. Cham: Springer International Publishing; 2015. doi:10.1007/978-3-319-09614-8
28. Chatzopoulos K, Sotiriou S, Collins AR, Kartsidis P, Schmitt AC, Chen X, et al. Transcriptomic and Immunophenotypic Characterization of Tumor Immune Microenvironment in Squamous Cell Carcinoma of the Oral Tongue. *Head and Neck Pathology*. 2021;15: 509–522. doi:10.1007/s12105-020-01229-w
29. Chen T, Wang C, Ko J, Yang T. The Impact of Perineural Invasion and / or Lymphovascular Invasion on the Survival of Early-Stage Oral Squamous Cell Carcinoma Patients. *Annals of Surgical Oncology*. 2013;20: 2388–2395. doi:10.1245/s10434-013-2870-4
30. Affonso VR, Montoro JR de MC, Freitas LCC de, Saggiaro FP, Souza L de, Mamede RCM. Peritumoral infiltrate in the prognosis of epidermoid carcinoma of the oral cavity. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2015;81: 416–421. doi:10.1016/j.bjorl.2014.09.010

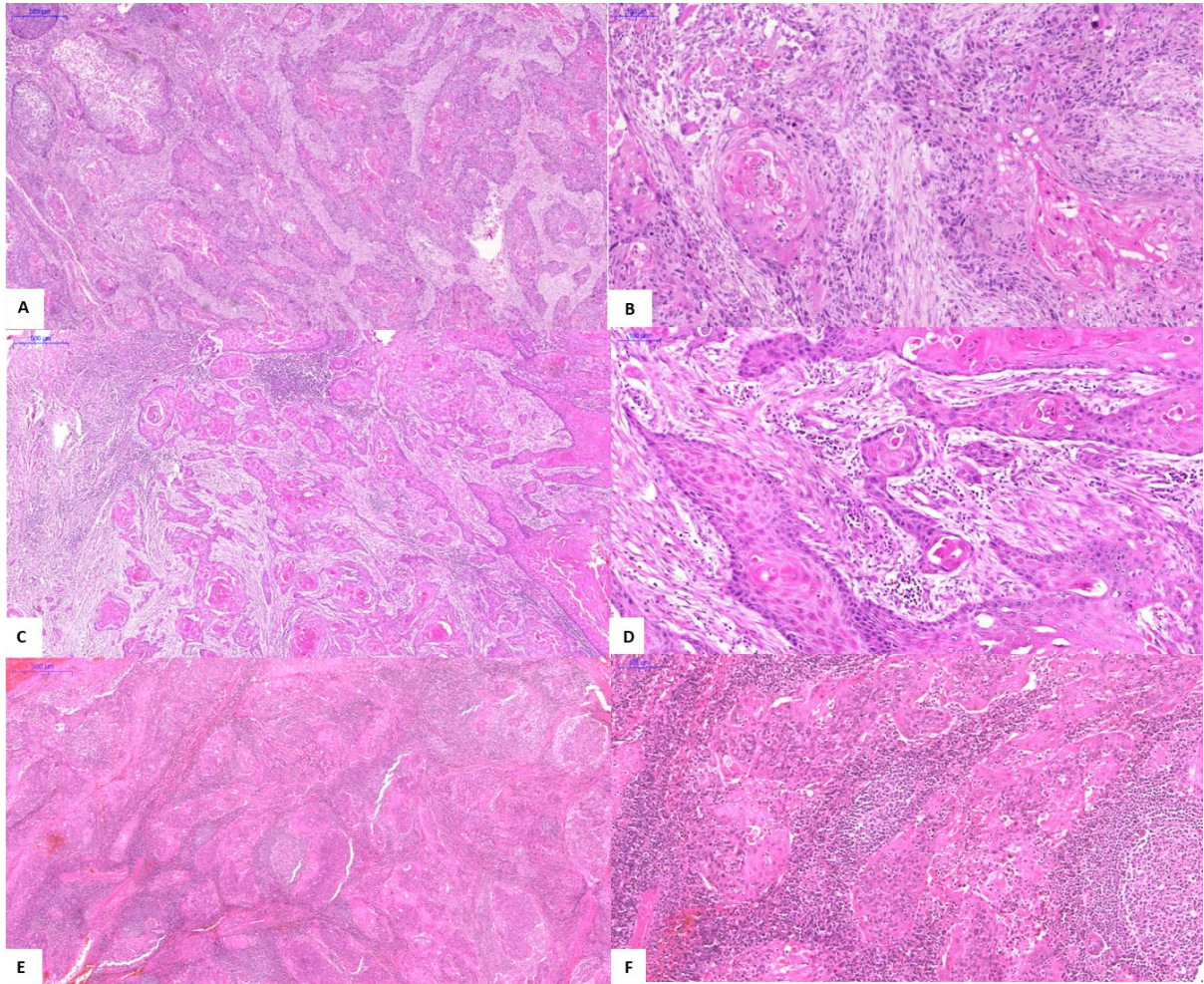


Figure 1 Tumor infiltration lymphocyte (TIL) pattern in the peritumoral and intratumoral region by H&E stained section. (A/B) Low (weak/absent), (C/D) moderate (patchy) and (E/F) high (diffuse). Original magnification: x25 and x100, respectively.

