

Bruna Pereira Sorroche

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA DE MARGENS CIRÚRGICAS NEGATIVAS DE
PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. André Lopes Carvalho

Co-orientador: Dra. Lidia Maria Rebolho
Batista Arantes

Barretos, SP
2019

Bruna Pereira Sorroche

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA DE MARGENS CIRÚRGICAS NEGATIVAS DE
PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE ORAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. André Lopes Carvalho

Co-orientador: Dra. Lidia Maria Rebolho
Batista Arantes

Barretos, SP
2019

S713a Sorroche, Bruna Pereira.

Avaliação do perfil de metilação do DNA de margens cirúrgicas negativas de pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral. / Bruna Pereira Sorroche. - Barretos, SP - 2019.

75 f. : il.

Orientador: André Lopes Carvalho.

Coorientadora: Lidia Maria Rebolho Batista Arantes.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2019.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Boca. 3. Margens de excisão. 4. Recidiva. 5. Metilação de DNA. 6. Biomarcadores. I. Autor. II. Carvalho, André Lopes. III. Arantes, Lidia Maria Rebolho Batista. IV. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruna Pereira Sorroche

AVALIAÇÃO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA DE MARGENS CIRÚRGICAS NEGATIVAS DE PACIENTES COM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DA CAVIDADE ORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 28/03/2019

Banca Examinadora:

Dr. Andre Luiz Vettore de Oliveira
Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Dra. Edenir Inêz Palmero
Instituição: Hospital de Câncer de Barretos

Dr. André Lopes Carvalho
Orientador

Dra. Lidia Maria Rebolho Batista Arantes
Co-Orientadora

Dra. Céline Marques Pinheiro
Presidente da Banca

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através de Auxílio à Pesquisa – Chamada Universal MCTI/CNPq nº 01/2016 (Processo número 423914/2016-2).

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Bolsas de Mestrado – Regular (processo número 2016/03706-0) e BEPE (processo número 2017/26961-8). As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui registrado meus profundos agradecimentos àqueles que acreditaram e auxiliaram na realização deste trabalho, tornando possível sua execução.

Ao meu orientador, Dr. André Lopes Carvalho, por, apesar da ausência física, estar sempre presente ao longo do desenvolvimento do estudo e por contribuir para o meu processo de formação científica.

À minha co-orientadora, Dra. Lidia Maria Rebolho, pelas oportunidades oferecidas, por confiar e reconhecer meu trabalho e estar sempre disponível. Você foi fundamental em cada passo percorrido até então.

À minha família, especialmente aos meus pais, pela educação que me ofereceram e por nunca medirem esforços para que eu pudesse alcançar meus objetivos.

Ao Renan, meu companheiro de vida, pela cumplicidade, força, paciência e por sempre apoiar minhas decisões e me incentivar a ser cada vez melhor como pessoa e profissional.

À todo o grupo de Biologia dos Tumores de Cabeça e Pescoço, em especial à Dra. Ana Carolina Carvalho e ao Dr. Matias Melendez, por estarem sempre acessíveis e por todo aprendizado construído.

À Elisa Messias, Ângela Neves e Ma. Anna Luiza Vicente, pela amizade e companheirismo desde o início. Vocês tornaram essa jornada mais significativa e agradável, tanto dentro quanto fora do hospital.

À Dra. Sheila Coelho, ao Dr. Luis Felipe Pinto e equipe do Instituto Nacional de Câncer (INCA), que tornaram factível a realização do metiloma, assim como ao Dr. Fazlur Talukdar, ao Dr. Zdenko Herceg e ao grupo de epigenética da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) pela oportunidade de aprendizado da bioinformática e por permitirem a resolução e conclusão deste trabalho.

Aos amigos do CPOM, obrigada pela companhia, pelos momentos compartilhados nos últimos anos e pela oportunidade de aprender um pouco com cada um de vocês.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, Dr. André Luiz Vettore de Oliveira e Dra. Edenir Inez Palmero, pelas sugestões e críticas preciosas ao longo da elaboração desta dissertação.

Aos pacientes que concederam o uso de suas amostras biológicas e informações clínicas, permitindo com que a ideia saísse do papel e fazendo com que eu tivesse mais certeza de que essa é a área da pesquisa a qual quero contribuir.

À Dra. Gisele Caravina, por analisar todas as lâminas do estudo e garantir a veracidade das amostras.

À todos os funcionários dos departamentos do Hospital de Amor que de alguma forma auxiliaram na realização desta empreitada, a saber: Biobanco, Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Departamento de Patologia, Escritório de Projetos e Inovação Tecnológica, Instituto de Ensino e Pesquisa, Núcleo de apoio ao pesquisador, Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME), Registro Hospitalar de Câncer e pós-graduação.

Ao Instituto Nacional de Câncer (INCA) e à Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC) por me hospedarem durante diferentes períodos do mestrado.

À FAPESP pela bolsa de estudos concedida e ao CNPq, Ministério Público do Trabalho e ao Hospital de Amor por fomentarem esta dissertação.

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”

George Bernard Shaw

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos gerais do câncer	1
1.2	Carcinomas de células escamosas de cavidade oral	1
1.3	Margens Cirúrgicas	5
1.4	Alterações moleculares e o câncer	7
1.5	Estudos envolvendo análise de metilação em margens cirúrgicas	9
2	JUSTIFICATIVA	11
3	HIPÓTESE	11
4	OBJETIVOS	12
4.1	Objetivo geral	12
4.2	Objetivos específicos	12
5	MATERIAIS E MÉTODOS	13
5.1	Pacientes	13
5.2	Análise histopatológica e obtenção do material para análise molecular	14
5.3	Extração de DNA	15
5.4	Tratamento do DNA com bissulfito de sódio	15
5.5	Array de metilação do DNA	18
5.6	Análise de bioinformática do array de metilação	21
5.6.1	Pré-processamento dos dados	21
5.6.2	Identificação de padrão de metilação do DNA específica para recidiva	23
5.7	Análise dos resultados	23
6	RESULTADOS	24
6.1	Seleção das amostras	24
6.1.1	Dados clínico-patológicos dos pacientes incluídos no estudo	24
6.2	Confirmação da eficiência do tratamento com bissulfito de sódio	25

6.3	Array de metilação	26
6.3.1	Análise de qualidade do ensaio	26
6.3.2	Pré-processamento e normalização dos dados do <i>array</i> 850k da <i>Illumina</i>	27
6.3.3	Análise diferencial entre grupos com e sem recidiva	28
6.3.4	Seleção do modelo	30
6.3.5	Análise de enriquecimento de vias	33
6.3.6	Genes relacionados às RDMs selecionadas	34
6.4	Associação da metilação com outras características clínicas e prognósticas	37
7	DISCUSSÃO	38
8	CONCLUSÃO	43
9	ASPECTOS ÉTICOS	44
	REFERÊNCIAS	45
	ANEXOS	54
	Anexo A - Tabela Suplementar 1	54
	Anexo B - Tabela Suplementar 2	56
	Anexo C - Figura suplementar 1	57
	Anexo D - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira, em ambos os sexos, para o biênio 2018/2019.	2
Figura 2 -	Representação de uma peça de tumor ressecado (em vermelho) e margens cirúrgicas. Margens positivas são consideradas quando as células tumorais são encontradas na borda do tecido ressecado. Margens livres são consideradas quando há apenas células histologicamente normais na borda deste tecido e, dependendo de sua distância para o tumor, elas são definidas como margens próximas ou negativas.	6
Figura 3 -	Representação da reação de conversão do DNA por bissulfito de sódio e posterior amplificação do material tratado por reação em cadeia da polimerase (PCR).	16
Figura 4 -	Fluxograma de funcionamento do ensaio Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip.	19
Figura 5 -	Sondas Infinium I e Infinium II utilizadas no ensaio Illumina Infinium MethylationEPIC Beadchip.	20
Figura 6 -	Distribuição das sondas do ensaio Illumina Infinium MethylationEPIC Beadchip em todas as regiões gênicas e regiões referentes às ilhas CpG.	21
Figura 7 -	Fluxo de trabalho para análise dos dados de metiloma provenientes do ensaio <i>Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip</i> .	21
Figura 8 -	Fluxograma da execução do projeto, indicando as amostras analisadas e o local de realização dos experimentos.	24
Figura 9 -	Verificação da eficiência e qualidade das amostras de DNA após conversão por bissulfito de sódio através da confirmação do tamanho do fragmento (120 pares de bases) amplificado na reação de PCR para LINE-1, em gel de agarose 2%.	25

- Figura 10 -** Controle de qualidade das amostras incluídas no array de metilação. A, Acima da linha de referência as amostras são consideradas de boa qualidade, enquanto abaixo desta linha as amostras são consideradas de qualidade ruim e devem ser excluídas das análises subsequentes. B, Valores de p de detecção para cada amostra incluída no array. C, Disposição das amostras nos 4 BeadChips utilizados no ensaio e a porcentagem de sondas que falharam em cada amostra. D, Gráficos de densidade mostrando a distribuição dos valores de beta antes e depois da normalização dos dados. 27
- Figura 11 -** Análise não supervisionada das 32 amostras de margem cirúrgica histologicamente negativas, mostrando as relações de similaridade entre elas quando foram investigadas as 10.000 sondas mais variáveis do array. 28
- Figura 12 -** QQ-Plot e Manhattan Plot dos diferentes modelos testados na análise. Valores de p observados (pontos pretos) plotados contra os valores de p esperados sob nenhuma associação (linha vermelha). Gráficos Manhattan demonstram as associações de recidiva versus não recidiva em todo o genoma dos pacientes. As linhas horizontais representam os limiares para associações sugestiva (azul; $p < 1 \times 10^{-5}$) e significativa (vermelho; $p < 3,6 \times 10^{-8}$). 29
- Figura 13 -** Comparação dos modelos testados. A, Diagrama de Venn comparando as posições diferencialmente metiladas detectadas usando um corte de 10% de $\Delta\beta$ nos 3 modelos. B, Diagrama de Venn comparando as regiões diferencialmente metiladas detectadas com 10% $\Delta\beta$ nos 3 modelos. Comparações realizadas usando o pacote VennDiagram. 30
- Figura 14 -** *Heatmap* mostrando os 311 PDMs associados à recidiva local (FDR $< 0,1$, $\Delta\beta > 10\%$). Os sítios CpG são mostrados nas linhas horizontais e as amostras nas colunas verticais. Altos níveis de metilação são 31

mostrados em vermelho e baixos níveis de metilação em azul, de acordo com a barra de escala à esquerda da figura.

- Figura 15 -** Distribuição das sondas diferencialmente metiladas. A, gráfico mostrando o perfil genético de metilação do genoma de pacientes que desenvolveram recidiva local, por cromossomo. Pontos rosa representam sondas hipermetiladas enquanto pontos verdes representam sondas hipometiladas no grupo recidiva em comparação com o grupo não-recidiva. B, contexto CpG das PDMs identificadas relacionadas às regiões gênicas. C, contexto CpG das PDMs identificadas relacionados à ilha CpG, comparando com todo o ensaio Illumina *Infinium MethylationEPIC BeadChip*. 32
- Figura 16 -** Vias enriquecidas ($p \leq 0,05$) entre os 226 genes únicos relacionados às posições diferencialmente metiladas e associados à recidiva local. 34
- Figura 17 -** Regiões diferencialmente metiladas estatisticamente significativas ($FDR < 0,05$) associadas à recidiva local, relativas aos genes: A, *GALR1*; B, *GRHL3*; C, *FAM84B*; D, *IFFO1*; E, *LTBP4*; F, *PIWIL2*. Na parte esquerda superior o grupo de pacientes que desenvolveram recidiva local e na parte inferior, o de pacientes que não desenvolveram recidiva. Os valores médios de metilação em casos de recidiva (vermelho) ou não recidiva (azul) são mostrados. 35
- Figura 18 -** Gráficos de co-metilação mostrando os CpGs com pelo menos 10% de diferença de metilação nas RDMs dos genes: A, *GALR1*; B, *GRHL3*; C, *FAM84B*; D, *IFFO1*; E, *LTBP4*; F, *PIWIL2*, visualizados com base em suas coordenadas cromossômicas e posição relativa para ilha CpG (barra verde). O gráfico de correlação mostra os valores de correlação de Spearman entre os CpGs na região. 36
- Figura 19 -** Diagrama de Venn comparando os PDMs (A) e RDMs (B) detectados usando 10% de $\Delta\beta$ nas 3 análises de metilação, considerando I) *status* de recidiva, II) estágio tumoral e III) 37

sobrevida livre de doença em 5 anos. Comparações realizadas usando o pacote *VennDiagram*.

Figura

suplementar 1 -

Gráficos de co-metilação mostrando os CpGs diferencialmente metilados nas RDMs dos genes: A, GALR1; B, GRHL3; C, FAM84B; D, IFFO1; E, LTBP4; F, PIWIL2, visualizados com base em suas coordenadas cromossômicas e posição relativa para ilha CpG (barra verde). O gráfico de correlação mostra os valores de correlação de Spearman entre os CpGs na região.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação TNM para estadiamento do câncer de cavidade oral.	3
Tabela 2 -	Composição da PCR para o <i>LINE-1</i> para cada amostra de estudo.	17
Tabela 3 -	Características clínico-patológicas dos pacientes incluídos no estudo, comparando os grupos com base em seu status de recidiva local.	25
Tabela 4 -	Significância encontrada na análise de componentes principais dos parâmetros clínicos e experimentais avaliados.	28
Tabela 5 -	Comparação do número de PDMs e RDMs para cada modelo testado na análise utilizando uma taxa de falsa descoberta (FDR) de 10% para PDMs e 5% para RDMs.	30
Tabela 6 -	Regiões diferencialmente metiladas entre os grupos com e sem recidiva tumoral, ordenadas pelo valor de p ajustado.	33
Tabela	Características clínico-patológicas detalhadas dos pacientes	
Suplementar 1 -	selecionados para o <i>array</i> de metilação.	54
Tabela	Concentração e qualidade de DNA das amostras de margens	
Suplementar 2 -	criopreservadas de pacientes com CCECO após extração pelo QIasymphony, quantificadas e com qualidade medidas pelo Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).	56

LISTA DE ABREVIATURAS

5mC	5-metil citosina
ACS	<i>American Cancer Society</i> – Sociedade Americana de Câncer
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CCECO	Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral
CCECP	Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço
CCEE	Carcinoma de Células Escamosas de Esôfago
CCO	Câncer de Cavidade Oral
CpG	5'—C— <i>phosphate</i> —G—3'
CNG	5'—C—N—G—3', N denota um dos quatro nucleotídeos naturais
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico
DNMTs	DNA-metiltransferases
EC	Estadiamento clínico
FDR	<i>False Discovery Rate</i> – Taxa de falsa descoberta
FFPE	<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i> – Fixado em formalina e embebido em parafina
GTEX	<i>Genotype-Tissue Expression</i> – Expressão Genótipo-Tecido
H&E	Hematoxilina e Eosina
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
HPV	<i>Human Papillomavirus</i> – Papiloma Vírus Humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i> – Agência Internacional para Pesquisa em Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
kb	Kilobase
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i> – Enciclopédia de Genes e Genomas de Kyoto
mg	Miligramas
miRNA	microRNA
µL	Microlitros
µm	Micrometro

μM	Micromolar
mL	Mililitros
mm	Milímetros
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i> – Rede Nacional de Compreensão sobre o Câncer
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial da Saúde
PC	<i>Principal Component</i> – Componente Principal
PCA	<i>Principal Component Analysis</i> – Análise de Componentes Principais
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
PDM	Posições Diferencialmente Metiladas
RefSeq	<i>NCBI Reference Sequence Database</i> – Banco de dados de Sequências de Referência NCBI
RDM	Regiões Diferencialmente Metiladas
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> – Ácido Ribonucleico
rpm	Rotações por minuto
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i> – Polimorfismos de nucleotídeo único
SVA	<i>Surrogate Variable Analysis</i> – Análise de Variável Substituta
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i> – O Atlas do Genoma do Câncer
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNM	Tumor, Linfonodo, Metástase
UICC	União Internacional Contra o Câncer
UTR	<i>Untranslated Region</i> – Região Não Traduzida

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
Δ	Delta
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
$=$	Igual
λ	Lambda
$>$	Maior
\geq	Maior ou igual
$+$	Mais
\pm	Mais ou menos
$<$	Menor
\leq	Menor ou igual
$\%$	Por cento

RESUMO

Sorroche BP. *Avaliação do perfil de metilação do DNA de margens cirúrgicas negativas de pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral. Dissertação (Mestrado)*. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2019.

INTRODUÇÃO: O carcinoma de células escamosas da cavidade oral (CCECO) é um dos cânceres mais frequentes no mundo, apresentando maior incidência em homens. Além do estadiamento TNM, o *status* das margens cirúrgicas é um dos parâmetros utilizados para redefinir o prognóstico e permitir a seleção do tratamento mais adequado. A obtenção de margens livres de tumor no momento da cirurgia é de suma importância para diminuir as taxas de recidiva local. Entretanto, de 10 a 30% dos pacientes com margens histológicas negativas apresentam recidivas loco-regionais. Diversos estudos têm sugerido a presença de alterações moleculares prévias ao aparecimento do fenótipo do câncer na mucosa adjacente ao tumor primário. **OBJETIVO:** Avaliar o perfil de metilação do DNA de margens cirúrgicas histologicamente negativas de pacientes com CCECO como fator preditivo para recidiva tumoral. **MATERIAIS E MÉTODOS:** O metiloma utilizando a plataforma *Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip* foi realizado para identificar marcadores de metilação do DNA relacionados à recidiva. Foram incluídas 32 amostras de margens cirúrgicas histologicamente negativas, dentre as quais 16 de pacientes que desenvolveram recidiva local e 16 de pacientes que não desenvolveram recidiva local. Os dados gerados foram analisados usando a ferramenta de programação R e pacotes de dados específicos. **RESULTADOS:** Na análise do metiloma foram identificadas 311 posições diferencialmente metiladas (PDMs) e 23 regiões diferencialmente metiladas (RDMs), contrastadas entre os grupos com e sem recidiva. Seis RDMs de maior interesse, com um total de 19 sítios CpG com pelo menos 10% de diferença de metilação entre os grupos, foram selecionadas, das quais a região relacionada ao gene *GRHL3* se mostrou potencial marcador para um pior prognóstico em pacientes com CCECO. **CONCLUSÕES:** Este estudo demonstrou que existem alterações na metilação do DNA na mucosa histologicamente normal adjacente ao tumor primário de indivíduos com CCECO, e que estas alterações não estão necessariamente localizadas nas regiões promotoras dos genes. Além disso, estes padrões de metilação são capazes de diferir pacientes com um maior risco de desenvolvimento de recidivas locais.