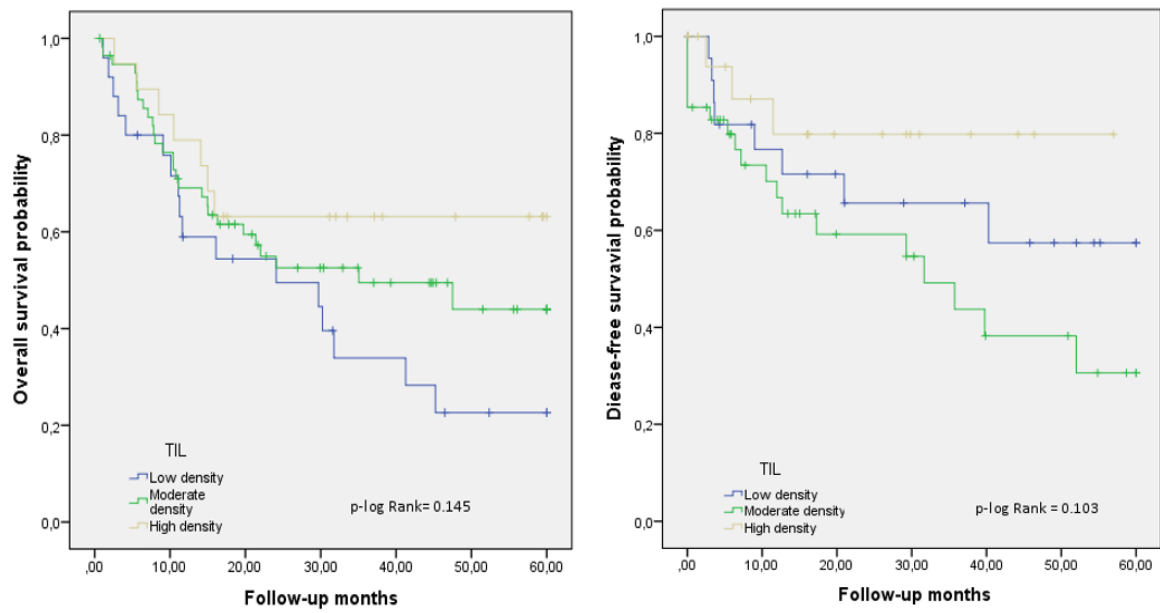


Figure 2 Estimates of overall survival and disease-free survival based on tumor infiltration lymphocyte (TIL) density among patients with OSCC. Overall survival, p-log Rank = 0.145 and disease-free survival, p-log Rank = 0.103 according to TIL density were not significant prognostic factors according to univariable analysis (Kaplan-Meier).

Table 1. Clinicopathological and demographics characteristics in association with TIL (n = 106).

Clinicopathological Features		TIL			p-value*
		Low	Moderate n (%)	High	
Sex	Male	23 (21.7%)	47 (44.3%)	14 (13.2%)	0.29
	Female	3 (2.8%)	13 (12.3%)	6 (5.7%)	
Age	≤ 60	14 (13.2%)	36 (43%)	6 (5.7%)	0.06
	> 60	12 (11.3%)	24 (22.6%)	14 (13.2%)	
Smoker	Yes (former/current)	21 (25.3%)	37 (44.6%)	12 (14.5%)	0.06
	No	0	9 (10.8%)	4 (4.8%)	
Drinker	Yes (former/current)	15 (20.5%)	26 (35.6%)	9 (12.3%)	0.57
	No	5 (6.8%)	15 (20.5%)	3 (4.1%)	
Tumor Site	Tongue	16 (15.1%)	44 (41.5%)	15 (14.2%)	0.34
	Floor of mouth	4 (3.8%)	3 (2.8%)	3 (2.8%)	
	Others	6 (5.7%)	13 (12.3%)	2 (1.9%)	
Tumor size	T1/T2	8 (7.9%)	29 (28.7%)	16 (15.8%)	0.001
	T3/T4	16 (15.8%)	30 (29.7%)	2 (2%)	
Lymph node metastasis (N)	N0	13 (13.5%)	34 (35.4%)	13 (13.5%)	0.39
	N+	10 (10.4%)	22 (22.9%)	4 (4.2%)	
Clinical stage	I/II	5 (5%)	23 (22.8%)	12 (11.9%)	0.01
	III/IV	19 (18.8%)	36 (35.6%)	6 (5.9%)	
Depth of invasion	< 5 mm	11 (12.8%)	42 (48.8%)	14 (16.3%)	0.26
	5 - 10 mm	5 (5.8%)	4 (4.7%)	2 (2%)	
	> 10 mm	5 (5.8%)	4 (4.7%)	2 (2%)	
Tumor grade	Well differentiated	10 (9.5%)	19 (18.1%)	9 (8.6%)	0.69
	Moderately differentiated	14 (13.3%)	37 (35.2%)	9 (8.6%)	
	Poorly/undifferentiated	2 (1.9%)	3 (2.9%)	2 (1.9%)	
Pattern of invasion	I/II	3 (2.9%)	16 (15.2%)	3 (2.9%)	0.20
	III/IV	23 (21.9%)	43 (41%)	17 (16.2%)	
Lymphovascular Invasion	Presence	19 (19.2%)	48 (48.5%)	20 (20.2%)	0.17
	Absence	3 (3%)	9 (9.1%)	0	
Perineural Invasion	Presence	6 (12.8%)	15 (31.9%)	9 (19.1%)	0.74
	Absence	5 (10.6%)	8 (17%)	4 (8.5%)	
Initial treatment	Surgery	6 (21.4%)	14 (50%)	8 (28.6%)	0.04
	Radiation or Chemoradiation	11 (31.4%)	22 (62.9%)	2 (5.7%)	

*Chi-Square test or Fisher's exact test.

Table 2. Multivariate Cox Proportional Hazard Analysis for clinical parameters, tumor infiltration lymphocyte (TIL), lymphovascular invasion (LVI) and perineural invasion (PNI).

Parameter	HR	OS		HR	DFS				
		95% Hazard ratio confidence	p-value		95% Hazard ratio confidence	p-value			
Smoker (cigarettes)	Yes (former/ current)	0.79	0.08	7.61	0.84	2.10	0.16	27.77	0.57
	No (ref)								
Tumor size	T1/T2	2.78	0.55	13.89	0.21	0.86	0.03	22.07	0.93
	T3/T4 (ref)								
Clinical stage	I/II (ref)	43.26	3.23	578.84	0.004	2.74	0.16	44.95	0.47
	III/IV								
Pattern of invasion	I/II (ref)	1.42	0.41	4.92	0.57	2.64	0.62	11.16	0.18
	III/IV								
Tumor infiltration lymphocyte	Low (ref)	1.28	0.48	3.40	0.61	0.70	0.16	2.93	0.63
	Moderate								
	High								
Lymphovascular Invasion	Presence	0.46	0.05	3.69	0.47	0.49	0.02	11.88	0.66
	Absence (ref)								
Initial treatment	Surgery	5.15	0.61	43.38	0.13	0.86	0.03	22.07	0.93
	Radiation or Chemoradiation (ref)								

OS=Overall survival, DFS= Disease-free survival, HR=Hazard ratio

Table 1 Univariable analysis for Overall survival and Disease-free survival with risk and prognostic factors in OSCC.

Variable Category		Overall Survival			Disease-Free Survival		
		Average survival (in months)	CI (95%)	<i>p</i> Log-Rank	Average survival (in months)	CI (95%)	<i>p</i> Log-Rank
Smoker (cigarettes)	Yes (former/current)	32.48	(26.81 – 38.15)	0.14	37.46	(30.38 - 44.55)	0.56
	No	43.31	(29.62 – 57.00)		43.68	(29.48 - 57.88)	
Drinker	Yes (former/current)	30.72	(24.05 – 37.38)	0.26	31.32	(22.52 - 40.11)	0.17
	No	37.97	(28.06 – 47.88)		43.41	(32.24 - 54.59)	
Tumor size	T1/T2	43.40	(37.30 – 49.49)	0.0001	40.78	(32.29 - 49.27)	0.32
	T3/T4	23.80	(17.04 – 30.56)		33.62	(25.10 - 42.14)	
Lymph node metastasis	N0	38.86	(32.89 – 44.83)	0.005	38.98	(31.40 - 46.56)	0.40
	N+	24.81	(16.62 – 32.99)		30.18	(20.76 - 39.61)	
Clinical Stage	I/II	45.91	(39.36 – 52.46)	0.0001	42.18	(32.62 - 51.74)	0.23
	III/IV	26.51	(20.31 – 32.71)		33.59	(25.83 - 41.35)	
Depth of invasion	< 5 mm	37.44	(31.10 – 43.78)	0.25	37.89	(29.99 – 45.78)	0.90
	5 - 10 mm	25.15	(12.94 – 37.36)		35.16	(18.51 – 51.80)	
	> 10 mm	42.36	(29.23 – 55.48)		37.97	(16.99 – 58.95)	
Tumor Grade	Well	40.04	(31.84 – 48.24)	0.22	31.93	(22.04 – 41.82)	0.28
	Moderately	32.31	(26.00 – 38.62)		40.61	(32.21 – 49.00)	
	Poorly	23.91	(8.53 – 39.30)		42.81	(23.31 – 60.00)	
Tumor infiltration lymphocyte	Low	27.88	(19.06 - 36.70)	0.14	40.71	(30.06 - 51.36)	0.10
	Moderate	35.29	(28.65 - 41.92)		32.10	(23.63 - 40.56)	
	High	41.69	(30.84 - 52.54)		46.87	(36.59 - 57.15)	
Pattern of invasion	I	45.01	(27.45 - 62.56)	0.21	22.65	(6.99 - 38.31)	0.68
	II	43.92	(32.06 - 55.79)		35.74	(20.81 - 50.67)	
	III	34.45	(26.34 - 42.56)		36.97	(26.51 - 47.44)	
	IV	30.07	(22.84 - 37.29)		40.33	(31.37 - 49.29)	
Lymphovascular Invasion	Presence	35.24	(29.94 - 40.54)	0.60	38.16	(31.72 - 44.61)	0.41
	Absence	32.00	(16.75 - 47.25)		32.96	(14.30 - 51.63)	
Perineural Invasion	Presence	37.16	(27.94 - 46.38)	0.70	37.16	(27.94 - 46.38)	0.70
	Absence	33.28	(20.72 - 45.85)		33.28	(20.72 - 45.85)	
Initial treatment	Surgery	45.13	(36.36 - 53.89)	0.006	43.99	(33.12 - 54.86)	0.37
	Radiation or Chemoradiation	26.41	(18.83 - 33.99)		37.66	(28.18 - 47.15)	

7 CONCLUSÃO

O trabalho possibilitou maior compreensão quanto a ação de TIL, FoxM1 e Plk1 em carcinoma epidermoide oral. A partir da análise do infiltrado linfocitário tumoral verificou-se que a alta densidade mostrou influenciar o desenvolvimento do tumor, limitando o seu crescimento, sendo possível compreender melhor a resposta imunológica do CEO de acordo com a progressão da doença, destacando o papel central de TIL no microambiente tumoral.

A metilação da região promotora de *PLK1* não apresentou influência significativa nas amostras analisadas, entretanto foi observado a presença do estado não-metilado do DNA em amostras antes do início do tratamento e metilação do DNA após a conclusão do tratamento inicial. A expressão gênica foi evidenciada, estando a expressão proteica correlacionada com tumores maiores e estádios avançados da doença. Assim como, tumores menores e estádios iniciais apresentaram associação com a expressão reduzida da proteína. Na análise dos segmentos teciduais observa-se a superexpressão de Plk1 em tecidos displásico e tumoral quando comparado ao epitélio adjacente ao tumor. Já *FOXM1* não apresentou expressão significativa, o que evidencia que pode não ser responsável pela ativação de Plk1 em CEO.

Plk1, então, demonstra estar relacionada ao desenvolvimento e progressão tumoral, visto que sua expressão no tumor está correlacionada ao estágio da doença. Todavia, a expressão proteica de Plk1 e a densidade de TIL não demonstraram ser bons marcadores de prognóstico para CEO. Uma amostragem maior poderá auxiliar na compreensão da regulação, localização e ação de TIL e Plk1 na evolução tumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, Vanessa Tubero Euzebio et al. Aspectos relacionados ao câncer oral de interesse na periodontia. **Braz J Periodontol**, v. 23, n. 4, p. 31–37, 2013.

AMIN, Mahul B et al. (Org.). **AJCC Cancer Staging Manual**. 8ª ed. [S.l: s.n.], 2017. Disponível em: <www.cancerstaging.org ajcc@facs.org>.

ANATÔMICAS, Regiões. Carcinoma epidermóide da cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 4, p. 361–376, 2001.

ARANTES, L M R B et al. Expert Review of Molecular Diagnostics Serum , plasma and saliva biomarkers for head and neck cancer. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 18, n. 1, p. 85–112, 2017.

ARCHAMBAULT, Vincent; GLOVER, David M. Polo-like kinases: conservation and divergence in their functions and regulation. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 10, n. 4, p. 265–275, 2009.