PALAVRAS-CHAVE: Carcinoma de células escamosas; Boca; Margens de excisão; Recidiva local de neoplasia; Metilação de DNA; Biomarcadores.

ABSTRACT

Sorroche BP. *Evaluation of the DNA methylation profile of negative surgical margins from oral squamous cell carcinoma patients. Dissertation (Master's degree)*. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2019.

BACKGROUND: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is one of the most frequent cancers worldwide, presenting higher incidences in men. Besides the TNM staging, the *status* of the surgical margins is one of the parameters used to redefine prognosis and to allow the selection of the most appropriate treatment. Obtaining tumor-free margins at the time of surgery is of paramount importance for decreasing local recurrence rates. However, from 10 to 30% of patients with negative histological margins present locoregional recurrences. Many studies have suggested the presence of molecular alterations prior to the appearance of the cancer phenotype in the mucosa adjacent to the primary tumor. **AIM:** To evaluate the DNA methylation profile of histologically negative surgical margins from OSCC patients as a predictive factor for tumor recurrence. **MATERIALS AND METHODS:** The methylome-wide analysis using the *Illumina* Infinium MethylationEPIC (850K) BeadChip platform was carried out to identify DNA methylation markers of recurrence. Thirty-two histologically negative surgical margin samples were included, among which 16 from patients that developed local recurrence and 16 from patients that did not develop local recurrence. Generated data were analyzed using the R programming tool and specific data packages. **RESULTS:** In the methylome analysis, 311 differentially methylated positions (DMPs) and 23 differentially methylated regions (DMRs) were identified, contrasted between recurrent and non-recurrent groups. Six RDMs of greater interest, in a total of 19 CpG sites with at least 10% of methylation difference between the groups were selected. The region related to the GRHL3 gene proved to be a potential marker for worse prognosis in patients with CCECO. **CONCLUSIONS:** This study demonstrated that there are changes in DNA methylation in the histologically normal mucosa adjacent to the primary tumor of individuals with CCECO. These methylation patterns are capable of differing patients with a higher risk of developing local recurrences.

KEYWORDS: Carcinoma, Squamous Cell; Mouth; Margins of excision; Neoplasm Recurrence, Local; DNA methylation; Biomarkers.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais do câncer

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS)¹, câncer é uma proliferação descontrolada de células que podem invadir e se espalhar para outras partes do corpo. Propõe-se que o processo de carcinogênese seja composto por três estágios: iniciação, promoção e progressão, onde ocorre um acúmulo de alterações moleculares responsáveis pela transformação das células normais em células neoplásicas¹.

Pode-se entender o câncer como um problema de saúde pública mundial que abrange um número significativo e crescente de indivíduos, principalmente nos países em desenvolvimento, onde se esperam cerca de 16,0 milhões de novos casos de câncer em 2025 (80% do total)².

Os dados estatísticos mais recentes publicados pela OMS estimaram, para 2018, um total de aproximadamente 17,0 milhões de novos casos de câncer (exceto câncer de pele não-melanoma) e 9,5 milhões de mortes relacionadas a essa doença³. Nos Estados Unidos, a *American Cancer Society* (ACS) estimou, para 2017, quase 1,7 milhões de novos casos e mostrou que, de modo geral, as taxas de incidência e mortalidade em homens chegam a ser 20% e 40% superiores, respectivamente, em relação às mulheres⁴.

No Brasil, as estimativas realizadas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) para 2019 apontaram 600 mil novos casos de câncer, onde os tipos mais incidentes no sexo masculino devem ser próstata (31,7%), pulmão (8,7%), intestino (8,1%), estômago (6,3%) e cavidade oral (5,2%), enquanto no sexo feminino os tipos mais frequentes devem ser mama (29,5%), intestino (9,4%), colo do útero (8,1%), pulmão (6,2%) e tireoide (4,0%)⁵.

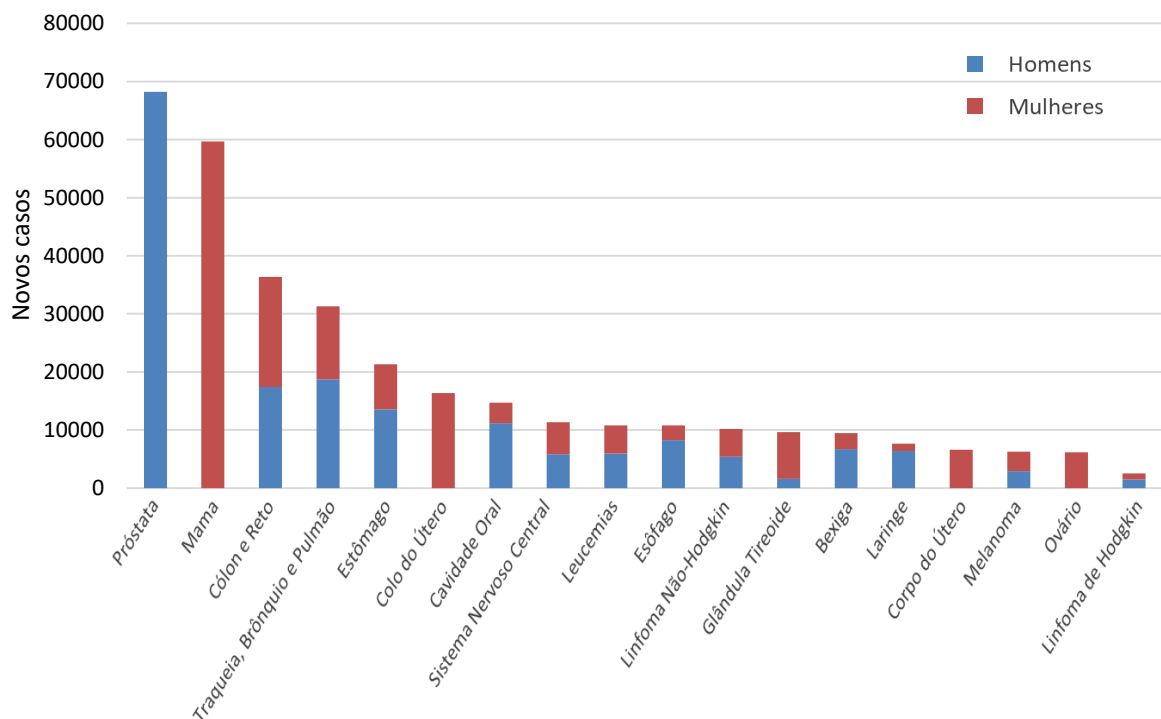
Para diminuir a incidência e mortalidade relacionadas ao câncer são necessárias ações de controle dos fatores de risco e de detecção precoce, garantindo assim um melhor tratamento e, como consequência, uma maior sobrevida dos pacientes.

1.2 Carcinomas de células escamosas de cavidade oral

O termo câncer de cabeça e pescoço relaciona-se a um conjunto de tumores epiteliais malignos localizados no trato aerodigestivo superior, que compreende principalmente a cavidade oral (língua, gengiva, palato duro, assoalho), faringe (orofaringe, nasofaringe, hipofaringe) e laringe¹. O carcinoma de células escamosas (CCE) é o subtipo histológico mais

frequente, compreendendo mais de 95% dos casos⁶, e o CCE de cabeça e pescoço (CCECP) encontra-se em sétima posição dentre os mais frequentes tipos de câncer no mundo, representando 4,9% do total³.

O tumor mais comum dentro do conjunto do câncer de cabeça e pescoço é o carcinoma de células escamosas da cavidade oral (CCECO), que acomete principalmente pacientes do sexo masculino, entre a quinta e oitava década de vida⁷. No Brasil, para os anos 2018/2019, o câncer de cavidade oral (CCO) foi previsto como o 7º câncer mais incidente em ambos os sexos, com 11.200 novos casos para homens e 3.500 novos casos para mulheres⁵ (Figura 1).



Fonte: Segundo dados do INCA⁵.

Figura 1 - Tipos de câncer mais incidentes na população brasileira, em ambos os sexos, para o biênio 2018/2019.

O desenvolvimento de um CCE se dá geralmente a partir de uma hiperplasia epitelial, progredindo para uma displasia, um carcinoma *in situ* e depois para a forma invasiva^{8, 9}. Segundo o INCA, fatores ambientais são responsáveis por 80% dos casos de câncer no mundo. Dentre estes fatores, o tabagismo e o etilismo estão intensivamente relacionados ao câncer de cabeça e pescoço, principalmente ao CCE, podendo explicar de 65 a 80% de sua incidência^{10,11}. Segundo Hashibe e colaboradores¹², o tabaco aumenta em três vezes o risco de desenvolvimento do CCECO na população geral e, quando associado ao consumo de álcool,

este aumento de risco pode elevar-se para até 15 vezes. Outro fator de risco importante é a infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) que pode ser encontrada em 20% dos casos¹³.

O sistema mais consolidado para classificação de tumores sólidos é o estadiamento TNM¹⁴ (Tumor, Linfonodo, Metástase), baseado na avaliação clínica e patológica do tamanho do tumor, envolvimento linfonodal e *status* de metástases à distância (Tabela 1).

Tabela 1 - Classificação TNM para estadiamento do câncer de cavidade oral.

Variável	Classificação	Definição
Tumor primário	Tx	Não pode ser acessado
	T0	Sem evidência
	T1	≤2 cm na maior dimensão
	T2	>2 cm e ≤4 cm na maior dimensão
	T3	>4 cm na maior dimensão
	T4a	Invade osso cortical, musculatura extrínseca da língua, sino maxilar e/ou pele da face
	T4b	Invade espaço mastigatório, espaço pterigoide, e/ou base do crânio, e/ou artéria carótida interna
Linfonodos regionais	Nx	Não pode ser acessado
	N0	Sem evidência
	N1	Linfonodo ipsilateral, ≤3 cm na maior dimensão
	N2a	Único linfonodo ipsilateral >3 cm e ≤6 cm
	N2b	2 ou mais linfonodos ipsilaterais, ≤6 cm na maior dimensão
	N2c	Linfonodos bilaterais ou contralaterais, ≤6 cm na maior dimensão
N3	Qualquer linfonodo >6 cm na maior dimensão	
Metástase à distância	Mx	Não pode ser acessado
	M0	Sem evidência
	M1	Qualquer

Fonte: adaptado de AJCC Cancer Staging Manual, 7th edition.

TNM: Tumor, Linfonodo, Metástase.

A partir da combinação destes fatores, os tumores são classificados em diferentes estágios, sendo:

- Estadiamento clínico (EC) I: T1, N0, M0
- EC II: T2, N0, M0
- EC III: T3, N0-1, M0 ou T1-3, N1, M0
- EC IVA: T4a, N0-1, M0 ou T1-4a, N2, M0
- EC IVB: qualquer T, N3, M0 ou T4b, qualquer N, M0
- EC IVC: qualquer T, qualquer N, M1

Entretanto, o sistema nem sempre fornece informações precisas sobre o prognóstico, havendo a necessidade de considerar fatores complementares, como localização do tumor,

extravasamento capsular, infiltração perineural, *status* das margens cirúrgicas, entre outros, para redefinir o prognóstico e permitir a seleção do tratamento mais apropriado¹⁵.

Cerca de um terço dos pacientes de CCECO é diagnosticado nos estágios iniciais da doença (EC I e II)⁹. Uma excisão com adequadas margens cirúrgicas é o procedimento mais bem estabelecido e aceito atualmente para estes casos^{16, 17}. Pode-se realizar a biópsia do(s) linfonodo(s) sentinela para o microestadiamento linfonodal e, caso positivo(s) para células tumorais, uma cirurgia linfonodal mais extensa pode ser exigida, além da introdução de tratamento adjuvante, mais comumente radioterapia¹⁷. Uma meta-análise realizada em 2013 por Thompson e colaboradores¹⁸ demonstrou que a abordagem do linfonodo sentinela no tratamento do câncer de cabeça e pescoço apresenta 95% de sensibilidade e 96% de valor preditivo negativo. No Brasil, dados publicados pelo Registro Hospitalar de Câncer¹⁹ do Hospital de Câncer de Barretos demonstraram que a sobrevida global em 5 anos varia entre 63-71% para pacientes de CCO diagnosticados em estadiamento I e de 51-53% para pacientes de CCO diagnosticados em estadiamento II.

Para tumores em estágios mais avançados (EC III e IV), com risco de desenvolvimento de recidivas loco-regionais, a recomendação da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) é a realização da cirurgia com ressecção linfonodal do pescoço, mais radioterapia e/ou quimioterapia adjuvante¹⁷. Para os regimes envolvendo as duas modalidades, denominados quimiorradiação, são utilizadas combinações de tratamento sistêmico, baseado em cisplatina e taxol, mais o tratamento radioterápico²⁰. Em 2006, a introdução do medicamento Cetuximab, anticorpo monoclonal que tem como alvo o receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*), aumentou a taxa de resposta e as sobrevidas global e livre de progressão de pacientes com doença recorrente ou metastática^{21, 22}. Além disso, com o advento da imunoterapia, modalidade terapêutica que encontra-se ainda em fase de estudos, espera-se alcançar melhores respostas a longo prazo e menores graus de toxicidade comparados à quimioterapia convencional²⁰. De acordo com o Registro Hospitalar de Câncer¹⁹, pacientes diagnosticados em estadiamento III apresentam sobrevida global em 5 anos variando de 39-43%, enquanto pacientes em estadiamento IV a sobrevida varia entre 14-25%.

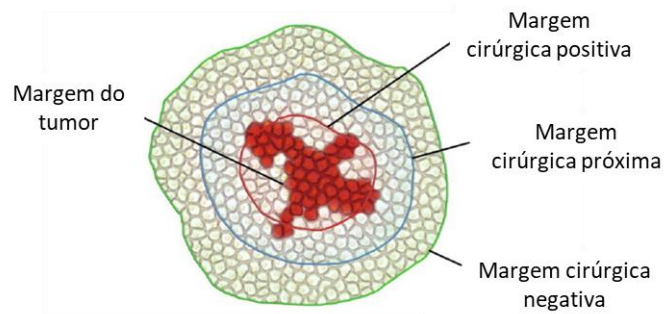
Devido à localização do tumor, o tratamento exige cautela, pois se deve considerar também a perda de estrutura e função, principalmente em relação à mastigação e à fala²³. Apesar das diferentes estratégias utilizadas e dos recentes avanços no tratamento (incluindo opções de cirurgia minimamente invasiva e novas combinações terapêuticas e

medicamentos), a taxa de sobrevida global em 5 anos para o CCECO encontra-se em torno de 60%²⁴⁻²⁸. A principal razão para falha no tratamento é o desenvolvimento de recidivas loco-regionais, ou seja, o reaparecimento do tumor após um período sem doença detectável. Essas recidivas podem se desenvolver no mesmo local do tumor primário (recidivas locais) ou nos linfonodos próximos ao sítio primário do tumor (recidivas regionais). As taxas de recidivas loco-regionais em pacientes com CCO variam de 15 a 40%²⁸⁻³². Pacientes de CCECO que desenvolvem recidivas locais apresentam taxas de sobrevida doença-específica de aproximadamente 25%²⁸. A maioria destas recidivas ocorre em até dois anos após o tratamento^{29, 31, 33}.

1.3 Margens Cirúrgicas

As margens cirúrgicas referem-se às bordas de tecido normal que são removidas juntamente com a excisão cirúrgica de um tumor para avaliação da eficácia do procedimento no controle local da doença³⁴. Sua avaliação geralmente é feita por diagnóstico histológico visível, através de confecção de lâminas de hematoxilina e eosina (H&E). Considerando um tecido tridimensional, as margens cirúrgicas podem ser divididas em margens de mucosa e margens profundas. A margem de mucosa compreende o tecido superficial de mucosa ao redor do tumor, enquanto a margem profunda é composta pelos tecidos moles abaixo do tumor, como músculo esquelético, tecido adiposo e feixes neurovasculares³⁵.

Para os CCECP, uma ressecção adequada de margens cirúrgicas é considerada elemento essencial para alcançar os melhores resultados para os pacientes³⁶. De acordo com a análise histopatológica, as margens podem ser classificadas em positivas (com presença de células tumorais na borda da peça cirúrgica excisada), próximas (margem a uma distância de 1–5 mm do tumor) ou negativas (margem a uma distância > 5 mm do tumor)^{37, 38} (Figura 2).



Fonte: Adaptado de Erickson-Bhatt et al.³⁹

Figura 2 - Representação de uma peça de tumor ressecado (em vermelho) e margens cirúrgicas. Margens positivas são consideradas quando as células tumorais são encontradas na borda do tecido ressecado. Margens livres são consideradas quando há apenas células histologicamente normais na borda deste tecido e, dependendo de sua distância para o tumor, elas são definidas como margens próximas ou negativas.

A presença de tumor microscópico nas margens cirúrgicas contribui para o aumento das taxas de recidiva local e redução da sobrevida global dos pacientes^{40, 41, 42}. Assim, a obtenção de margens livres de tumor no momento da cirurgia é de suma importância para a diminuição destas taxas de recidiva. Entretanto, de 10 a 30% dos pacientes com margens histológicas negativas vão apresentar recidivas loco-regionais^{43, 44}. Nestes casos, a ressecção cirúrgica talvez não tenha sido capaz de remover todas as células tumorais, pois algumas células de tecidos adjacentes histologicamente normais podem já apresentar alterações moleculares que não podem ser identificadas pelos métodos convencionais e que poderão contribuir para a transformação maligna. Deste modo, a avaliação da margem cirúrgica pela forma convencional durante o ato cirúrgico, através da análise histopatológica, não garante a excisão completa de todas as células tumorais^{40, 45}.

Outra explicação para a alta frequência de recidivas locais nos pacientes portadores de câncer de cabeça e pescoço, em especial o câncer de cavidade oral, é a teoria de cancerização de campo proposta por Slaughter e colaboradores⁴⁶, onde foi observada a presença de tecido molecularmente alterado nas margens de amostras de CCECO. Segundo esta teoria, em pacientes portadores de CCO os efeitos carcinogênicos principalmente do tabaco e do álcool teriam provocado alterações em toda (ou em boa parte da) mucosa do paciente, sendo que algumas áreas podem evoluir posteriormente para lesões tumorais, que, a depender da distância do tumor primário e do intervalo de tempo para o aparecimento desta lesão, poderão ser consideradas como recidiva local ou segundo tumor primário. Diversos estudos têm sugerido a presença de alterações genéticas e/ou epigenéticas prévias ao aparecimento do fenótipo do câncer na mucosa adjacente ao tumor primário^{40, 43, 47, 48}.