BACH, Duc-hiep et al. The Dominant Role of Forkhead Box Proteins in Cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, p. 1–25, 2018.

BALERMPAS, P et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict response to definitive chemoradiotherapy in head and neck cancer. **British journal of cancer**, v. 110, n. September 2013, p. 501–509, 2014.

BISWAS, Subhankar; RAO, C Mallikarjuna; RAO, Mallikarjuna. Principal and Professor of Pharmacology NU SC. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 173, p. 118–134, 2017.

BORGES, Barbara Do Nascimento et al. Promoter polymorphisms and methylation of E-cadherin (CDH1) and KIT in gastric cancer patients from northern Brazil. **Anticancer research**, v. 30, n. 6, p. 2225–2233, 2010.

BRANDWEIN-GENSLER, Margaret; ROLNITZKY, Linda. Oral squamous cell carcinoma: Histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. **American Journal of Surgical Pathology**, v.

29, n. October 2, p. 167–178, 2005.

BRENER, Sylvie et al. Carcinoma de células escamosas bucal : uma revisão de literatura entre o perfil do paciente , estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 1, p. 63–69, 2007.

CASTILHO, Rogerio M. Epigenetic Modifications and Head and Neck Cancer : Implications for Tumor Progression and Resistance to Therapy. **Int. J. Mol. Sci**, v. 18, p. 1–23, 2017.

CHUANG, Shu-Chun et al. Diet and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the INHANCE consortium. **Cancer Causes & Control**, v. 23, n. 1, p. 69–88, 2012.

COLICINO, Erica G; HEHNLY, Heidi. Regulating a key mitotic regulator , polo-like kinase 1 (PLK1). **Cytoskeleton**, n. October, p. 481–494, 2018.

DE CÁRCER, Guillermo; MANNING, Gerard; MALUMBRES, Marcos. From Plk1 to Plk5: Functional evolution of Polo-like kinases. **Cell Cycle**, v. 10, n. 14, p. 2255–2262, 2011.

DENG, Sisi et al. Identification and assessment of PLK1/2/3/4 in lung adenocarcinoma and lung squamous cell carcinoma: Evidence from methylation profile. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 25, n. 14, p. 6652–6663, 2021.

DORSEY, Kelly; AGULNIK, Mark. Promising new molecular targeted therapies in head and neck cancer. **Drugs**, v. 73, n. 4, p. 315–325, 2013.

EADS, C. A. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 8, p. 32e–0, 2000. Disponível em: <<https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/28.8.e32>>.

EL-NAGGAR, AK et al. **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. 4th. ed. [S.l.]: International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon 2017, 2017.

ELIA, Andrew E H; CANTLEY, Lewis C; YAFFE, Michael B. Proteomic screen finds pSer/pThr-binding domain localizing Plk1 to mitotic substrates. **Science**, v. 299, n. 5610, p. 1228–1231, 2003.

- FARNEBO, Lovisa et al. Strong expression of survivin is associated with positive response to radiotherapy and improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. **International Journal of Cancer**, v. 2003, p. 1994–2003, 2013.
- FELDMAN, Michal et al. The methyltransferase SETD6 regulates Mitotic progression through PLK1 methylation. **PNAS**, v. 116, n. 4, p. 1235–1240, 2019.
- FERLAY, Jacques et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **International Journal of Cancer**, v. 136, n. 5, p. E359–E386, 2015.
- FU, Zheng; WEN, Donghua. The emerging role of polo-like kinase 1 in epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis. **Cancers**, v. 9, n. 10, p. 1–15, 2017.
- GALBIATTI, Ana Livia Silva et al. Head and neck cancer: Causes, prevention and treatment. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 2, p. 239–247, 2013.
- GAŹDZICKA, Jadwiga; GOŁĄBEK, Karolina; KATARZYNA, Joanna. Epigenetic Modifications in Head and Neck Cancer. **Biochemical Genetics**, n. 0123456789, 2019.
- GINDEL, Joost H Van et al. Droplet digital PCR for detection and quantification of circulating tumor DNA in plasma of head and neck cancer patients. p. 1–8, 2017.
- GJERTSEN, B T; SCHÖFFSKI, P. Discovery and development of the Polo-like kinase inhibitor volasertib in cancer therapy. **Leukemia**, n. February, p. 11–19, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25027517>>.
- GODINHO, Susana; TAVARES, Álvaro A. A role for Drosophila Polo protein in chromosome resolution and segregation during mitosis. **Cell Cycle**, v. 7, n. 16, p. 2529–2534, 2008.
- GUPTA, Kanupriya; METGUD, Rashmi. Evidences Suggesting Involvement of Viruses in Oral Squamous. **Pathology Research International**, v. 2013, p. 1–17, 2013.
- HAN, Pengkai; LIU, Qiping; XIANG, Jianhua. Monitoring methylation-driven genes as prognostic biomarkers in patients with lung squamous cell cancer. **Oncology**

Letters, v. 19, n. 1, p. 707–716, 2020.

HEITZER, Ellen et al. The potential of liquid biopsies for the early detection of cancer. **npj Precision Oncology**, v. 1, n. 1, p. 36, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41698-017-0039-5>>.

HEITZER, Ellen; ULZ, Peter; GEIGL, Jochen B. Circulating tumor DNA as a liquid biopsy for cancer. **Clinical Chemistry**, v. 61, n. 1, p. 112–123, 2015.

HELMKE, C; BECKER, S; STREBHARDT, K. The role of Plk3 in oncogenesis. **Oncogene**, v. 35, n. 2, p. 135–47, 2016. Disponível em: <http://www.nature.com/onc/journal/v35/n2/full/onc2015105a.html?WT.ec_id=ONC-201601&spMailingID=50460069&spUserID=MTc1NDk1NDc1NTAwS0&spJobID=841827799&spReportId=ODQxODI3Nzk5S0>.

HENDRY, Shona et al. Assessing Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Solid Tumors: A Practical Review for Pathologists and Proposal for a Standardized Method from the International Immuno-Oncology Biomarkers Working Group: Part 2: TILs in Melanoma, Gastrointestinal Tract Carcinom. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 24, n. 6, p. 311–335, nov. 2017. Disponível em: <<https://journals.lww.com/00125480-201709000-00001>>.

HIRSCHOWITZ, Lynn et al. Standards and datasets for reporting cancers Dataset for histological reporting of vulval neoplasms (3rd edition). **Mount Vernon Cancer Network Gynaecology NSSG Gynaecological Oncology Clinical Guidelines**, v. G071, n. April 2011, p. 1–26, 2010.

HORI, Yukiko et al. Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Tumor Budding in Early Oral Tongue Carcinoma. **Laryngoscope**, v. 131, n. 11, p. 2512–2518, 2021.

HSU, Heng-wei et al. Combination antiangiogenic therapy and radiation in head and neck cancers. **Oral Oncology**, v. 50, p. 19–26, 2014.

HWANG, Sungjae et al. Identification of FOXM1-induced epigenetic markers for head and neck squamous cell carcinomas. **Cancer**, v. 119, n. 24, p. 4249–4258, 2013.

IRIMIE, Alexandra Iulia et al. Novel technologies for oral squamous carcinoma

biomarkers in diagnostics and prognostics. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 73, n. 3, p. 161–168, 2015.

JAISSWAL, Neha; CHAKRABORTY, Sankalpa; NAG, Alo. Biology of FOXM1 and its emerging role in cancer therapy. **Journal of Proteins and Proteomics**, v. 5, n. 1, p. 1–24, 2014.

KARASIK, David; NEWMAN, Anne. Models to Explore Genetics of Human Aging. In: GIL ATZMON, PhD (Org.). . **Longevity Genes**. [S.l.]: Springer New York, 2015. p. 141–161. Disponível em: <http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4939-2404-2_7>.

KIM, SOO-A et al. The antitumor effect of PLK1 and HSF1 double knockdown on human oral carcinoma cells. **International journal of oncology**, v. 37, n. 5, p. 1261–1269, 2010.

KLINHOM-ON, Nathakan et al. FOXM1c is the predominant FOXM1 isoform expressed in cholangiocarcinoma that associated with metastatic potential and poor prognosis of patients. **Heliyon**, v. 7, n. 4, p. e06846, abr. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S240584402100949X>>.

KOO, Chuay-yeng; MUIR, Kyle W; LAM, Eric W. FOXM1 : From cancer initiation to progression and treatment ☆. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1819, p. 28–37, 2012.

LAOUKILI, Jamila et al. FoxM1 is required for execution of the mitotic programme and chromosome stability. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 2, p. 126–136, 2005.

LEI, Yu et al. Telltale Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) in Oral, Head & Neck Cancer. **Oral Oncol**, v. 61, p. 159–165, 2017.

LEMOS JUNIOR, Celso Augusto et al. Oral cancer based on scientific evidences. **Revista da Associação Paulista de Cirurgios Dentistas**, v. 67, n. 3, p. 178–186, 2013.

LI, Long-cheng; DAHIYA, Rajvir. Methprimer: Designing Primers for Methylation PCRs. **Bioinformatics**, v. 18, n. December 2002, p. 1427–1431, 2002.

LI, Weizhe et al. A methylation-phosphorylation switch determines Plk1 kinase

activity and function in DNA damage repair. **SCIENCE ADVANCES**, n. March, p. 1–15, 2019.

LIAO, Guo-bin et al. Regulation of the master regulator FOXM1 in cancer. **Cell Communication and Signaling**, p. 1–15, 2018a.

_____. Regulation of the master regulator FOXM1 in cancer. **Cell Communication and Signaling**, p. 1–15, 2018b.

LING, Z. Q. et al. MSH2 promoter hypermethylation in circulating tumor DNA is a valuable predictor of disease-free survival for patients with esophageal squamous cell carcinoma. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 38, n. 4, p. 326–332, 2012.

LIU. Translational Oncology Targeting Polo-Like Kinases : A Promising Therapeutic Approach. **Translational Oncology**, v. 8, n. 3, p. 185–195, 2015.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tranon.2015.03.010>>.

LIU, Lili et al. Downregulation of polo-like kinase 4 in hepatocellular carcinoma associates with poor prognosis. **PloS one**, v. 7, n. 7, 2012.

LIVAK, Kenneth J; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LU, Yuhong et al. Hypoxia-induced epigenetic regulation and silencing of the BRCA1 promoter. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 16, p. 3339–3350, 2011.

LV, Cuicui et al. Acetylation of FOXM1 is essential for its transactivation and tumor growth stimulation. **Oncotarget**, v. 7, n. 37, 2016.

MARSH, Daniel et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. **Journal of pathology**, v. 223, n. January, p. 470–481, 2011.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE; INCA. **Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, RJ: [s.n.], 2017.

- MITTAL, Deepak et al. New insights into cancer immunoediting and its three component phases — elimination, equilibrium and escape Deepak. **Current opinion In Immunology**, v. 27, p. 16–25, 2015.
- MOREIRA, Geane et al. T regulatory cell markers in oral squamous cell carcinoma : Relationship with survival and tumor aggressiveness. **Oncology Letters**, v. 1, n. 1, p. 127–132, 2010.
- NAKAJIMA, Hiroyuki et al. Identification of a consensus motif for Plk (Polo-like kinase) phosphorylation reveals Myt1 as a Plk1 substrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 28, p. 25277–25280, 2003.
- NGUYEN, Nghia et al. Tumor infiltrating lymphocytes and survival in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Head and Neck**, v. 38, n. 7, p. 1074–1084, 2016.
- NOGUTI, Juliana et al. Metastasis from oral cancer: an overview. **Cancer Genomics-Proteomics**, v. 9, n. 5, p. 329–335, 2012.
- PALUCKA, A. Karolina; COUSSENS, Lisa M. The Basis of Oncoimmunology. **Cell**, v. 164, n. 6, p. 1233–1247, mar. 2016.
- PANSINI, Paola Fernandes et al. Differential Expression of Potential Biomarkers of Oral Squamous Cell Carcinoma Development. **Head and Neck Pathology**, v. 15, n. 4, p. 1127–1136, 2021.
- PARK, Jung-Eun et al. Putting a bit into the polo-box domain of polo-like kinase 1. **Journal of analytical science and technology**, v. 6, n. 1, p. 27, 2015. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26500787>%5C<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4610673>>.
- PARSONS, Mike; GRABSCH, Heike. How to make tissue microarrays. **Diagnostic Histopathology**, v. 15, n. 3, p. 142–150, 2009.
- PATEL, Snehal G; SHAH, Jatin P. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 55, n. 4, p. 242–258, 2005.