1.4 Alterações moleculares e o câncer

Além das características clínicas e patológicas, há um crescente interesse na identificação de marcadores moleculares que possam influenciar na conduta clínica. Estes marcadores podem fornecer informações prognósticas úteis e vir a constituir novos alvos terapêuticos.

As células neoplásicas possuem características importantes que permitem que elas sobrevivam no organismo e se desenvolvam em um tumor. Hanahan e Weinberg^{49,50} descreveram algumas características como responsáveis pela diversidade de tipos de câncer, sendo: resistência à morte celular, desregulação energética da célula, proliferação descontrolada e independente de estímulo, insensibilidade a supressores de crescimento, evasão do sistema imune, capacidade de imortalidade replicativa, inflamação indutora de tumor, ativação de invasão e metástase, indução de angiogênese, instabilidade genômica e mutações.

O câncer é, portanto, uma doença genética cuja iniciação e progressão envolvem múltiplos passos, nos quais a célula acumula uma série de alterações genéticas e epigenéticas que afetam diferentes vias de regulação de processos como proliferação celular, diferenciação e sobrevivência, com amplificação e ativação de protooncogenes e perda ou inativação dos alelos de genes supressores de tumor^{49, 51}.

Protooncogenes são genes responsáveis por codificar proteínas relacionadas à proliferação e sobrevivência celular. Quando sofrem uma mutação ou apresentam expressão aumentada, tornam-se oncogenes, favorecendo a divisão anormal das células e o desenvolvimento do câncer. Já os genes supressores de tumor têm a função de regular o ciclo celular e sinalizar a morte celular programada (apoptose). Se inativos, seu silenciamento pode conduzir ao processo de carcinogênese⁵².

As alterações epigenéticas caracterizam-se por alterar o fenótipo sem alterar o genótipo, ou seja, sem alterações na sequência primária de DNA⁵³. Diferentemente das alterações genéticas, as modificações epigenéticas são reversíveis e afetam a estrutura da cromatina e a expressão gênica sem alterar a sequência de nucleotídeos. Por meio de mecanismos como a metilação do DNA, as modificações de histonas e as vias de silenciamento mediadas por RNAs não codificantes (miRNA), as formas de expressão dos genes são diferenciadas e, por consequência, diferentes fenótipos podem ocorrer⁵⁴.

O evento epigenético mais estudado em humanos é a metilação do DNA, que consiste na adição covalente de um radical metil (-CH₃) em citosinas localizadas a 5' de guaninas e tem como principal alvo as ilhas CpG, regiões ricas, porém não exclusivas, em citosinas e guaninas que estão presentes nas regiões promotoras de alguns genes⁵⁵. Genes com transcrição ativa geralmente possuem as ilhas CpG de suas regiões promotoras não metiladas, porém, se estas regiões estão hipermetiladas a transcrição do gene é interrompida e a expressão do gene correspondente é silenciada⁵⁵. Tal silenciamento pode ocorrer através de três processos diferentes: (1) interferência direta na ligação de fatores de transcrição aos seus sítios de reconhecimento nos promotores gênicos, (2) ligação de repressores transcricionais específicos do DNA metilado, conhecidos como proteínas de ligação de metil-CpG, os quais apresentam grande afinidade pelo DNA metilado, e (3) alteração da estrutura da cromatina pelo DNA metilado, com a cromatina passando de um estado de eucromatina menos condensada para uma conformação mais compacta que acaba impedindo a ligação dos fatores de transcrição aos seus sítios na região promotora⁵⁶.

A metilação ocorre pela ação de enzimas conhecidas como DNA-metiltransferases (DNMTs). Quatro enzimas pertencentes às DNMTs estão associadas a este processo: DNMT1, responsável pela manutenção dos modelos de metilação existentes após a replicação do DNA; DNMT3A e DNMT3B, enzimas com função *de novo* responsáveis por estabelecer o perfil de metilação durante o desenvolvimento do embrião; e DNMT3L, envolvida na gametogênese e responsável pelo *imprinting* genômico materno^{55,57}.

As células normais do organismo possuem um perfil de metilação natural adquirido durante o desenvolvimento embrionário e que prevalece durante a vida adulta. Os padrões únicos de metilação do DNA no genoma são responsáveis pela definição do estado epigenético da célula e pela expressão tecido-específica⁵⁸. Quando este perfil epigenético é reprogramado, podem ocorrer mudanças fundamentais na biologia da célula, resultando no aparecimento de doenças, como o câncer⁵⁹. As células tumorais apresentam expressiva perda de metilação global do material genético e hipermetilação de ilhas CpG em regiões promotoras dos genes. Essa desregulação pode ser associada aos estágios iniciais do desenvolvimento das neoplasias malignas, onde protooncogenes são ativados, genes supressores tumorais são suprimidos e o genoma se torna instável⁶⁰. Estima-se que existam cerca de 600 ilhas CpG metiladas de forma aberrante em tecidos tumorais quando comparados a tecidos normais e essa metilação não ocorre de forma randômica⁶¹.

No câncer, a metilação aberrante ocorre principalmente, mas não exclusivamente, em promotores de genes supressores tumorais⁵⁵. No caso do câncer de cabeça e pescoço, a metilação anormal em regiões promotoras pode afetar muitos genes envolvidos nos principais mecanismos celulares, como reparo de danos do DNA⁶², diferenciação e proliferação celular⁶³, apoptose⁶⁴, controle do ciclo celular⁶⁵, invasão⁶⁶ e adesão^{67, 68}.

1.5 Estudos envolvendo análise de metilação em margens cirúrgicas

Tentativas de análise das margens cirúrgicas por imunohistoquímica têm sido propostas. Singh e colaboradores⁶⁹ demonstraram que as proteínas p53 e eIF4E encontram-se superexpressas em 54,2% e 87,5% dos casos de câncer de cabeça e pescoço, respectivamente e, além disso, a presença de níveis elevados destas proteínas em margens cirúrgicas com histologia negativa (livres de tumor) foi capaz de prever a recidiva em pacientes com tumores de cabeça e pescoço. Outro estudo⁷⁰ demonstrou que a expressão de MMP-9 em margens cirúrgicas negativas de pacientes com CCECO pode prever o desenvolvimento de recidiva tumoral. Estes resultados demonstram que os ensaios de imunohistoquímica podem indicar a presença de alterações moleculares nas margens cirúrgicas com histologia negativa. Entretanto, ensaios mais sensíveis para análise destas margens poderiam beneficiar estes pacientes.

O perfil de metilação dos genes *p16*, *MGMT* e *DAPK* já foi avaliado por diversos estudos e estes genes estavam frequentemente hipermetilados em amostras de câncer de cabeça e pescoço e de margem cirúrgica⁷¹⁻⁷³. Tan e colaboradores⁷⁴ avaliaram o perfil de metilação dos genes *p16*, *CCNA1* e *DCC* em 42 pacientes com câncer de cabeça e pescoço e a presença de hipermetilação nas margens molecularmente positivas teve correlação com recidiva local nestes pacientes. Outro trabalho envolvendo 82 pacientes com CCECP avaliou o perfil de hipermetilação do gene *PAX5* e encontrou que os pacientes com margens molecularmente positivas mostraram significativamente pior sobrevida livre de doença ($p=0,044$) quando comparados com pacientes com margens molecularmente negativas⁷⁵. Um estudo conduzido por Shaw e colaboradores⁷⁶ encontrou margens cirúrgicas positivas para metilação em pelo menos um dos 4 genes estudados (*p16*, *Cytoglobin*, *E-cadherin* e *TMEFF2*) em 87% dos casos avaliados. Roh e colaboradores⁷⁷ avaliaram 17 tumores pareados com suas respectivas margens e encontraram hipermetilação de pelo menos um dos genes estudados (*p16*, *DCC*, *KIF1A* e *EDNRB*) em 12 tumores e 8 margens. Durante o *follow-up*, recidivas locais ou regionais

ocorreram em 6 casos, dos quais 5 tiveram margens hipermetiladas detectadas nas análises moleculares. A combinação dos genes *EDNRB* e *HOXA9* hipermetilados em margens foi descrito como importante preditor de sobrevida livre de recidiva loco-regional. Além disso, a metilação de ambos *EDNRB* e *HOXA9* indicou uma tendência na redução da sobrevida livre de recidiva e sobrevida global⁴³. Por fim, a presença de hipermetilação do gene *DAPK* detectada em margens cirúrgicas foi associada com a diminuição da sobrevida global em pacientes com CCECO⁷⁸, enquanto a hipermetilação de *PAX1* e *ZNF582* em margens foi associada a uma progressão agressiva e pior prognóstico em CCECO⁷⁹.

Estes resultados demonstram que a metilação do DNA em margens cirúrgicas histologicamente negativas é um evento frequente e deve ser melhor compreendido.

2 JUSTIFICATIVA

A metilação do DNA tem demonstrado elevado potencial como biomarcador para preconizar diagnóstico, auxiliar na classificação dos tumores e facilitar prognóstico e desenvolvimento de novas terapias, uma vez que é considerada um evento precoce no desenvolvimento das neoplasias.

São poucos os estudos envolvendo metilação de margens cirúrgicas em CCECO e a análise realizada nestes estudos limita-se às regiões promotoras de alguns genes reconhecidamente relacionados à carcinogênese. Sendo assim, uma análise extensiva do perfil de metilação destas amostras, abrangendo não somente as regiões promotoras, mas todas as regiões gênicas, pode não só contribuir para aumentar o conhecimento dos tumores de cavidade oral, mas também trazer implicações práticas e benefícios no que diz respeito à assistência clínica destes pacientes, uma vez que até o presente momento não existem marcadores de prognóstico molecular do câncer de cavidade oral que sejam utilizados clinicamente.

Assim, é importante a identificação de marcadores capazes de indicar um risco para o desenvolvimento de recidivas, uma vez que estas são responsáveis por grande parcela das falhas no tratamento do câncer de cavidade oral.

3 HIPÓTESE

As margens cirúrgicas histologicamente negativas de pacientes com CCECO apresentam padrões de metilação específicos do DNA que podem ser utilizados para prever o desenvolvimento de recidiva local do tumor.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

O estudo proposto visa avaliar o padrão de metilação do DNA em margens cirúrgicas histologicamente negativas de pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral (CCECO) como fator preditivo para recidiva tumoral.

4.2 Objetivos específicos

- Determinar o perfil de metilação de amostras de margens cirúrgicas com histologia negativa para células tumorais provenientes de pacientes com CCECO, utilizando uma análise de metilação global;
- Estabelecer a associação entre o perfil de metilação encontrado e a recidiva local dos tumores.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Pacientes

Este é um estudo observacional transversal com coleta retrospectiva de amostras e dados. A casuística foi selecionada por conveniência. Os pacientes foram submetidos a tratamento cirúrgico na Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos (HCB) entre os anos 2007 e 2015. Foram levantados dados epidemiológicos (sexo, idade, *status* do tabagismo, *status* do etilismo), clínicos (sub-localização anatômica, estadiamento TNM, tratamentos realizados) e de anatomia-patológica (pT, pN, infiltração perineural, infiltração angiolinfática, profundidade de invasão tumoral, *status* das margens cirúrgicas, grau de diferenciação tumoral, extensão extracapsular linfonodal).

Inicialmente, foi realizado um levantamento de todas as amostras criopreservadas de margens cirúrgicas de pacientes com CCECO que estão disponíveis no Biobanco do HCB. Essa busca foi realizada por meio do acesso ao sistema SISONCO, onde são disponibilizadas informações básicas em relação à quantidade, topografia, morfologia e tipos de amostras disponíveis.

Os seguintes critérios de elegibilidade para inclusão de casos no estudo foram adotados:

- Lesão situada na cavidade oral, de acordo com a classificação CID-O descrita na publicação da União Internacional Contra o Câncer (UICC):
 - C02.0, 1, 2 (língua oral)
 - C03.0, 1 (gengiva)
 - C04.0 (assoalho de boca)
- Casos ressecáveis submetidos a tratamento cirúrgico;
- Tratamento realizado no período de 2007 a 2015;
- Diagnóstico histológico de carcinoma de células escamosas;
- Ausência de história pregressa de câncer de cabeça e pescoço;
- Ausência de tratamento prévio;
- Margens cirúrgicas histologicamente negativas;
- Dados clinicopatológicos disponíveis.

Foram excluídos os casos com as seguintes características:

- Casos com tumores sincrônicos;
- Casos com margens comprometidas por displasia moderada e/ou severa;
- Pacientes do grupo sem recidiva local com tempo de seguimento inferior a 2 anos (perda de seguimento);
- Pacientes do grupo sem recidiva local que realizaram tratamento adjuvante;
- Amostras de DNA de margens histologicamente normais com quantificação e qualidade insuficientes para análise molecular;
- Amostras de DNA de margens histologicamente normais reservadas para outros projetos de pesquisa.

Após busca no sistema, 131 casos com amostras disponíveis no Biobanco se encaixavam nos critérios de inclusão, os quais foram verificados para presença ou ausência de recidiva local. Na análise em prontuários foi constatado que 21 pacientes desenvolveram recidiva local, enquanto 110 não apresentaram recidiva. Para o grupo de pacientes com recidiva a seleção final de casos se deu de acordo com a disponibilidade e quantificação das amostras, onde 5 foram excluídas por estes motivos. Já para o grupo de pacientes sem recidiva, a casuística foi fechada após exclusão de 94 pacientes que realizaram tratamento adjuvante, objetivando com isso garantir que a não ocorrência da recidiva não tenha relação com o tratamento dado após a cirurgia. Sendo assim, 32 pacientes foram incluídos no estudo, sendo 16 que desenvolveram recidiva local e 16 que não desenvolveram recidiva local.

5.2 Análise histopatológica e obtenção do material para análise molecular

Após a ressecção de um CCECO, rotineiramente a peça cirúrgica é encaminhada para análise anatomopatológica das margens com confecção dos blocos de parafina e lâminas de H&E. Adicionalmente, um fragmento de margem é enviado para armazenamento no Banco de Tumores (Biobanco). Considerando a disponibilidade do material armazenado, uma margem de mucosa criopreservada de cada paciente foi utilizada.

O material analisado neste estudo consistiu de amostras congeladas de tecido de margens cirúrgicas de mucosa histologicamente negativas de pacientes com CCECO. Antes de serem incluídas no estudo, todas as amostras foram reanalisadas por um patologista para

confirmação da ausência de células tumorais no material congelado. Para isso, uma nova lâmina de H&E foi confeccionada.

5.3 Extração de DNA

A extração do material criopreservado foi realizada pelo Biobanco do HCB utilizando-se o QIAasympphony DNA Mini Kit no equipamento QIAasympphony SP (*Qiagen*, Hilden, Alemanha). O protocolo de extração de DNA de tecidos por este método iniciou-se com a transferência da amostra de tecido para um tubo de 2 mL. Em seguida, foram adicionados 220 μ L de tampão ATL e 20 μ L de Proteinase K e o material foi incubado a 56 °C e 900 rotações por minuto (rpm) em agitador térmico para lise celular. Após lise completa do material, adicionaram-se 4 μ L de RNase A (100 mg/mL) para obtenção do DNA genômico livre de RNA. As amostras foram incubadas por 2 minutos à temperatura ambiente (15-25 °C), homogeneizadas, e 220 μ L do sobrenadante foram transferidos para os tubos de amostra compatíveis com o equipamento QIAasympphony SP.

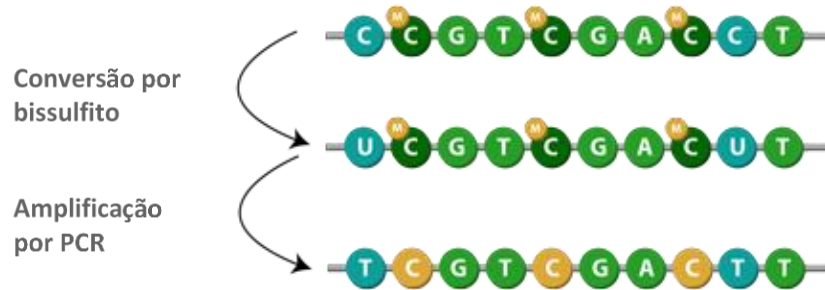
A tecnologia QIAasympphony realiza a purificação automatizada de materiais biológicos através do manuseio de partículas magnéticas e possui quatro etapas: lisar, vincular, lavar e eluir. Durante o processo, uma haste magnética entra no tubo contendo a amostra, um tampão de ligação e partículas magnéticas. O DNA se liga a estas partículas e é atraído pela haste, que carrega o material para outro tubo e o libera. Por fim, as amostras de DNA foram eluídas em 50 μ L e armazenadas a -20 °C até sua utilização.

A quantificação, qualidade e pureza do DNA das amostras foram determinadas por densidade óptica em um espectrofotômetro com comprimentos de onda de 230/260/280 nanômetros (nm) (NanoDrop 2000 (*Thermo Scientific*, Waltham, EUA)) e estão disponibilizadas na tabela suplementar 2 (Anexo B).

5.4 Tratamento do DNA com bissulfito de sódio

O método de conversão por bissulfito de sódio é o mais utilizado atualmente para detectar e quantificar com eficiência e acurácia a metilação do DNA. O tratamento consiste na conversão de citosinas não metiladas em uracilas por meio de desaminação, enquanto a 5mC (5-metil-citosina) não é convertida devido à sua baixa reatividade (Figura 3). Por ser um análogo da timina, a uracila é reconhecida pela DNA polimerase como timina e após uma

reação de amplificação, essa uracila é convertida em timina no produto, enquanto a 5mC permanece inalterada durante o processo.



Fonte: Adaptado de Epigentek⁸⁰.

Figura 3 - Representação da reação de conversão do DNA por bissulfito de sódio e posterior amplificação do material tratado por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Para as análises de metilação do estudo, 600 ng do DNA proveniente das margens cirúrgicas criopreservadas foram submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio utilizando-se o EZ DNA Methylation™ Kit (Zymo Research, Irvine, EUA). Em tubos *ependorf* de 0,2 mL foram adicionados 5 µL de tampão *M-Dilution* às amostras de DNA e o volume final foi ajustado para 50 µL com água ultrapura para concentração final adequada de material a ser tratado. As amostras foram homogêneas e incubadas a 37 °C por 15 minutos. Após incubação, 100 µL do CT *Conversion Reagent* foram adicionados a cada amostra. A reação de conversão seguinte foi realizada em termociclador Veriti (*Applied Biosystems*, Foster City, EUA) com 16 ciclos de 95 °C por 30 segundos e 50 °C por 60 minutos. As amostras foram mantidas a 4 °C até a próxima etapa.