PORTELA, Anna; ESTELLER, Manel. Epigenetic modifications and human disease. **Nature biotechnology**, v. 28, n. 10, p. 1057, 2010.

RAJJOUB, Samer et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in oropharyngeal cancer. **Ear, nose, & throat journal**, v. 86, n. 8, p. 506–11, ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17915676>>.

ROBERTSON, Keith D. DNA methylation , methyltransferases , and cancer. **Oncogene**, v. 20, p. 3139–3155, 2001.

RUSSO, Daniela et al. Epigenetics of oral and oropharyngeal cancers (Review). **Oncogene**, p. 275–283, 2018.

SCHMIDT, Henri et al. The development of a liquid biopsy for head and neck cancers. **Oral Oncology**, v. 61, p. 8–11, 2016.

SHI, Wei et al. Significance of Plk1 regulation by miR-100 in human nasopharyngeal cancer. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 9, p. 2036–2048, 2010.

SILVA, Estela Vieira de Souza et al. Elucidating tumor immunosurveillance and immunoediting: a comprehensive review. **Ciência Animal Brasileira**, v. 22, 2021. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1809-68912021000100208&tlng=en>.

SINGH, Alka et al. Detection of aberrant methylation of HOXA9 and HIC1 through multiplex MethyLight assay in serum DNA for the early detection of epithelial ovarian cancer. **International Journal of Cancer**, v. 147, n. 6, p. 1740–1752, 2020.

SINGH, Sandeep; PILLAI, Smitha; CHELLAPPAN, Srikumar. Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. **Journal of oncology**, v. 2011, 2011.

SOBIN, Leslie H; GOSPODAROWICZ, Mary K; WITTEKIND, Christian. **TNM classification of malignant tumours**. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2011.

SOUTO, Giovanna Ribeiro et al. Effect of smoking on immunity in human chronic periodontitis. **Immunobiology**, v. 219, n. 12, p. 909–915, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.08.003>>.

STRICKER, Stefan H; KÖFERLE, Anna; BECK, Stephan. From profiles to function in epigenomics. **nature reviews**, v. 18, p. 51–66, 2016.

SUNG, Hyuna et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA Cancer Journal for Clinicians**, v. 71, p. 209–249, 2021.

TANAKA, Takuji; ISHIGAMORI, Rikako. Understanding Carcinogenesis for Fighting Oral Cancer. v. 2011, 2011.

TOMITA, H et al. Quantification of circulating plasma DNA fragments as tumor markers in patients with esophageal cancer. **Anticancer Research**, v. 27, n. 4 C, p. 2737–2741, 2007. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed8&NEWS=N&AN=2007390338>>.

UMAIR, Ayesha et al. Quantitative study of epigenetic signature in head and neck squamous cell carcinoma. **Turkish Journal of Medical Sciences**, v. 45, n. 2, p. 372–386, 2015.

VAN GINKEL, Joost H. et al. Cell-free nucleic acids in body fluids as biomarkers for the prediction and early detection of recurrent head and neck cancer: A systematic review of the literature. **Oral Oncology**, v. 75, n. October, p. 8–15, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.10.007>>.

VAN VUGT, Marcel A T M; BRÁS, Alexandra; MEDEMA, René H. Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. **Molecular cell**, v. 15, n. 5, p. 799–811, 2004.

WANG, Ke et al. FoxM1 inhibition enhances chemosensitivity of docetaxel-resistant A549 cells to docetaxel via activation of JNK / mitochondrial pathway. **Acta Biochim Biophys Sin**, v. 48, n. August, p. 804–809, 2016.

WARD, Alejandra et al. Aberrant methylation of Polo-like kinase CpG islands in Plk4 heterozygous mice. **BMC Cancer**, v. 11, 2011.

_____. The deregulated promoter methylation of the Polo-like kinases as a potential biomarker in hematological malignancies. **Leukemia and Lymphoma**, v. 56, n. 7, p.

2123–2133, 2015.

WU, Jianguo et al. Polo-like kinase 1 induces epithelial-to-mesenchymal transition and promotes epithelial cell motility by activating CRAF/ERK signaling. **eLife**, v. 5, n. MARCH2016, p. 1–25, 2016.

YAMAMOTO, Yoshiaki et al. Overexpression of polo-like kinase 1 (PLK1) and chromosomal instability in bladder cancer. **Oncology**, v. 70, n. 3, p. 231–237, 2006.

YU, Chao et al. Targeting FoxM1 inhibits proliferation , invasion and migration of nasopharyngeal carcinoma through the epithelial - to-mesenchymal transition pathway. **Oncology Reports**, p. 2402–2410, 2015.

YU, Ruoying et al. Methylation of PLK1 by SET7/9 ensures accurate kinetochore-microtubule dynamics. **Journal of Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 6, p. 462–476, 2020.

ZHANG, Cheng et al. Comprehensive analysis of DNA methylation and gene expression profiles in cholangiocarcinoma. **Cancer Cell International**, p. 1–13, 2019.

ZHAO, Chunling et al. Overexpression of Plk1 promotes malignant progress in human esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 136, n. 1, p. 9–16, 2010.

ZHONG, Shibiao et al. Downregulating forkhead box M1 inhibits proliferation by inhibiting autophagy in the sw480 cell line. **BIOMEDICAL REPORTS**, p. 47–50, 2017.

ANEXO



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE
Unimed Vitória

5. Corrigir o cronograma

Parecer do CEP: pendência atendida. Cronograma corrigido.

6. Incluir Declarações de Infraestrutura de todas as instituições hospitalares participantes, inclusive a do Hospital que assina a Folha de Rosto.

Parecer do CEP: pendência atendida. Declarações entregues.

7. Informar no dossiê se as amostras biológicas permanecerão identificadas e no país ou se serão exportadas e/ou desvinculadas dos respectivos sujeitos.