Com o processo de conversão finalizado, os tubos foram retirados e a solução transferida para a coluna *Zymo-Spin™ IC* previamente preparada com 400 µL de tampão *M-Binding*. Os tubos foram invertidos diversas vezes para homogeneização do conteúdo e centrifugados a 15.000 rpm por 1 minuto. Em seguida, uma sucessão de lavagens foi realizada, primeiramente com 100 µL de tampão *M-Wash*, depois com 200 µL de tampão *M-Desulphonation* (com repouso de 15-20 minutos à temperatura ambiente) e mais duas lavagens com 200 µL de tampão *M-Wash*, centrifugando cada adição a 15.000 rpm por 1 minuto.

Finalmente, as colunas foram transferidas para novos tubos de 1,5 mL, foram adicionados 14,4 µL de tampão *M-Elution* diretamente sobre a coluna e os tubos

centrifugados a 15.000 rpm por 2 minutos para eluição do DNA. Uma vez convertido, o perfil de metilação deste DNA pôde ser determinado.

Após a conversão por bissulfito, uma reação em cadeia da polimerase (PCR) foi executada a fim de verificar a eficiência da reação, ao amplificar a sequência repetitiva *LINE-1* (*Long Interspersed Nuclear Element 1*) do DNA convertido. Uma vez que os primers são desenhados para anelar na sequência já convertida do material genético, é possível afirmar que a conversão ocorreu de forma efetiva a partir da confirmação da amplificação do gene. Foram utilizados os seguintes primers *forward* 5'- TAGGGAGTGTTAGATAGTGG-3' e *reverse* 5'- AACTCCCTAACCCCTTAC-3', que amplificam uma região de 120 pares de bases.

A reação foi composta pelos componentes descritos na tabela 2 e a ciclagem realizada com uma desnaturação inicial a 95 °C por 15 minutos, seguida de 50 ciclos de 95 °C por 40 segundos, 56 °C por 40 segundos e 72 °C por 40 segundos, e uma etapa de extensão final a 72 °C por 10 min. As amostras foram mantidas a 18 °C ao final da reação.

Tabela 2 - Composição da PCR para o *LINE-1* para cada amostra de estudo.

Componente	Volume
Água RNase-free	39,75 µL
10x PCR Buffer	5 µL
10 mM dNTP mix	1 µL
50 mM MgCl ₂	1,5 µL
10 µM Primer <i>forward</i>	1 µL
10 µM Primer <i>reverse</i>	1 µL
Taq Platinum	0,25 µL
DNA molde	0,5 µL
Total	50 µL

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; mM: milimolar; µM: micromolar.

A sequência repetitiva *LINE-1* é considerada boa indicadora dos níveis de metilação global do genoma, uma vez que cerca de um terço da metilação do DNA ocorre em elementos repetitivos⁸¹. Além disso, a hipometilação global do DNA é frequentemente observada durante os estágios iniciais do desenvolvimento e progressão de tumores⁸².

Por fim, 7 µL do produto da reação de PCR foram utilizados para confirmar a qualidade da mesma em gel de agarose 2%. Para evitar degradação, posteriormente ao uso os tubos contendo DNA convertido foram armazenados à -80 °C.

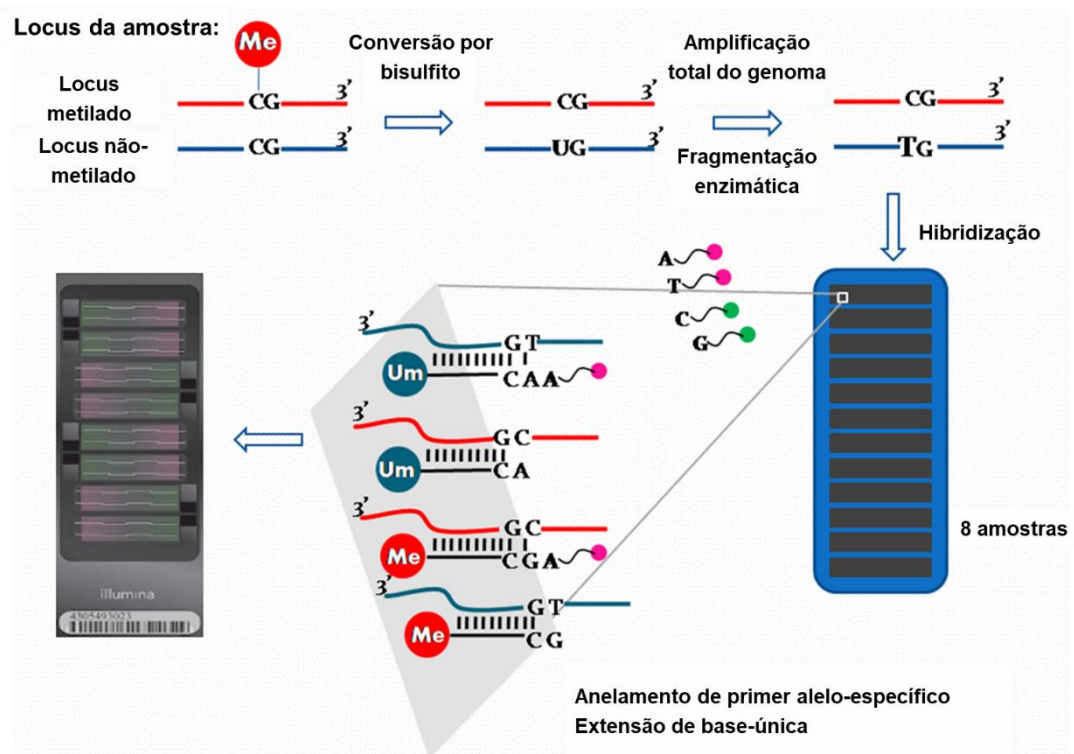
5.5 Array de metilação do DNA

As amostras foram estratificadas com base no *status* de recidiva local, sendo 16 provenientes de pacientes que desenvolveram recidiva local e 16 de pacientes que não desenvolveram recidiva local. Estas amostras de DNA tratadas com bissulfito, provenientes das margens cirúrgicas criopreservadas de pacientes com CCECO, foram submetidas à análise global de metilação utilizando-se a plataforma 850K da *Illumina – Infinium MethylationEPIC BeadChip* (*Illumina*, San Diego, EUA), sendo esta etapa executada em colaboração com o INCA, sob supervisão do Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto e da Dra. Sheila Coelho Soares Lima.

A plataforma 850k analisa 866.091 posições de citosinas no genoma humano, sendo 99,7% dinucleotídeos CpG e 0,3% alvos CNG. Os sítios CpG cobrem 99% dos genes bem caracterizados no banco de dados de sequências de referência NCBI (RefSeq) ou sítios que provavelmente regulam a expressão gênica⁸³.

O *array* de metilação é um ensaio baseado na conversão do DNA genômico por bissulfito de sódio e foi realizado segundo protocolo *Infinium HD Methylation Assay*⁸⁴. Brevemente, o ensaio consistiu de uma etapa de desnaturação e neutralização para preparar as amostras de DNA convertidas para amplificação total do genoma. O processo de amplificação do DNA foi feito isotermicamente por 20-24h. Em seguida, o produto amplificado foi fragmentado por um processo enzimático controlado e precipitado com isopropanol.

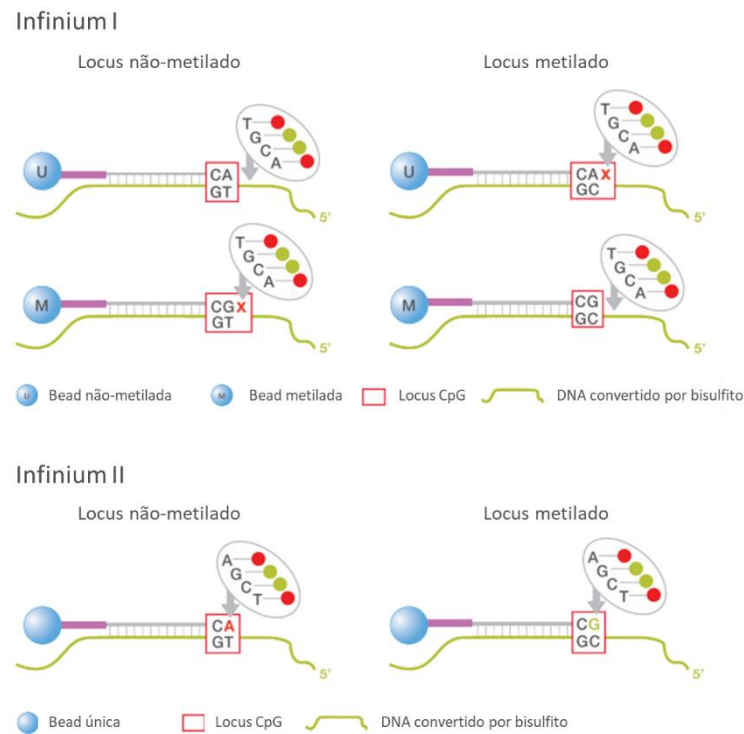
O DNA foi então ressuspendido em tampão de hibridização e 8 amostras foram dispensadas em cada BeadChip, totalizando 4 chips, e incubadas em forno de hibridização a 48 °C por 16 horas, a fim de permitir a ligação do DNA fragmentado com as sondas oligonucleotídicas presentes nos chips. O DNA não hibridizado foi então lavado e os BeadChips preparados para coloração e extensão de base única em câmaras de fluxo capilar. A extensão de base única dos oligos nos BeadChips foi feita utilizando o DNA capturado como modelo e incorporando *labels* detectáveis para determinação do nível de metilação dos sítios CpG avaliados (Figura 4).



Fonte: Adaptado de Wikipedia⁸⁵.

Figura 4 - Fluxograma de funcionamento do ensaio *Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip*.

Uma ou duas sondas são usadas para analisar um locus CpG. A extremidade 3' das sondas é posicionada imediatamente após o nucleotídeo C do sítio CpG (*Infinium I*) ou diretamente nele (*Infinium II*). A extensão de bases única alelo-específica das sondas incorpora um nucleotídeo de biotina (C ou G) ou um nucleotídeo marcado com dinitrofenilo (A ou T). Os dois tipos de sondas utilizados neste passo estão representados na figura 5.



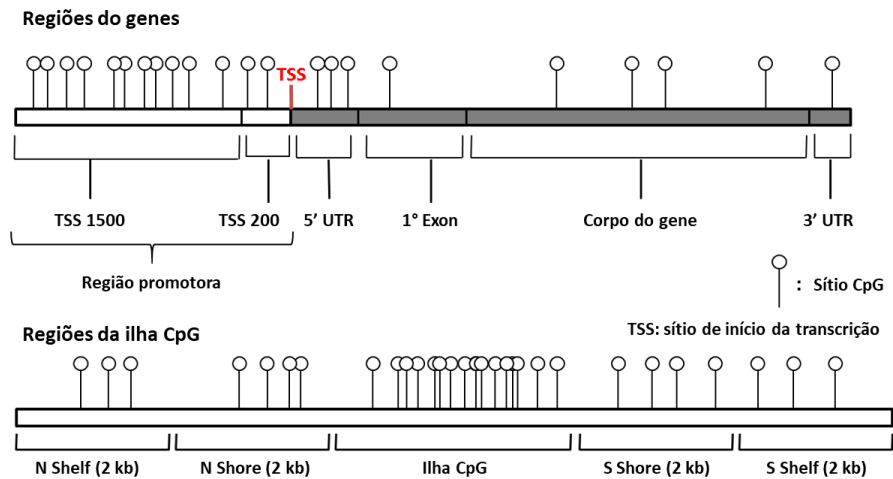
Fonte: Illumina⁸⁶.

Figura 5 - Sondas Infinium I e Infinium II utilizadas no ensaio *Illumina Infinium MethylationEPIC Beadchip*.

Ao final da reação, a intensidade do sinal foi medida pelo sistema *Illumina iScan*, que utiliza um laser para excitar o fluoróforo do produto de extensão de base única, gerando arquivos de dados de intensidade (*Intensity Data files – .idat*). Estes arquivos contém os valores brutos de intensidade do sinal para cada sonda e foram posteriormente utilizados para calcular os níveis de metilação para cada sítio CpG.

A metilação do DNA é representada em termos de valores beta (β), que representam o grau de metilação para cada sítio CpG e são definidos como a razão das intensidades de fluorescência das sondas metiladas em relação ao total de sondas (metiladas + não metiladas). Estes valores variam entre 0 (não metilado) e 1 (totalmente metilado) e representam a porcentagem de células metiladas em cada CpG⁸⁷.

O sistema fornece uma ampla cobertura ao longo das regiões gênicas (Figura 6), permitindo uma visão abrangente do padrão de metilação destas regiões (corpo do gene, regiões 5' e 3' não traduzidas – 5' UTR e 3' UTR, região intergênica, região promotora), assim como das ilhas CpG, *shores* [regiões de baixa densidade em CpG localizadas a cerca de 2 kilobases (kb) das ilhas CpG] e *shelves* (regiões que flanqueiam as *shores*)⁸⁸.



Fonte: Adaptado de Methhc⁸⁹.

Figura 6 - Distribuição das sondas do ensaio *Illumina Infinium MethylationEPIC Beadchip* em todas as regiões gênicas e regiões referentes às ilhas CpG.

5.6 Análise de bioinformática do *array* de metilação

A análise por bioinformática foi conduzida em colaboração com a Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer - IARC*) sob a supervisão do Dr. Zdenko Herceg e do Dr. Fazlur Talukdar. Os dados do metiloma foram analisados utilizando-se o *pipeline* de análise desenvolvido no grupo *Epigenetics* (EGE-IARC) com pacotes *Bioconductor* na ferramenta de programação R.

5.6.1 Pré-processamento dos dados

O fluxo de trabalho na figura 7 demonstra as etapas de análise dos dados do metiloma.

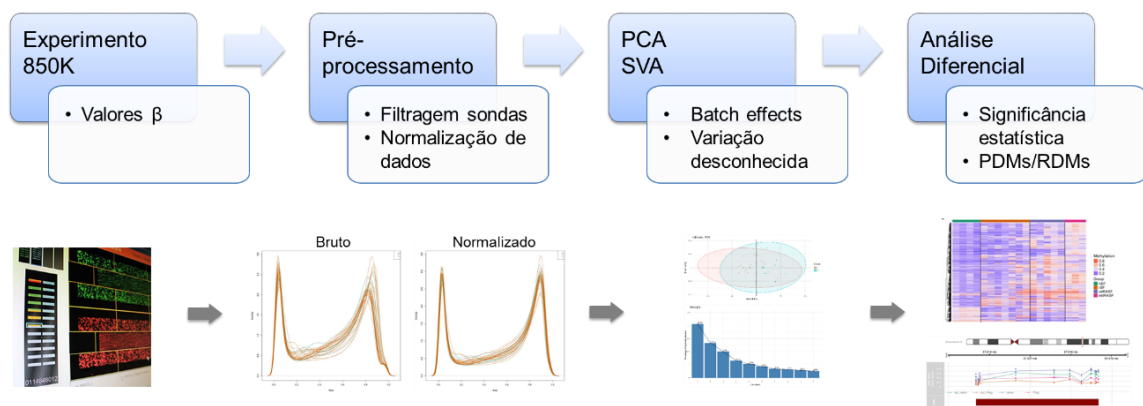


Figura 7 - Fluxo de trabalho para análise dos dados de metiloma provenientes do ensaio *Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip*. PCA: análise de componentes principais; SVA: *surrogate variable analysis*; PDMs: posições diferencialmente metiladas; RDMs: regiões diferencialmente metiladas.

O primeiro passo foi calcular os valores de beta e avaliar a qualidade do *array* de metilação. Em seguida, sondas que poderiam confundir a interpretação dos resultados, como sondas que anelam em mais de um local no genoma, sondas em sobreposição com polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e sondas localizadas nos cromossomos X e Y foram filtradas. Os dados foram normalizados pelo método Funnorm, levando-se em consideração os dois diferentes tipos de sonda, o ruído de fundo e a intensidade destas sondas⁹⁰. Esta análise inicial foi realizada usando o pacote *minfi*⁹¹.

Uma análise de componentes principais (*Principal Component Analysis* - PCA) foi realizada para verificar a influência de algumas variáveis clínicas e experimentais nos resultados e verificar a presença de efeitos de lote (*batch effect* - variação não causada por diferenças biológicas, mas por parâmetros externos). Uma análise de variável substituta (*Surrogate Variable Analysis* - SVA) foi aplicada para avaliar e corrigir esse efeito e outras fontes desconhecidas de variação.

Os valores de beta foram transformados logaritmicamente em valores M. Estes valores de metilação transformados apresentam maior confiabilidade, com dados mais homogêneos e menos dispersos que os valores de metilação brutos⁹². Por fim, a análise diferencial foi realizada. Pacientes com e sem recidiva local do tumor foram comparados para encontrar posições diferencialmente metiladas (PDMs), definidas como CpGs individuais com valores de p estatisticamente significativos; e regiões diferencialmente metiladas (RDMs), definidas como mais de duas sondas localizadas dentro de uma janela de 1.000 pares de bases que seguem a mesma direção de metilação⁹³, ou seja, todos os CGs hipermetilados ou todos hipometilados em relação ao grupo de comparação. A análise de RDMs permite a identificação de diferenças regionais entre os grupos estudados, melhorando a robustez dos achados e o valor replicativo quando comparado com as diferenças de sítios CpG individuais⁹⁰. O pacote *limma*⁹⁴ foi usado para estimar as associações sítio-específicas e os pacotes *DMRcate*⁹⁵ e *coMET*⁹⁶ foram usados para estimar e ilustrar as associações baseadas em regiões. As sondas foram anotadas de acordo com o genoma hg19.

Devido às variações técnicas aleatórias, diferenças mínimas de metilação podem não refletir uma diferença biológica real entre os grupos. Considerando essa questão, foi aplicado um limiar absoluto de diferença de metilação ($\Delta\beta$) de 10% entre os grupos estudados. Essa porcentagem foi selecionada com base em estudos prévios^{93, 97}.

Para as análises de PDMs, uma taxa de falsa descoberta (*false discovery rate* - FDR)

inferior a 10% foi considerada, enquanto para as análises de RDMs foi utilizada uma FDR de 5%. Para ambas as análises, adotou-se o método robusto e o nível de significância de 0,05.

Uma análise de enriquecimento de vias com os genes relacionados às PDMs foi realizada utilizando a ferramenta *online* Enrichr⁹⁸, que associa genes em bases de dados de vias, como a Enciclopédia de Genes e Genomas de Quioto (KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*)⁹⁹. A quantidade de genes se demonstrou insuficiente (apenas 23) para realização de uma análise de enriquecimento de vias com as RDMs, que resultou em apenas 1 ou 2 genes por via de sinalização.

5.6.2 Identificação de padrão de metilação do DNA específica para recidiva

Para seleção de potenciais biomarcadores de recidiva, foram consideradas as RDMs com maiores diferenças de metilação ($\Delta\beta$) e com pelo menos três CpGs na região e se este gene apresentava prévia descrição como relacionado à carcinogênese na literatura.

Além disso, associações entre o perfil de metilação e características clínicas (estágio do tumor) e prognóstico (sobrevida livre de doença) foram examinadas.

5.7 Análise dos resultados

Os resultados moleculares encontrados foram correlacionados com os dados clínicos e patológicos dos pacientes, principalmente em relação ao desenvolvimento de recidivas locais. Foi utilizada a ferramenta de programação R para análise dos dados.

A significância das diferenças em cada conjunto de dados entre dois grupos foi avaliada usando o teste t de Student. Os testes estatísticos de qui-quadrado e exato de Fisher foram utilizados para verificar a associação entre as variáveis anatomopatológicas dos pacientes e os resultados moleculares.

A significância estatística foi determinada para um valor de $p \leq 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Seleção das amostras

Para a seleção dos casos para o *array* de metilação, 32 pacientes com amostras armazenadas no Biobanco cumpriam os critérios de inclusão/exclusão. Suas amostras de margens cirúrgicas foram, portanto, submetidas ao *array* de metilação. A figura 8 mostra as etapas do estudo e o local de realização de cada uma delas.

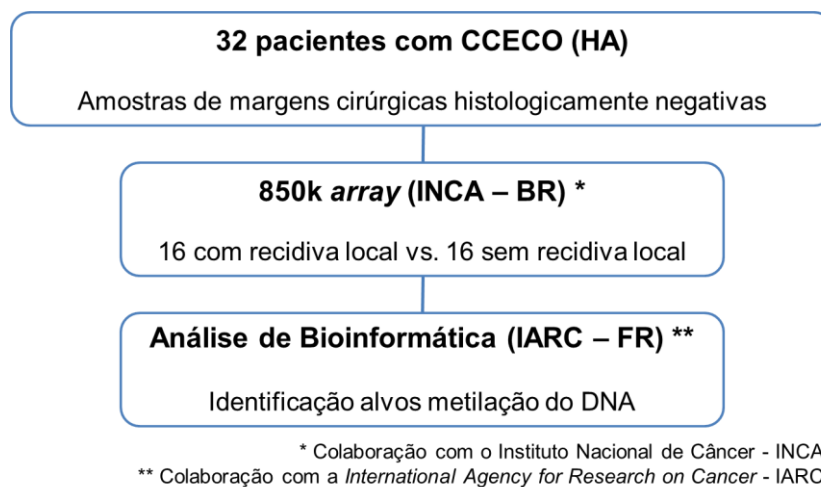


Figura 8 - Fluxograma da execução do projeto, indicando as amostras analisadas e o local de realização dos experimentos. BR, Brasil. FR, França.

6.1.1 Dados clínico-patológicos dos pacientes incluídos no estudo

As características clínico-patológicas dos 32 pacientes incluídos no estudo estão indicadas na tabela 3 e tabela suplementar 1 (Anexo A), comparando os grupos com base em seu *status* de recidiva. A idade média dos pacientes foi de aproximadamente 62 anos. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (22/32 - 68,8%), tabagista (19/32 - 59,4%) e etilista (14/32 - 43,8%) ativos.

Tabela 3 - Características clínico-patológicas dos pacientes incluídos no estudo, comparando os grupos com base em seu *status* de recidiva local.

Variável	Categoria	Recidiva		p
		Não N (%)	Sim N (%)	
Gênero	Homem	11 (68,8)	11 (68,8)	ns
	Mulher	5 (31,3)	5 (31,3)	
Consumo de Tabaco	Nunca	5 (31,3)	2 (12,5)	ns
	Ex	3 (18,8)	3 (18,8)	
	Atual	8 (50,0)	11 (68,8)	
Consumo de Álcool	Nunca	5 (31,3)	5 (31,3)	ns
	Ex	3 (18,8)	5 (31,3)	
	Atual	8 (50,0)	6 (37,5)	
Sítio Anatômico	Assoalho	3 (18,8)	8 (50,0)	< 0,01
	Língua	13 (81,3)	5 (31,3)	
	Gengiva	0 (0,0)	3 (18,8)	
Estágio do Tumor	I/II	15 (93,8)	4 (25,0)	< 0,001
	III/IV	1 (6,3)	12 (75,0)	

Porcentagem calculada usando o número total de casos no grupo de referência.

ns: não significativo.

6.2 Confirmação da eficiência do tratamento com bissulfito de sódio

Para verificar a eficiência da conversão por bissulfito e a qualidade das amostras de DNA, uma PCR para amplificação da sequência repetitiva *LINE-1* foi realizada. As 32 amostras criopreservadas amplificaram de modo satisfatório (Figura 9) e foram incluídas no *array*.

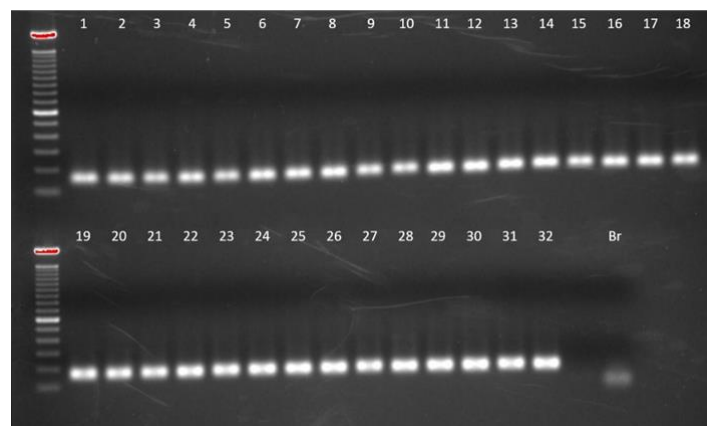


Figura 9 - Verificação da eficiência e qualidade das amostras de DNA após conversão por bissulfito de sódio através da confirmação do tamanho do fragmento (120 pares de bases) amplificado na reação de PCR para *LINE-1*, em gel de agarose 2%. Br, Branco.

6.3 Array de metilação

6.3.1 Análise de qualidade do ensaio

Um valor de p de detecção para cada citosina analisada em cada amostra foi calculado, onde se comparou o sinal total (metilado + não metilado) de cada sonda com o nível do sinal do *background*, que é estimado a partir das sondas de controle negativo do ensaio. Valores de p de detecção maiores que 0,01 normalmente indicam um sinal de qualidade ruim¹⁰⁰. Ao analisar a média dos valores de p de detecção para cada amostra foi possível observar uma boa qualidade dos dados do ensaio, sendo que todas as amostras exibiram pequenos valores de p de detecção ($p < 0,001$), o que indica um sinal confiável¹⁰⁰ (Figura 10A e B). Na figura 10C é possível observar a disposição das amostras em cada um dos BeadChips utilizados no ensaio e que menos de 1% de sondas em cada amostra falharam durante o experimento. Por fim, a distribuição dos valores de metilação (beta) para cada amostra em cada grupo de estudo foi avaliada antes e após a normalização dos dados (Figura 10D). Sabendo que estes valores devem ser bimodais, com um pico próximo a 0 e outro próximo a 1⁹¹, podemos observar que todas as amostras apresentam este perfil.

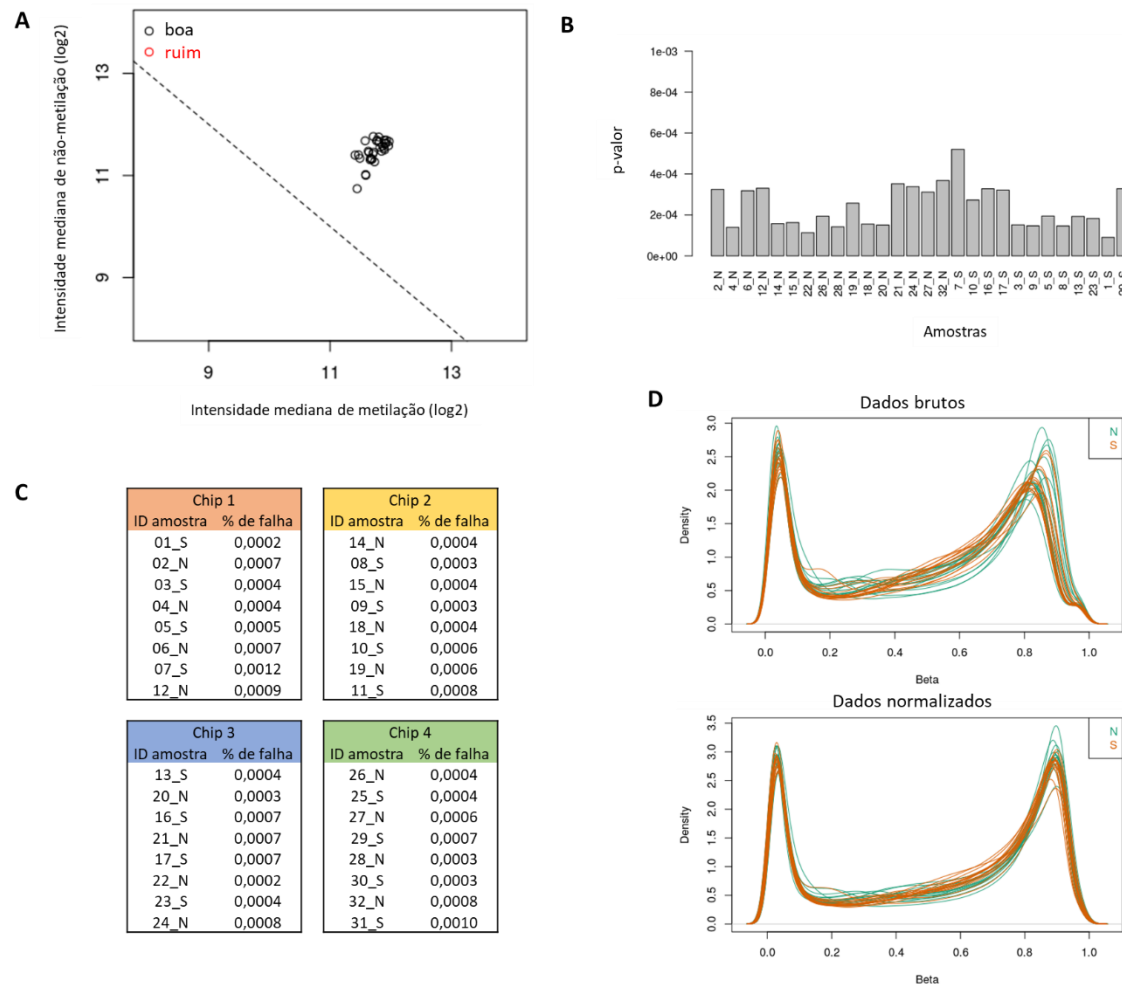


Figura 10 - Controle de qualidade das amostras incluídas no *array* de metilação. A, Acima da linha de referência as amostras são consideradas de boa qualidade, enquanto abaixo desta linha as amostras são consideradas de qualidade ruim e devem ser excluídas das análises subsequentes. B, Valores de p de detecção para cada amostra incluída no array. C, Disposição das amostras nos 4 BeadChips utilizados no ensaio e a porcentagem de sondas que falharam em cada amostra. D, Gráficos de densidade mostrando a distribuição dos valores de beta antes e depois da normalização dos dados.

Considerando estes parâmetros, todas as amostras foram incluídas nas análises subsequentes.

6.3.2 Pré-processamento e normalização dos dados do *array* 850k da *Illumina*

Seguindo o *pipeline* bem estabelecido de análise do metiloma desenvolvido pelo EGE-IARC, 43.191 sondas que anelam em mais de um local no genoma, 98.974 sondas sobrepondo SNPs, 17.240 sondas nos cromossomos X e Y e 15 sondas com valores ausentes em mais de 5% das amostras foram excluídas, restando 706.671 sondas para análise posterior.

A análise de componentes principais (PCA) foi usada para identificação de um número menor de variáveis não correlacionadas de um conjunto maior de dados. A partir desta análise

observou-se que, dentre todas as variáveis clínicas e experimentais analisadas, o *status* de recidiva foi o que melhor explicou a variação encontrada no metiloma, como mostrado no PC1 (Tabela 4) com o menor p-valor de 0,03.

Tabela 4 - Significância encontrada na análise de componentes principais dos parâmetros clínicos e experimentais avaliados.

Variável	p-valor
Posição no chip	0,57
Idade	0,99
Gênero	0,51
Estadiamento clínico	0,09
Estadiamento agrupado	0,25
Sítio anatômico	0,34
<i>Status</i> de recidiva	0,03
Consumo de tabaco	0,56
Consumo de álcool	0,21

A análise não supervisionada das 10.000 sondas mais variáveis (maiores desvios padrão) revelou um agrupamento parcial das amostras de acordo com o *status* de recidiva dos pacientes, como mostrado na figura 11.

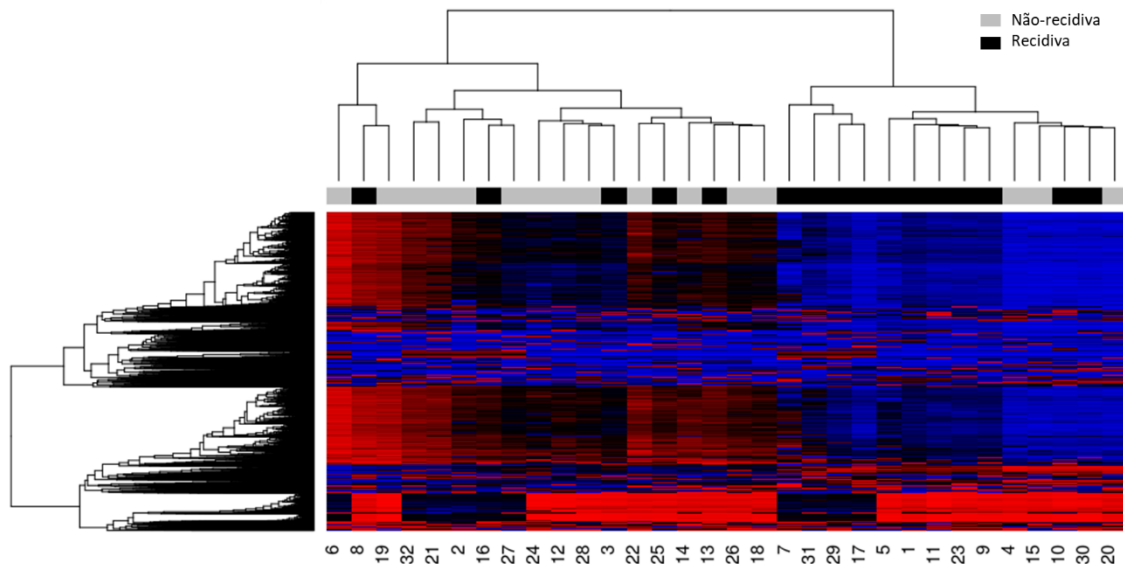


Figura 11 - Análise não supervisionada das 32 amostras de margem cirúrgica histologicamente negativas, mostrando as relações de similaridade entre elas quando foram investigadas as 10.000 sondas mais variáveis do array.

6.3.3 Análise diferencial entre grupos com e sem recidiva

A análise diferencial de metilação foi realizada pela modelagem de valores β em três

modelos diferentes: 1) modelo bruto não ajustado para qualquer covariável, considerando apenas o *status* de recidiva (modelo 1); 2) modelo ajustado por idade e sexo (modelo 2); e 3) modelo ajustado para consumo de álcool (modelo 3). As covariáveis a ajustar foram escolhidas após a correção por SVA, por ainda apresentarem valores de *p* próximos à significância estatística e, portanto, demonstrarem uma possível influência nos resultados do ensaio.

Os gráficos de quantil-quantil (QQ-plots) foram gerados para cada um desses modelos e mostram que os conjuntos de dados eram provenientes de populações com uma mesma distribuição (Figura 12). Para os modelos, curvas semelhantes e fatores de inflação do controle genômico (valores de lambda – 0,86, 0,94 e 0,92, respectivos aos modelos 1, 2 e 3) foram observados. Os correspondentes *p*-valores dessas análises são indicados nos gráficos Manhattan da figura 12. Nenhum dos CpGs nos 3 modelos alcançou significância ampla do epigenoma ($p < 3.6 \times 10^{-8}$)¹⁰¹.

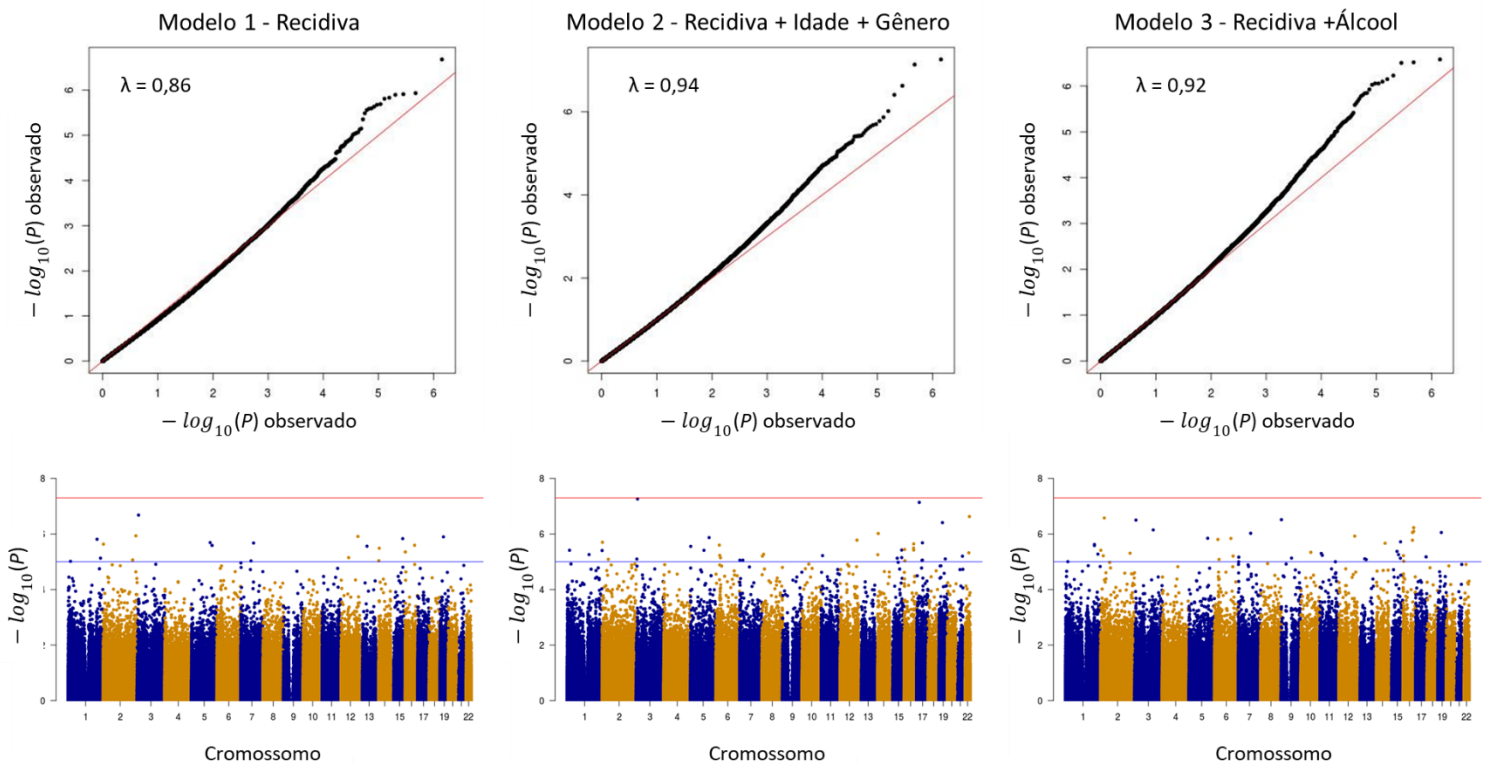


Figura 12 - QQ-Plot e Manhattan Plot dos diferentes modelos testados na análise. Valores de *p* observados (pontos pretos) plotados contra os valores de *p* esperados sob nenhuma associação (linha vermelha). Gráficos Manhattan demonstram as associações de recidiva versus não recidiva em todo o genoma dos pacientes. As linhas horizontais representam os limiares para associações sugestiva (azul; $p < 1 \times 10^{-5}$) e significativa (vermelho; $p < 3,6 \times 10^{-8}$).