Parecer do CEP: pendência atendida

CONCLUSÃO

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa acima citado, foi considerado:

APROVADO

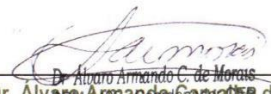
É parecer desse comitê que o referido projeto e demais documentos apresentados, **atende** aos aspectos da Resolução **CNS 196/96** e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Estamos aguardando o parecer final da CONEP.

Foram aprovados os seguintes documentos:

- Projeto de pesquisa versão de 1º de abril de 2011;
- Declaração de infraestrutura versão 27 de abril de 2011;
- Respostas as pendências versão 27 de abril de 2011;

O primeiro relatório de andamento do projeto deverá ser encaminhado a este CEP até o dia 27 de dezembro de 2011.

Atenciosamente,


Dr. Álvaro Armando Garvito de Moraes
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CIAS





**CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA**

PARECER N.º. 681/2011

Registro CONEP 16525 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – Não há CAAE ou nº de Folha de Rosto **Processo nº** 25000.098091/2011-05
Projeto de Pesquisa: "Estudo de Câncer de cabeça e pescoço no Brasil". Termo de Consentimento Livre e Esclarecido de 10/04/2011.
Pesquisador Responsável: José Carlos de Oliveira
Instituição: ACCG/Instituto Ensino e Pesquisa/Hospital Araújo Jorge (**1º CENTRO BRASILEIRO**)
CEP de origem: CEP - ACCG - Instituto de Ensino e Pesquisa/GO
Área Temática Especial: Genética humana
Patrocinador: Não informado.

Sumário geral do protocolo

O câncer de cabeça e pescoço compreende um grupo de neoplasias que surgem na cavidade oral, faringe e laringe. É o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo, representando cerca de 6% dos casos de câncer. Em todo o mundo, mais de 500.000 novos casos e 300.000 óbitos por câncer de cabeça e pescoço são estimados para ocorrer a cada ano. Este meio milhão de casos inclui 262.700 cânceres da cavidade oral, 117.200 cânceres de faringe e 169.600 cânceres da laringe. As taxas de incidência padronizadas são 15,3 e 4,5 por 100.000 homens e mulheres, respectivamente. As taxas de incidência no Brasil são cerca de 22,1/100.000 e 3,3/100.000 para homens e mulheres, respectivamente.

O tratamento primário varia de acordo com a localização anatômica e estágio da doença. Para a maioria dos tipos de câncer diagnosticados em estádios iniciais, a ressecção cirúrgica é a principal modalidade de tratamento. No entanto, para certos sítios anatômicos, como as amígdalas, a base da língua e o assoalho da boca, bem como para todos os cânceres localmente avançados, radioterapia é usada, isolada ou combinada com cirurgia. A quimioterapia pode ser utilizada em associação com a radioterapia. No entanto, no Brasil, a taxa de sobrevida em 5 anos ainda é inferior a 50%.

Publicações recentes sugerem um papel para infecção por HPV na sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (ver abaixo seção sobre HPV). Os Polimorfismos genéticos nos genes de reparo do DNA, os genes do ciclo celular, o metabolismo carcinogênico, e vias de genes do fator de crescimento foram analisados em relação à progressão e sobrevida de pacientes com câncer de vias aerodigestivas superiores (VADS). Polimorfismos nos genes XRCC1, FGFR e CCND1 foram associados com a sobrevida em pacientes com cânceres das VADS em pelo menos 2 estudos. No entanto, Hopkins *et al* criticou que esses estudos eram pequenos (<300 casos), muitas vezes tinham descrições inadequadas da população em estudo, não consideraram as comparações múltiplas de forma apropriada e podiam estar sujeitos a viés de publicação. Assim, não existem no momento estudos de seguimento de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, que permitam a avaliação simultânea do papel do fumo, álcool, HPV, genética e tratamento

Cont. Parecer CONEP nº. 681/2011

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

OBS: No Brasil, além do centro em tela, está prevista a participação dos seguintes centros: Hospital do Câncer de Barretos/SP (Dr. André Lopes Carvalho/CEP do Hospital Câncer Barretos); Hospital Erasto Gaertner/PR (Dr. Gyl Henrique Albrecht Ramos e Dra. Paola Pedruzzi/CEP do Hospital Erasto Gaertner); Hospital A C Camargo/SP (Dr. Luiz Paulo Kowalski e Dr. Mauro Kasuo Ikeda/CEP do Hospital do Câncer - A C Camargo/SP); Associação de Combate ao Câncer em Goiás/Hospital Araujo Jorge/GO (Dr. José Carlos de Oliveira e Drª. Maria Paula Curado/Comitê de Ética do Hospital Araujo); Departamento de Otorrinolaringologia UFGO Goiania/GO (Dr. Claudinei Cândido Costa/CEP do HC da UFG); Faculdade de Medicina do ABC/SP (Dra. Jossi Ledo Kanda/CEP NÃO INFORMADO); Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer/RN (Dr. Ricardo José Curioso da Silva e Dr. Luis Eduardo Barbalho de Melo /CEP da Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer); Instituto do Câncer do Ceará/CE (Dr. Eric Fernandes de Souza/CEP NÃO INFORMADO); FCECON - Fundação Centro Controle de Oncologia/AM (Dr. Marco Antonio Cruz Rocha e Dr. Jeferson Moreira de Medeiros/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Heliópolis/SP (Dr. Carlos Neutzing Lehn/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Santa Rita/AFECC - Associação Feminina de Educação e Combate ao Câncer/ES (Dr. Jose Roberto Vasconcelos de Podesta/Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS); Pontifícia Universidade Católica de Campinas/SP (Dr. José Francisco de Sales Chagas e Dr. Maria Beatriz Nogueira Pascoal/CEP da PUC Campinas); Hospital Universitário/UnB (Dr. Luiz Augusto Nascimento e Dr. Juliano de Padua Nakashima/Comitê de ética em Pesquisa - Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde); Instituto Nacional do Câncer – INCA/RJ (Dr. Fernando Luiz Dias, Dr. Roberto Araujo Lima e Dra. Isabella Costa Santos/Comitê de Ética e Pesquisa do INCA); Instituto Brasileiro de Controle do Câncer/SP (Dra. Adriana Sonderman, Dr. André Bandiera de Oliveira Santos e Dr. Fabio Roberto Pinto/CEP do BCC - Instituto Brasileiro de Controle do Câncer); Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da USP/SP (Dr. Lenine Garcia Brandão/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Amaral Carvalho FUNDAÇÃO AMARAL CARVALHO/SP (José Getulio Segalla/Comitê de Ética em Pesquisa Fundação Hospital Amaral Carvalho) e Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP/SP (Prof. Dr. Marcos B. Paiva/Comitê de Ética em Pesquisa).