A análise diferencial de metilação foi realizada comparando a média de metilação das sondas entre os grupos recorrente e não recorrente. Os resultados mostraram zero PDMs sem

aplicar qualquer limiar diferencial de metilação, e 293 RDMs no modelo 1. Da mesma forma, quatro PDMs e 723 RDMs foram encontrados na análise com o modelo 2, e 17 PDMs e 638 RDMs foram encontrados no modelo 3. Considerando o limiar absoluto de diferença de metilação ($\Delta\beta$) de 10% entre os grupos, o número de PDMs significativos aumentou enquanto o número de RDMs diminuiu (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação do número de PDMs e RDMs para cada modelo testado na análise utilizando uma taxa de falsa descoberta (FDR) de 10% para PDMs e 5% para RDMs.

$\Delta\beta$ <i>threshold</i>	No. sondas	Modelo 1		Modelo 2		Modelo 3	
		PDMs	RDMs	PDMs	RDMs	PDMs	RDMs
0%	706.671	0	293	4	723	17	638
10%	415	311	23	314	21	321	24

Modelo 1 - *Status* de recidiva; Modelo 2 - *Status* de recidiva + Idade + Gênero; Modelo 3 - *Status* de recidiva + Consumo de álcool.

$\Delta\beta$: limiar absoluto de diferença de metilação; No.: número; PDMs: posições diferencialmente metiladas; RDMs: regiões diferencialmente metiladas.

Em seguida, a sobreposição entre as PDMs e as RDMs identificadas nos diferentes modelos foi avaliada. Mais de 80% das PDMs e mais de 70% das RDMs foram encontradas comuns entre os três modelos, demonstrando a robustez dos achados (Figura 13).

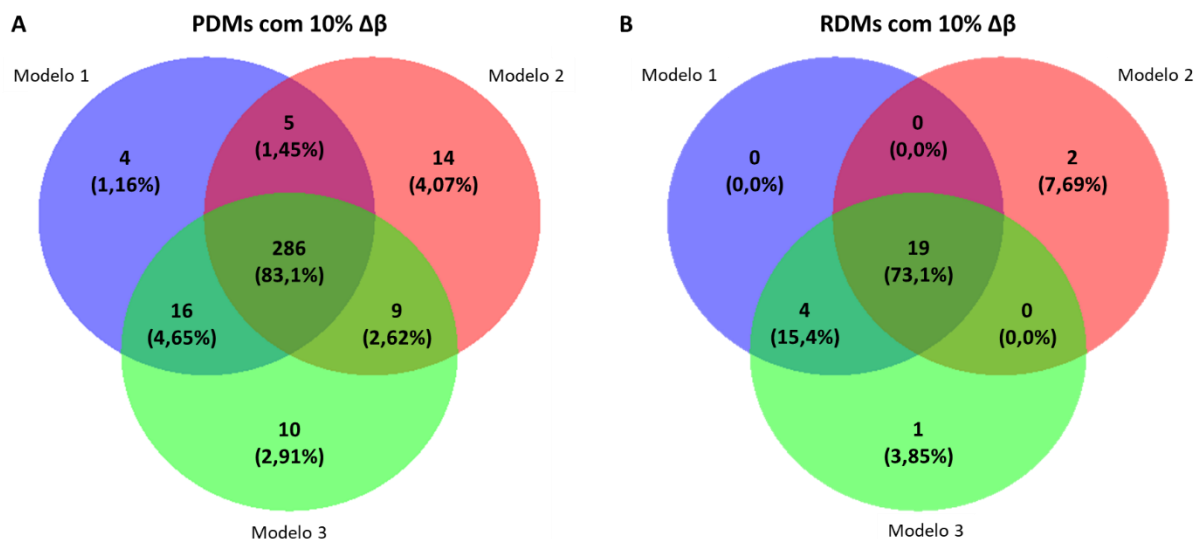


Figura 13 - Comparação dos modelos testados. A, Diagrama de Venn comparando as posições diferencialmente metiladas detectadas usando um corte de 10% de $\Delta\beta$ nos 3 modelos. B, Diagrama de Venn comparando as regiões diferencialmente metiladas detectadas com 10% $\Delta\beta$ nos 3 modelos. Comparações realizadas usando o pacote *VennDiagram*¹⁰².

6.3.4 Seleção do modelo

Atribuído à similaridade dos modelos, com relação aos valores de lambda e à metilação

diferencial, o modelo 1 foi escolhido para análise posterior. O *heatmap* gerado com as 311 PDMs deste modelo demonstrou uma melhor separação dos grupos estudados como diferentes *clusters* (Figura 14).

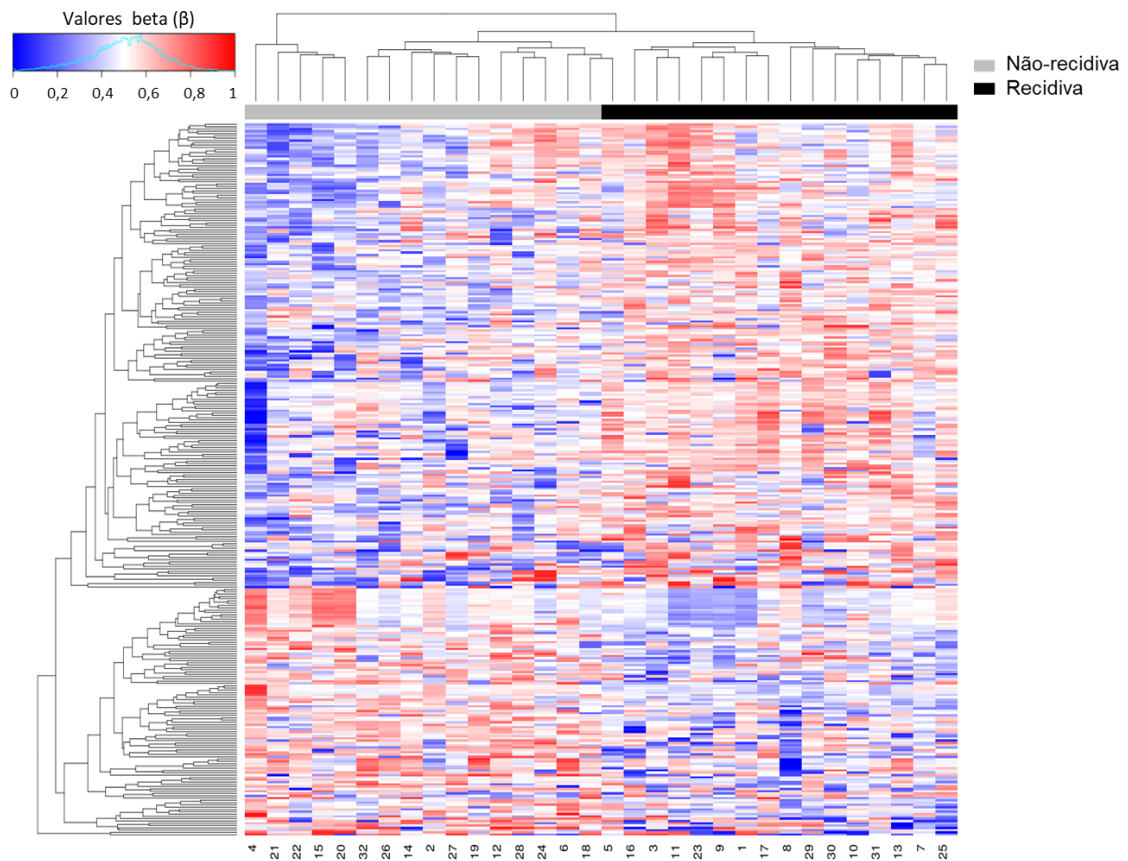


Figura 14 - *Heatmap* mostrando os 311 PDMs associados à recidiva local ($FDR < 0,1$, $\Delta\beta > 10\%$). Os sítios CpG são mostrados nas linhas horizontais e as amostras nas colunas verticais. Altos níveis de metilação são mostrados em vermelho e baixos níveis de metilação em azul, de acordo com a barra de escala à esquerda da figura.

A maioria das PDMs estava hipermetilada no grupo de paciente com recidiva em comparação com o grupo de pacientes sem recidiva (Figura 15A). Relacionadas às regiões gênicas, as sondas estavam localizadas principalmente em introns e regiões promotoras (Figura 15B). Um enriquecimento de PDMs em ilhas CpG, comparativamente ao total de sondas presentes no *array*, foi observado (Figura 15C).

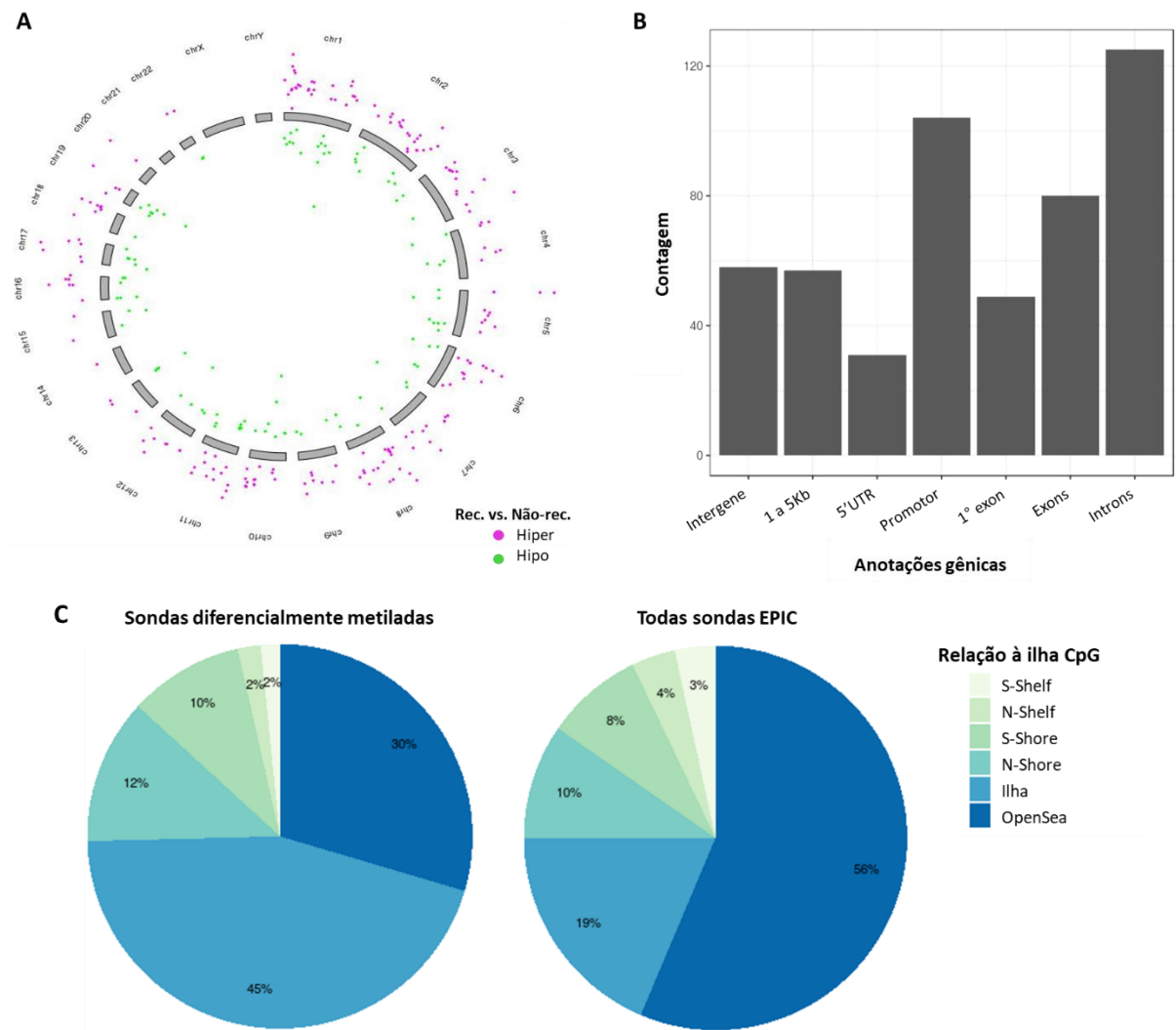


Figura 15 - Distribuição das sondas diferentemente metiladas. A, gráfico mostrando o perfil genético de metilação do genoma de pacientes que desenvolveram recidiva local, por cromossomo. Pontos rosa representam sondas hipermetiladas enquanto pontos verdes representam sondas hipometiladas no grupo recidiva em comparação com o grupo não-recidiva. B, contexto CpG das PDMs identificadas relacionadas às regiões gênicas. C, contexto CpG das PDMs identificadas relacionados à ilha CpG, comparando com todo o ensaio *Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip*.

As 23 RDMs encontradas na análise *DMRcate*, com pelo menos 2 CpGs diferentemente metilados em uma janela de 1.000 pares de bases, são demonstrados na Tabela 6, ordenadas pelo valor de p ajustado. A seleção de potenciais RDMs relacionadas à recidiva local foi realizada com base em alguns critérios, como A) maiores diferenças de metilação ($\Delta\beta$) entre os grupos, B) mínimo de 3 CpGs na região, e C) descrição anterior relacionada à carcinogênese na literatura. Com base nisso, 6 RDMs foram selecionadas, as quais estão associadas aos seguintes genes: *GALR1*, *GRHL3*, *FAM84B*, *IFFO1*, *LTBP4* e *PIWIL2*. Cinco destas seis regiões encontraram-se hipermetiladas no grupo de pacientes que desenvolveram recidiva local em comparação com os pacientes que não desenvolveram recidiva.

Tabela 6 - Regiões diferencialmente metiladas entre os grupos com e sem recidiva tumoral, ordenadas pelo valor de p ajustado.

RDMs	No. CpGs	Valor p ajustado	Gene	Status*	Função
chr18:74961964:74962369	4	4.31E-04	<i>GALR1</i>	Hiper	Controle do ciclo celular
chr1:24648545:24648596	3	8.12E-04	<i>GRHL3</i>	Hiper	Estimula migração células endoteliais
chr8:127568850:127569019	3	4.11E-03	<i>FAM84B</i>	Hiper	Formação complexos de reparo ao DNA
chr16:2653250:2653280	2	4.33E-03	<i>LOC652276</i>	Hipo	Pseudogene
chr12:6664872:6665330	3	5.36E-03	<i>IFFO1</i>	Hiper	Atividade estrutural celular
chr10:125651370:125651391	2	5.45E-03	<i>CPXM2</i>	Hiper	Interações célula-célula
chr19:41119371:41119859	3	5.67E-03	<i>LTBP4</i>	Hipo	Papel estrutural na matriz extracelular
chr16:56666323:56666334	2	6.92E-03	<i>MT1M</i>	Hiper	Ligação a íons de metal
chr3:12045449:12045459	2	7.72E-03	<i>SYN2</i>	Hipo	Regula liberação de neurotransmissores
chr13:112978683:112978703	2	7.84E-03	NA	Hipo	-
chr8:22132926:22132959	3	9.08E-03	<i>PIWIL2</i>	Hiper	Reprime elementos transponíveis
chr16:88947839:88947853	2	9.42E-03	<i>CBFA2T3</i>	Hipo	Facilita a repressão transcricional
chr5:1594715:1594733	2	9.65E-03	<i>SDHAP3</i>	Hiper	Pseudogene
chr16:74734251:74734571	2	1.23E-02	<i>MLKL</i>	Hiper	Papel na necroptose induzida por TNF
chr1:156215655:156215846	2	1.89E-02	<i>PAQR6</i>	Hiper	Inibição de apoptose por neurosteróides
chr1:205819406:205819463	2	2.15E-02	<i>PM20D1</i>	Hiper	Regula produção de aminoácidos
chr6:74104870:74104877	2	2.28E-02	<i>DDX43</i>	Hiper	Transcrição gênica e regulação
chr11:18433554:18434015	2	2.39E-02	<i>LDHC</i>	Hipo	Atividade da desidrogenase L-lactato
chr12:130822603:130822674	2	2.46E-02	<i>PIWIL1</i>	Hiper	Reprime elementos transponíveis
chr18:67067893:67068457	2	2.47E-02	<i>DOK6</i>	Hiper	Possível papel na proliferação celular
chr22:46685472:46685754	2	2.74E-02	<i>TTC38</i>	Hipo	Desconhecida
chr8:58055876:58056026	2	3.13E-02	NA	Hiper	-
chr4:111535528:111535597	2	3.33E-02	NA	Hipo	-

Fonte: GeneCards - The Human Gene Database¹⁰³.

* Status de metilação relacionado ao grupo recidiva em comparação com o grupo não recidiva. FDR < 0,05.

6.3.5 Análise de enriquecimento de vias

Para obter *insights* sobre o efeito biológico dos padrões alterados de metilação do DNA na recidiva, foi realizada uma análise de enriquecimento de vias utilizando-se a ferramenta KEGG com os 226 genes relacionados às PDMs. Apesar de, no total, 311 PDMs terem sido encontradas na análise, nem todas estão localizadas dentro de um gene ou mais de uma PDM pode representar um mesmo gene. Na análise comparativa entre pacientes que desenvolveram recidiva versus pacientes sem recidiva, as vias mais enriquecidas foram associadas a vias metabólicas e vias relacionadas ao câncer (Figura 16).

	p-valor
Interação ligante-receptor neuroativa	0,00049
Via de sinalização de cálcio	0,00137
Câncer de pulmão de pequenas células	0,00409
Câncer de pulmão de não pequenas células	0,00662
Via de sinalização cAMP	0,03371
Via de sinalização TNF	0,03626
Migração transendotelial de leucócitos	0,03834

Figura 16 - Vias enriquecidas ($p \leq 0,05$) entre os 226 genes únicos relacionados às posições diferencialmente metiladas e associados à recidiva local.

6.3.6 Genes relacionados às RDMs selecionadas

Baseado nos resultados encontrados na análise de bioinformática, foram selecionadas 6 regiões diferencialmente metiladas entre os grupos estudados, que juntas compreendem 19 sítios CpG únicos.

As regiões-alvo selecionadas estão ilustradas na Figura 17. Estão representados os sítios CpG diferencialmente metilados entre os grupos para cada região, o nível de metilação de cada CG para cada paciente e a comparação da média de metilação entre os mesmos. Com exceção do gene *LTBP4*, os pacientes que desenvolveram recidiva apresentaram regiões hipermetiladas quando comparados aos pacientes que não desenvolveram recidiva.

A análise de co-metilação foi realizada para visualizar associações regionais do epigenoma, expandindo a análise para uma região de 10 kb em torno de cada RDM (Figura 18). Os 19 sítios CpG diferencialmente metilados nas 6 regiões estavam localizados em ilhas CpG, mas não estão necessariamente nas regiões promotoras dos genes. O *status* de metilação dessas sondas para cada região foi significativamente e positivamente correlacionado, seguindo a mesma direção de metilação.

Devido ao uso do limiar absoluto de metilação ($\Delta\beta$) de 10% de diferença entre os grupos, 19 sítios CpG únicos nestas 6 RDMs foram encontrados. Porém, como todas as regiões encontravam-se em ilhas CpGs, uma análise adicional foi realizada sem considerar este limiar e PDMs adicionais entre os pacientes com e sem recidiva foram observadas, porém com menores níveis de diferença. Além disso, todos os CpGs adicionais seguiram a mesma direção de metilação daqueles 19 selecionados, como mostrado na figura suplementar 1 (Anexo C).

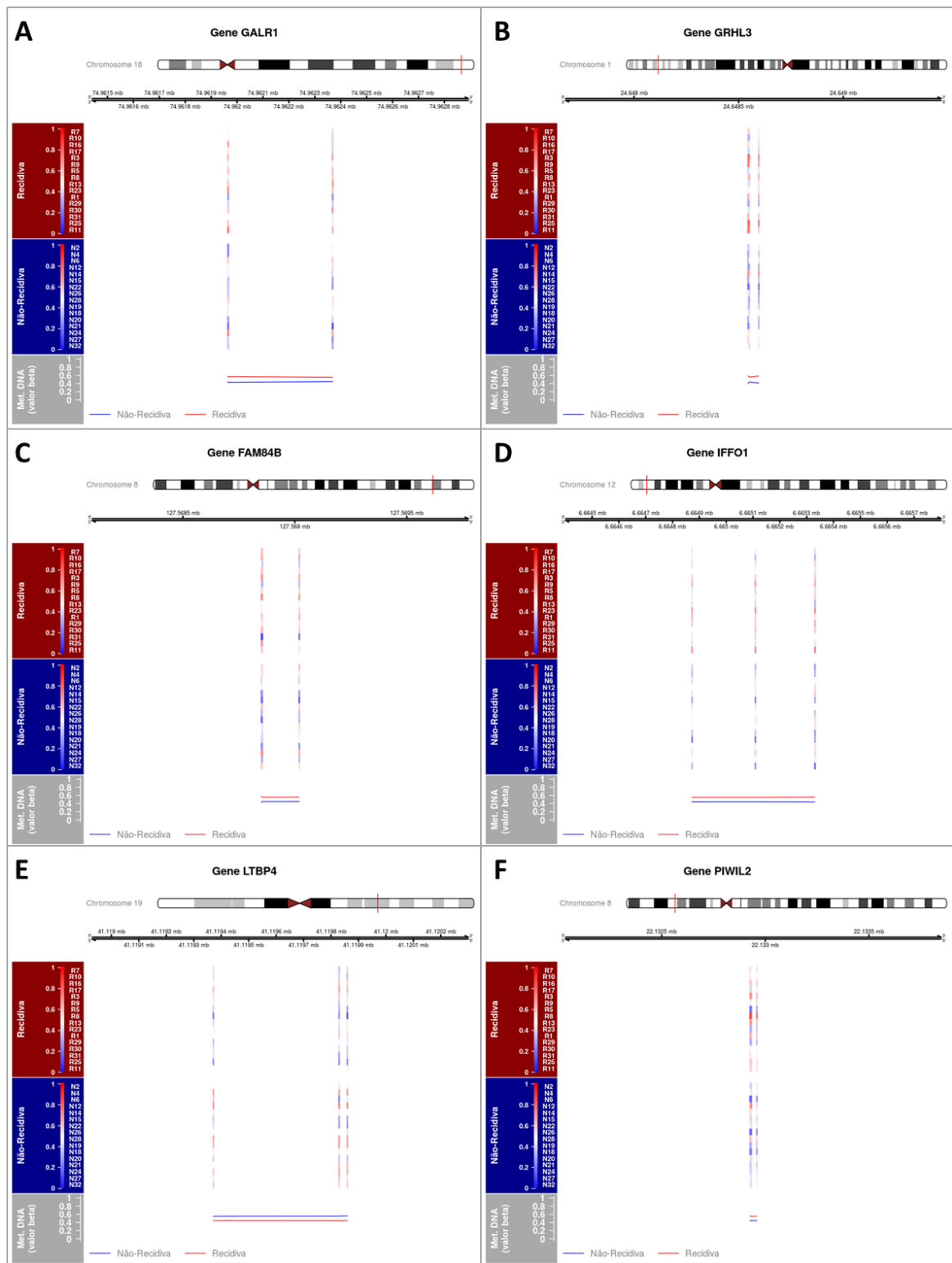


Figura 17 - Regiões diferentemente metiladas estatisticamente significativas ($FDR < 0,05$) associadas à recidiva local, relativas aos genes: A, *GALR1*; B, *GRHL3*; C, *FAM84B*; D, *IFFO1*; E, *LTBP4*; F, *PIWIL2*. Na parte esquerda superior o grupo de pacientes que desenvolveram recidiva local e na parte inferior, o de pacientes que não desenvolveram recidiva. Os valores médios de metilação em casos de recidiva (vermelho) ou não recidiva (azul) são mostrados.

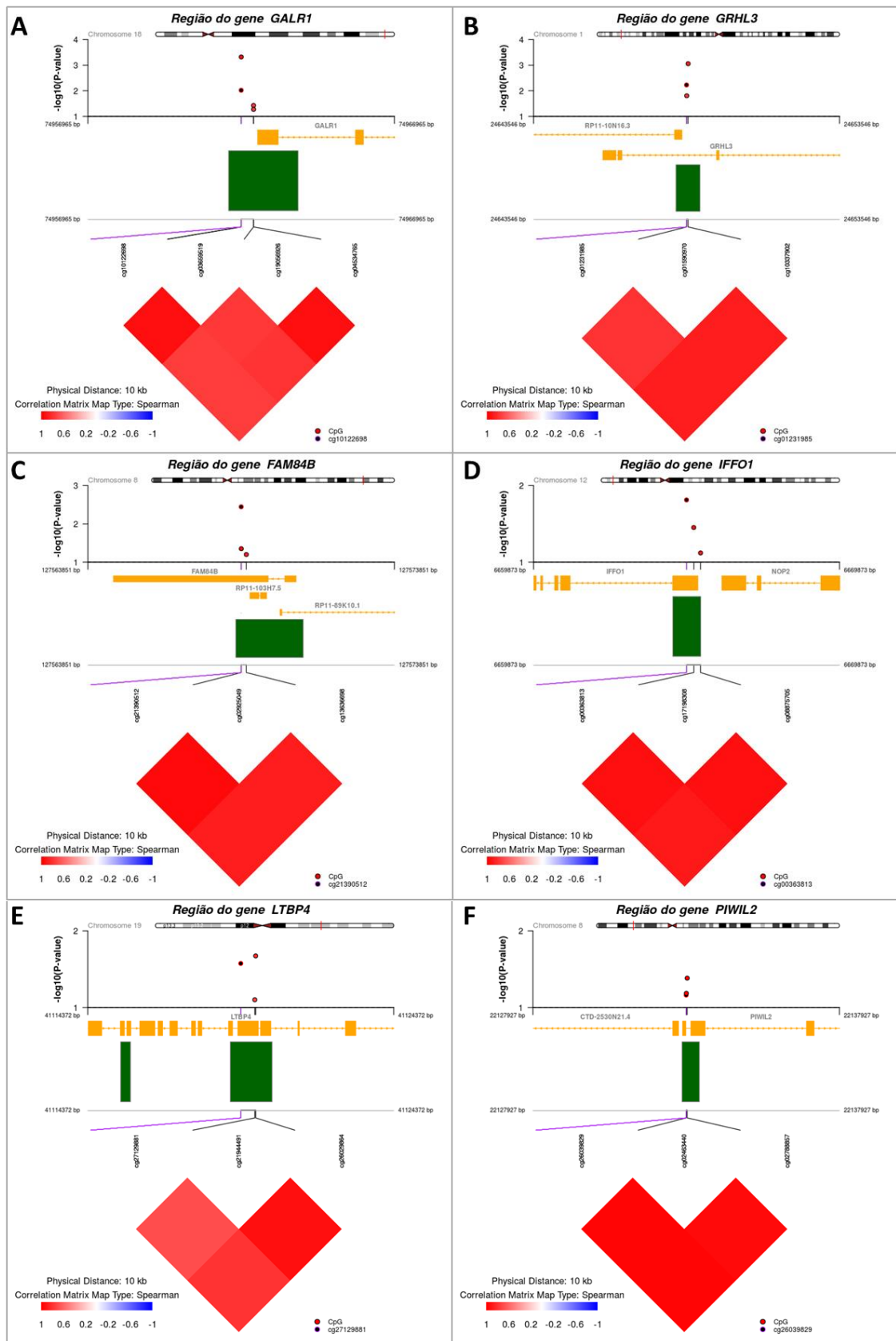


Figura 18 - Gráficos de co-metilação mostrando os CpGs com pelo menos 10% de diferença de metilação nas RDMs dos genes: A, *GALR1*; B, *GRHL3*; C, *FAM84B*; D, *IFFO1*; E, *LTBP4*; F, *PIWIL2*, visualizados com base em suas coordenadas cromossômicas e posição relativa para ilha CpG (barra verde). O gráfico de correlação mostra os valores de correlação de Spearman entre os CpGs na região.

6.4 Associação da metilação com outras características clínicas e prognósticas

Os genes associados às PDMs e RDMs identificados foram posteriormente avaliados quanto à sua associação com sobrevida livre de doença e estágio tumoral. Essa análise adicional foi realizada, pois é importante avaliar se os genes encontrados na análise de recidiva também tiveram um papel na agressividade dos CCECO¹⁰⁴. Portanto, duas análises de metilação foram realizadas: A) comparando pacientes com estágios iniciais (I/II) e tardios (III/IV) – grupos com 19 e 13 pacientes, respectivamente e B) comparando pacientes com sobrevida livre de doença maior ou menor que 5 anos – grupos com 13 e 19 pacientes, respectivamente.

Ao comparar as duas análises adicionais com a análise prévia de recidiva, cerca de 5% das PDMs e 1,5% das RDMs foram comparáveis (Figura 19), demonstrando que alguns genes também podem estar relacionados a um câncer de cavidade oral mais agressivo. Além disso, um gene relacionado a RDM selecionada (*GRHL3*) foi encontrado associado a estágios avançados e pior sobrevida livre de doença em 5 anos do paciente, sugerindo seu uso como potencial marcador para prognóstico em pacientes com CCECO.

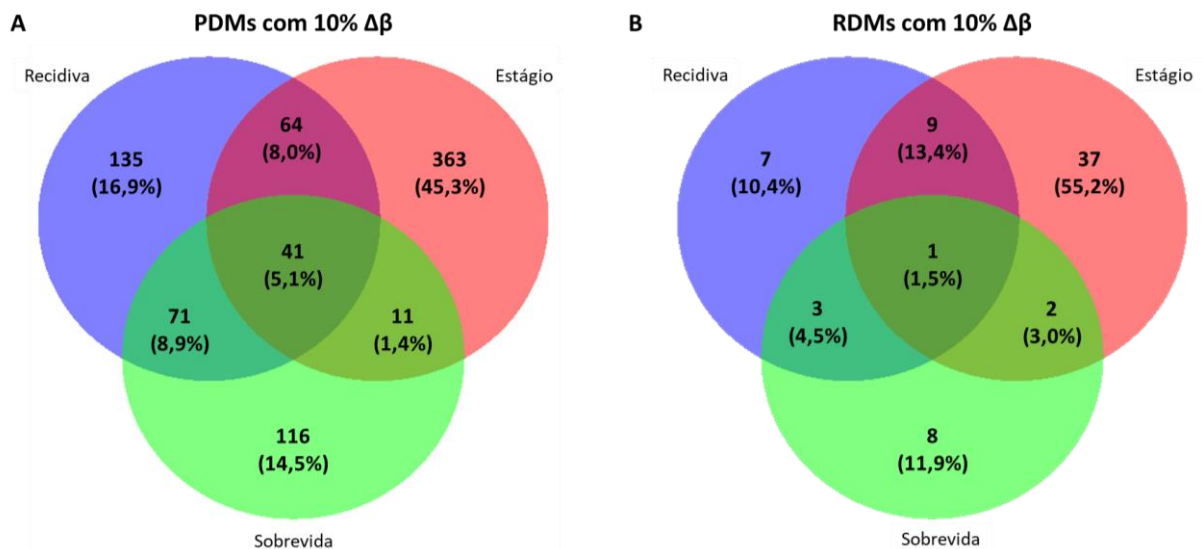


Figura 19 - Diagrama de Venn comparando os PDMs (A) e RDMs (B) detectados usando 10% de $\Delta\beta$ nas 3 análises de metilação, considerando I) *status* de recidiva, II) estágio tumoral e III) sobrevida livre de doença em 5 anos. Comparações realizadas usando o pacote *VennDiagram*.

7 DISCUSSÃO

Os resultados deste estudo demonstraram que pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral (CCECO) com margens histológicas negativas exibem padrões diferenciais de metilação que podem ser cruciais para a identificação de indivíduos com maior risco de desenvolvimento de recidiva local. Na comparação entre pacientes que desenvolveram recidiva e pacientes que não desenvolveram recidiva, 311 sítios CpG e 23 regiões diferencialmente metiladas entre os dois grupos foram encontradas. Foram selecionadas 6 regiões de maior interesse, das quais a região relacionada ao gene *GRHL3* se mostrou potencial marcador para prognóstico em pacientes com CCECO, sendo correlacionado também a outros fatores de pior prognóstico.

O *status* das margens cirúrgicas no câncer de cavidade oral é considerado um fator prognóstico importante, e pode estar associado a um maior risco de desenvolvimento de recidivas e diminuição na sobrevida dos pacientes^{36, 105-107}. A obtenção de margens satisfatórias, ou seja, com ausência de células neoplásicas durante o tratamento cirúrgico, pretende garantir a excisão total do tumor primário. Todavia, até 30% dos pacientes que apresentam margens cirúrgicas histologicamente negativas no momento da cirurgia irão desenvolver recidivas⁴⁰.

Existem duas teorias que podem ajudar a explicar esta questão: a teoria de doença mínima residual, onde um pequeno número de células tumorais não detectadas pelas técnicas diagnósticas padrão persistem após a ressecção curativa¹⁰⁷; e a teoria de cancerização de campo⁴⁶, que descreve a presença de alterações atípicas nos tecidos que circundam o tumor e associa sua persistência ao desenvolvimento de recidiva local ou segundo tumor primário. Ambos conceitos estão intimamente relacionados a uma insuficiente avaliação histológica dos tecidos aparentemente normais que circundam o tumor, sugerindo que métodos adicionais devem ser explorados para uma maior precisão na avaliação das margens cirúrgicas.

Os padrões de metilação do DNA fornecem informações úteis para preconizar diagnóstico, auxiliar na classificação dos tumores e facilitar prognóstico e desenvolvimento de novas terapias, uma vez que a metilação do DNA é considerada um evento precoce no desenvolvimento das neoplasias¹⁰⁸. Neste sentido, novas metodologias de *microarray* permitem uma avaliação quantitativa da metilação do DNA e fornecem informações a nível de resolução de uma única base em uma escala de genoma.

Neste estudo foi realizado um *array* de metilação, utilizando-se a plataforma *Illumina Infinium MethylationEPIC BeadChip*, para associação entre os padrões de metilação do DNA de margens cirúrgicas histologicamente negativas de pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral e o prognóstico destes pacientes. Esta metodologia permite estudos de epigenotipagem em larga escala e é utilizada principalmente para comparação entre tecidos normais e tumorais ou diferenciação de subtipos tumorais. Apesar de existirem estudos com análise extensiva dos padrões de metilação dos tumores de cabeça e pescoço¹⁰⁹⁻¹¹⁴, este é o primeiro estudo a abordar, através de análise global, as diferenças de metilação específicas das margens cirúrgicas dos CCECO para prever recidiva local.

Dentre as regiões diferencialmente metiladas encontradas na comparação entre os grupos, 6 delas foram selecionadas para análise mais aprofundada e estão associadas aos seguintes genes: *GALR1*, *GRHL3*, *FAM84B*, *IFFO1*, *LTBP4* e *PIWIL2*. Com exceção da região do gene *LTBP4*, pacientes que desenvolveram recidiva local apresentaram regiões hipermetiladas quando comparados aos pacientes que não desenvolveram recidiva. Todos os genes foram previamente descritos como associados à carcinogênese de diversos tipos tumorais.