Caso ocorra modificação nessa informação, o CEP do 1º Centro deve ser informado para comunicação à CONEP. O CEP deve enviar cópia dessa comunicação para o pesquisador responsável do seu Centro. Ressalta-se que os centros que não possuem Comitês de Ética em Pesquisa - CEP, devem solicitar a CONEP a indicação de um CEP para a análise do projeto.

NOTA: *Caso na execução do protocolo, em um determinado Centro, haja parceria de instituições no recrutamento e/ou atendimento de sujeitos de pesquisa, solicita-se ao CEP correspondente que observe cuidadosamente os seguintes aspectos, conforme exigências éticas explicitadas nos itens III.3.i, V.5, VI.2.h, VI.2.i, VI.3.d e VI.3.g da Resolução CNS 196/96 e item IV.1.m da Resolução CNS nº 251/97, com vistas à garantia da assistência ao sujeito da pesquisa, sem prejuízo ao Sistema Único de Saúde:*

- 1) formas de recrutamento e referência de sujeitos de pesquisa; se serão pacientes do SUS e ou/ particulares; em que instituição estão registrados, ou seja, qual instituição assume as responsabilidades inerentes à "Instituição de Pesquisa";
- 2) descrição da infra-estrutura disponível para a realização da pesquisa;
- 3) vínculos do pesquisador;
- 4) anuência assinada pela diretoria técnica de instituições parceiras, para assistência dos sujeitos de pesquisa, quando for o caso, com apresentação de convênios ou outras relações envolvendo pessoas jurídicas;

Ressalta-se que, havendo envolvimento do SUS em parcerias com instituições privadas, a avaliação desse aspecto extrapola as atribuições do Sistema CEPs-CONEP, devendo o pesquisador e o responsável pela instituição buscar a manifestação do Poder Público Correlato (estadual ou municipal), por meio da respectiva Assessoria Jurídica, em cumprimento à Lei Orgânica da Saúde 8080/91.

Brasília, 25 de outubro de 2011.



National Research Ethics Service

Coventry Research Ethics Committee

2nd floor West Wing
University Hospital
Clifford Bridge Road
Coventry
CV2 2DX

24 February 2010

Telephone: 024 7696 7529
Facsimile: 024 7696 5033

Professor Hisham Mehanna
Institute of Head & Neck Studies & Education
University Hospital
3rd floor opposite Ward 32
Clifford Bridge Road
Coventry CV2 2DX

Dear Professor Mehanna

Study Title: Improving treatment selection using Predictive Classifiers of Treatment Response for Head and Neck Cancers and dysplasia.
REC reference number: 10/H1210/9
Protocol number: Version 1.0

The Research Ethics Committee reviewed the above application at the meeting held on 16 February 2010. Thank you for attending to discuss the study.

Ethical opinion

You advised the Committee you were aiming to develop treatment response classification to help predict response to treatment for two types of patients; first patients who have laryngeal voice box or mouth and throat cancer; second patients with laryngeal and mouth dysplasia. Through using the formula you would be able to predict whether a patient with cancer with these characteristics would be best receiving surgery rather than chemotherapy similarly whether patients with oral dysplasia would better respond to surgery rather than a 'wait and see' approach thus individualising treatment for those patients. By linking a series of chemotherapy and genetic tests on the samples and responses to treatment in relevant cohort of patients you have target diseases or cancers by correlating biomarkers. This was a well known protocol for developing biomarkers and classifications in UK, i.e. biomarker road map.

According to the pilot study out of 100 patients 80 could not now be traced so the Committee wanted to know how you would know how the patients had progressed if you could not contact 80%. You explained that patients had been treated and biopsied in the local hospital then followed up, some died some didn't and you would follow up the local ones. You would ask the local team for patients' tissue and pseudo anonymised outcome data; i.e. link anonymised you had no way of tracking the code.

The local centres were responsible for consenting patients via the operating consent form so the Committee wondered if there was a possibility of tissue from someone who did not consent being included in the study. You stated that where there was agreement they would be included but before September 2006 patients' samples could be used without their express consent provided they were anonymised. Under

This Research Ethics Committee is an advisory committee to West Midlands Strategic Health Authority

The National Research Ethics Service (NRES) represents the NRES Directorate within the National Patient Safety Agency and Research Ethics Committees in England

Statement of compliance

The Committee is constituted in accordance with the Governance Arrangements for Research Ethics Committees (July 2001) and complies fully with the Standard Operating Procedures for Research Ethics Committees in the UK.

After ethical review

Now that you have completed the application process please visit the National Research Ethics Service website > After Review

You are invited to give your view of the service that you have received from the National Research Ethics Service and the application procedure. If you wish to make your views known please use the feedback form available on the website.

The attached document "After ethical review – guidance for researchers" gives detailed guidance on reporting requirements for studies with a favourable opinion, including:

- Notifying substantial amendments
- Adding new sites and investigators
- Progress and safety reports
- Notifying the end of the study

The NRES website also provides guidance on these topics, which is updated in the light of changes in reporting requirements or procedures.

We would also like to inform you that we consult regularly with stakeholders to improve our service. If you would like to join our Reference Group please email referencegroup@nres.npsa.nhs.uk.

10/H1210/9

Please quote this number on all correspondence

With the Committee's best wishes for the success of this project

Yours sincerely



Mr Stephen Keay
Chairman

Email: pauline.pittaway@uhcw.nhs.uk

Enclosures: List of names and professions of members who were present at the meeting and those who submitted written comments

"After ethical review – guidance for researchers SL-AR2"

Copy to: Mrs Ceri Jones, R&D, UHC&W NHS Trust