O gene *GALR1* (*Galanin Receptor 1*) é responsável por inibir a adenilil ciclase por meio de uma proteína G da família Gi/Go¹⁰³ e é um gene bem estudado no câncer de cabeça e pescoço. A hipermetilação deste gene em tecido tumoral foi anteriormente correlacionada a recidiva precoce, tamanhos maiores de tumor e pior sobrevida global e livre de doença em pacientes com CCECO¹¹⁵⁻¹¹⁷. Esse gene também foi descrito como um gene supressor de tumor frequentemente silenciado em CCECP e câncer gástrico^{118, 119} e foi relatado como biomarcador de diagnóstico do câncer de pulmão de não pequenas células¹²⁰.

O gene *GRHL3* (*Grainyhead Like Transcription Factor 3*) é um fator de transcrição relacionado à cicatrização de feridas, formação de barreira epidérmica e fechamento de tubo neural¹⁰³. Este gene desempenha um papel supressor de tumor crítico no desenvolvimento da epiderme e está altamente expresso em tecidos derivados da ectoderme, incluindo a cavidade oral. Seu nível de expressão foi encontrado reduzido em carcinomas de células escamosas de pele e de cabeça e pescoço¹²¹. Georgy e colaboradores demonstraram que a deleção de *GRHL3* no epitélio oral de camundongos levou a perda da expressão de *GSK3B*, resultando no acúmulo do oncogene c-Myc e em um CCECP mais agressivo. Esta assinatura também foi evidenciada em um subconjunto de CCECPs primários e linhagens celulares de cabeça e pescoço¹²². Além disso, no carcinoma colo-retal, a regulação negativa de *GRHL3 in vitro* foi

capaz de inibir a atividade das células tumorais e desencadear a interrupção do ciclo celular na fase G0/G1 e a apoptose¹²³.

O gene *IFFO1* (*Intermediate Filament Family Orphan 1*) pertence à família de filamentos intermediários. Filamentos intermediários são proteínas que atuam como componentes primordiais do citoesqueleto e do envelope nuclear. A superexpressão deste gene foi associada a uma melhor sobrevida global, a um menor tamanho tumoral e a doença em estágio inicial no câncer de pulmão¹²⁴. No câncer de ovário, a metilação de *IFFO1* é frequente e pode ser usada como um sensível marcador de detecção para este tumor¹²⁵.

PIWIL2 (*Piwi Like RNA-Mediated Gene Silencing 2*) desempenha papel importante na autorrenovação de células-tronco¹²⁶, espermatogênese¹²⁷, interferência de RNA, remodelação da cromatina e regulação da transcrição¹²⁸. É descrito como um oncogene fortemente associado com a gênese e progressão de diversas malignidades, dentre elas ovário¹²⁹, pulmão¹³⁰, glioma¹³¹, próstata¹³², estômago¹³³ e cólon¹³⁴. No presente estudo, o grupo de pacientes que desenvolveu recidiva apresentou hipermetilação deste gene, sendo relacionado com pior prognóstico, o que difere da literatura acima mencionada.

O gene *FAM84B* (*Family with Sequence Similarity 84 Member B*) está envolvido na formação de complexos de reparo ao DNA, porém é pouco caracterizado em tumores humanos. Este gene foi encontrado amplificado e superexpresso em CCE de esôfago (CCEE)¹³⁵. No mesmo estudo, quando *FAM84B* foi silenciado nas linhagens celulares de CCEE, o crescimento, a invasão e a migração foram reduzidos. Este gene também foi encontrado superexpresso em câncer coloretal¹³⁶. No presente estudo, o grupo de pacientes que desenvolveu recidiva apresentou hipermetilação deste gene, sendo relacionado com pior prognóstico, o que difere da literatura acima mencionada.

Finalmente, o gene *LTBP4* (*Latent Transforming Growth Factor Beta Binding Protein 4*) possui papéis estruturais na matriz extracelular e é necessário para o correto dobramento e secreção do fator de transformação do crescimento beta (TGF- β). Os componentes da via TGF- β são comumente alterados no câncer em geral¹³⁷. Este gene é regulado negativamente em adenocarcinomas e carcinomas de células escamosas de esôfago tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Sua re-expressão em linhagens celulares de câncer de esôfago reduziu a capacidade de migração das células¹³⁸. Os autores observaram ainda que a hipermetilação das regiões promotoras das duas principais formas transcricionais de *LTBP4* humana estavam envolvidas

em seu silenciamento. Em gliomas, o silenciamento de *LTBP4* foi responsável pela supressão da atividade do TGF- β e à diminuição da proliferação celular¹³⁹.

Apesar de existirem associações entre os genes estudados e a carcinogênese, os mesmos diferem daqueles encontrados especificamente nas margens cirúrgicas dos CCECO ou CCECP. Isso pode ser explicado, pois poucos estudos avaliaram a associação de fatores prognósticos com as alterações epigenéticas na mucosa histologicamente normal adjacente ao tumor destes pacientes. Além disso, a maioria dos estudos engloba o câncer de cabeça e pescoço como um todo, desconsiderando a heterogeneidade de localização anatômica, etiologia e achados moleculares, o que dificulta as comparações.

Outro fato interessante é que, devido à metodologia permitir uma visão abrangente do padrão de metilação de diversas regiões gênicas, foi possível observar que as PDMs e RDMs encontradas não estão necessariamente localizadas nos promotores gênicos. A localização dos sítios CpG no genoma é fator chave para entender a correlação com alterações na expressão gênica^{112, 140}, onde não necessariamente a hipermetilação leva a um silenciamento do gene alvo¹⁴¹. Assim, estudos avaliando a expressão destes alvos nas amostras de CCECO ainda são necessários.

A disparidade entre os grupos selecionados para realização do *array* de metilação (tabela 3) pode ser considerada uma limitação do estudo. Considerando o estágio do tumor, os pacientes do grupo recidiva apresentavam tumores mais avançados quando comparados aos pacientes do grupo sem recidiva. Existem fatores que estão altamente relacionados ao desenvolvimento de recidivas e isso inclui os tumores em estadiamento avançado¹⁴², portanto, para tentar contornar este problema, antes da análise diferencial foi realizada uma correção dos valores de beta (SVA) considerando esta variação.

Outra limitação relaciona-se ao fato de o DNA extraído destes pacientes e utilizado em todas as análises ser proveniente de uma única amostragem de margem cirúrgica, em decorrência da disponibilidade deste tipo de material biológico criopreservado na instituição, o que pode não representar totalmente o perfil de metilação do tecido normal adjacente aos tumores analisados. Para garantir que os resultados deste estudo possam futuramente ser utilizados como uma ferramenta para prever o prognóstico destes pacientes, uma validação dos achados em uma nova casuística se torna necessária.

Os CCECO recorrentes são, em sua maioria, incuráveis e cerca de 2/3 dos pacientes de CCECO são diagnosticados já em estágios avançados da doença¹⁴³, o que contribui para a

estagnação das taxas de sobrevivência dos pacientes. A busca de biomarcadores tem como alvo principal avaliar e mensurar o *status* de processos biológicos normais e patológicos. O rastreamento desses marcadores pode se tornar peça importante na identificação de indivíduos de alto risco que poderiam se beneficiar de uma terapia intensificada ou novos ensaios terapêuticos direcionados.

A presença de células com alterações epigenéticas nos tecidos histologicamente normais circundantes do tumor sugere a necessidade de readequação da avaliação da ressecção cirúrgica para um melhor controle e prognóstico de pacientes com CCECO, utilizando-se métodos de avaliação mais precisos e eficazes para auxiliar a análise histopatológica utilizada na rotina clínica. A natureza reversível destes padrões de metilação fornece uma promissora alternativa terapêutica a estes pacientes, onde a identificação de alterações epigenéticas nas margens cirúrgicas pode influenciar, em combinação com o diagnóstico patológico, na evolução e prognóstico destes indivíduos.

8 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que existem alterações na metilação do DNA na mucosa histologicamente normal adjacente ao tumor primário de indivíduos com CCECO. Estes padrões de metilação foram capazes de diferenciar pacientes com um maior risco de desenvolvimento de recidivas locais e poderiam ser considerados para auxiliar na definição de prognóstico dos pacientes.

Na comparação entre pacientes que desenvolveram recidiva e pacientes que não desenvolveram recidiva, 311 sítios CpG e 23 regiões diferencialmente metiladas entre os dois grupos foram encontradas, sendo 66% de posições e 65% de regiões hipermetiladas. Além disso, a maioria das sondas diferencialmente metiladas localizaram-se em íntrons, regiões promotoras e ilhas CpG.

Dentre as regiões diferencialmente metiladas encontradas, 6 delas foram selecionadas para análise mais aprofundada e estão associadas aos genes: *GALR1*, *GRHL3*, *FAM84B*, *IFFO1*, *LTBP4* e *PIWIL2*. Com exceção da região do gene *LTBP4*, pacientes que desenvolveram recidiva local apresentaram regiões hipermetiladas quando comparados aos pacientes que não desenvolveram recidiva. A metilação da região do gene *GRHL3* se mostrou potencial biomarcador para pior prognóstico em pacientes com CCECO.

9 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos e encontra-se aprovado (1121/2016). Os pesquisadores garantem o sigilo de todos os participantes da pesquisa, não divulgando o nome ou qualquer outra informação que possa identificar os envolvidos.

A pesquisa apresenta caráter retrospectivo (envolvendo pacientes que já recidivaram e/ou vieram a óbito) e o seu desenvolvimento não resultou em impacto no manejo clínico dos participantes, bem como necessidade de aconselhamento genético. Por tratar de levantamento de dados junto a prontuários e não ser possível o contato com alguns participantes de pesquisa selecionados, a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi solicitada e aprovada.

REFERÊNCIAS

1. International Agency for Research on Cancer. *World Cancer Report 2014*. Lyon: **International Agency for Research on Cancer**; 2014.
2. Bray F, Soerjomataram I. *The Changing Global Burden of Cancer: Transitions in Human Development and Implications for Cancer Prevention and Control*. 2015.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. **CA Cancer J Clin**. 2018.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer Statistics, 2017*. **CA Cancer J Clin**. 2017;67(1):7-30.
5. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: **INCA**; 2017.
6. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. *The molecular biology of head and neck cancer*. **Nat Rev Cancer**. 2011;11(1):9-22.
7. Ministério da Saúde: Secretaria de Assistência à Saúde. *Falando sobre câncer da boca*. Rio de Janeiro: **INCA**; 2002.
8. Speight PM. *Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer*. **Head Neck Pathol**. 2007;1(1):61-6.
9. Argiris A, Karamouzis MV, Raben D, Ferris RL. *Head and neck cancer*. **Lancet**. 2008;371(9625):1695-709.
10. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. *Falando Sobre Câncer e Seus Fatores de Risco*. Rio de Janeiro: **INCA**; 1996.
11. Lubin JH, Purdue M, Kelsey K, Zhang ZF, Winn D, Wei Q, et al. *Total exposure and exposure rate effects for alcohol and smoking and risk of head and neck cancer: a pooled analysis of case-control studies*. **Am J Epidemiol**. 2009;170(8):937-47.
12. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. *Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2009;18(2):541-50.
13. Gillison ML, Castellsague X, Chaturvedi A, Goodman MT, Snijders P, Tommasino M, et al. *Eurogin Roadmap: comparative epidemiology of HPV infection and associated cancers of the head and neck and cervix*. **Int J Cancer**. 2014;134(3):497-507.
14. Huang SH, O'Sullivan B. *Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer*. **Curr Treat Options Oncol**. 2017;18(7):40.
15. Jadhav KB, Gupta N. *Clinicopathological prognostic implicators of oral squamous cell carcinoma: need to understand and revise*. **N Am J Med Sci**. 2013;5(12):671-9.
16. Sigston EA, Longano A, Strzelecki AT, Williams BR. *Surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma: Effect of heat artifact on immunohistochemistry as a future tool for assessment*. **Head Neck**. 2016;38(9):1401-6.
17. National Comprehensive Cancer Network. *NCCN Practice Guidelines in Oncology: Head and Neck Cancers*: **National Comprehensive Cancer Network**; 2019.
18. Thompson CF, St John MA, Lawson G, Grogan T, Elashoff D, Mendelsohn AH. *Diagnostic value of sentinel lymph node biopsy in head and neck cancer: a meta-analysis*. **Eur Arch Otorhinolaryngol**. 2013;270(7):2115-22.

19. *Sobrevida em 5 anos*. [Internet]: Registro Hospitalar de Câncer - Hospital de Câncer de Barretos; [cited 08 April]; Available from: infogram.com/sobrevida-em-5-anos-1h7k23vgowmv4xr.
20. Cramer JD, Burtness B, Le QT, Ferris RL. *The changing therapeutic landscape of head and neck cancer*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2019.
21. Burtness B, Goldwasser MA, Flood W, Mattar B, Forastiere AA, Eastern Cooperative Oncology G. *Phase III randomized trial of cisplatin plus placebo compared with cisplatin plus cetuximab in metastatic/recurrent head and neck cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group study*. **J Clin Oncol**. 2005;23(34):8646-54.
22. Vermorken JB, Mesia R, Rivera F, Remenar E, Kawecki A, Rottey S, et al. *Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer*. **N Engl J Med**. 2008;359(11):1116-27.
23. Shaw RJ, Hall GL, Woolgar JA, Lowe D, Rogers SN, Field JK, et al. *Quantitative methylation analysis of resection margins and lymph nodes in oral squamous cell carcinoma*. **Br J Oral Maxillofac Surg**. 2007;45(8):617-22.
24. Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. *Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database*. **Int J Cancer**. 2005;114(5):806-16.
25. *Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program*. [Internet]: National Cancer Institute; 2006.
26. Markopoulos AK. *Current aspects on oral squamous cell carcinoma*. **Open Dent J**. 2012;6:126-30.
27. Majumdar B, Patil S, Sarode SC, Sarode GS, Rao RS. *Clinico-pathological prognosticators in oral squamous cell carcinoma: An update*. **Translational Research in Oral Oncology**. 2017;2:1-14.
28. Gonzalez-Garcia R, Naval-Gias L, Roman-Romero L, Sastre-Perez J, Rodriguez-Campo FJ. *Local recurrences and second primary tumors from squamous cell carcinoma of the oral cavity: a retrospective analytic study of 500 patients*. **Head Neck**. 2009;31(9):1168-80.
29. Yanamoto S, Yamada S, Takahashi H, Yoshitomi I, Kawasaki G, Ikeda H, et al. *Clinicopathological risk factors for local recurrence in oral squamous cell carcinoma*. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2012;41(10):1195-200.
30. Wang W, Han S, Yao Z, Li X, Huang P, Zhang M, et al. *A study of epidemiologic and recurrence factors of oral cancer*. **J Oral Maxillofac Surg**. 2012;70(9):2205-10.
31. Vazquez-Mahia I, Seoane J, Varela-Centelles P, Tomas I, Alvarez Garcia A, Lopez Cedrun JL. *Predictors for tumor recurrence after primary definitive surgery for oral cancer*. **J Oral Maxillofac Surg**. 2012;70(7):1724-32.
32. Ermer MA, Kirsch K, Bittermann G, Fretwurst T, Vach K, Metzger MC. *Recurrence rate and shift in histopathological differentiation of oral squamous cell carcinoma - A long-term retrospective study over a period of 13.5 years*. **J Craniomaxillofac Surg**. 2015;43(7):1309-13.
33. Camisasca DR, Silami MA, Honorato J, Dias FL, de Faria PA, Lourenco Sde Q. *Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features in patients with and without recurrence*. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec**. 2011;73(3):170-6.
34. *NCI Dictionary of Cancer Terms*. [Internet]: National Cancer Institute; 2015; Available from: www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms.
35. Shah AK. *Postoperative pathologic assessment of surgical margins in oral cancer: A contemporary review*. **J Oral Maxillofac Pathol**. 2018;22(1):78-85.

36. Alicandri-Ciufelli M, Bonali M, Piccinini A, Marra L, Ghidini A, Cunsolo EM, et al. *Surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma: what is 'close'?* **Eur Arch Otorhinolaryngol.** 2013;270(10):2603-9.
37. Priya SR, D'Cruz AK, Pai PS. *Cut margins and disease control in oral cancers.* **J Cancer Res Ther.** 2012;8(1):74-9.
38. National Comprehensive Cancer Network. *Head and neck cancers Plymouth Meeting: NCCN;* 2014.
39. Erickson-Bhatt SJ, Nolan R, Shemonski ND, Adie SG, Putney J, Darga D, et al. *In vivo intra-operative breast tumor margin detection using a portable OCT system with a handheld surgical imaging probe.* In: **Advanced Biomedical and Clinical Diagnostic Systems XII;** San Francisco, United States; 2014. February 27. **SPIE Proceedings.** 2014.
40. de Carvalho AC, Kowalski LP, Campos AH, Soares FA, Carvalho AL, Vettore AL. *Clinical significance of molecular alterations in histologically negative surgical margins of head and neck cancer patients.* **Oral Oncol.** 2012;48(3):240-8.
41. Chinn SB, Myers JN. *Oral Cavity Carcinoma: Current Management, Controversies, and Future Directions.* **J Clin Oncol.** 2015;33(29):3269-76.
42. Noble AR, Greskovich JF, Han J, Reddy CA, Nwizu TI, Khan MF, et al. *Risk Factors Associated with Disease Recurrence in Patients with Stage III/IV Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity Treated with Surgery and Postoperative Radiotherapy.* **Anticancer Res.** 2016;36(2):785-92.
43. Hayashi M, Wu G, Roh JL, Chang X, Li X, Ahn J, et al. *Correlation of gene methylation in surgical margin imprints with locoregional recurrence in head and neck squamous cell carcinoma.* **Cancer.** 2015;121(12):1957-65.
44. Reis PP, Waldron L, Perez-Ordóñez B, Pintilie M, Galloni NN, Xuan Y, et al. *A gene signature in histologically normal surgical margins is predictive of oral carcinoma recurrence.* **BMC Cancer.** 2011;11:437.
45. Buchakjian MR, Tasche KK, Robinson RA, Pagedar NA, Sperry SM. *Association of Main Specimen and Tumor Bed Margin Status With Local Recurrence and Survival in Oral Cancer Surgery.* **JAMA Otolaryngol Head Neck Surg.** 2016.
46. Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. *Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin.* **Cancer.** 1953;6(5):963-8.
47. Ha PK, Califano JA. *The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck.* **Crit Rev Oral Biol Med.** 2003;14(5):363-9.
48. Mao L, Clark D. *Molecular margin of surgical resections--where do we go from here?* **Cancer.** 2015;121(12):1914-6.
49. Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer.* **Cell.** 2000;100(1):57-70.
50. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation.* **Cell.** 2011;144(5):646-74.
51. Sidransky D. *Emerging molecular markers of cancer.* **Nat Rev Cancer.** 2002;2(3):210-9.
52. Lodish H, Berk A, Zipursky S, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Proto-Oncogenes and Tumor-Suppressor Genes.* . *Molecular Cell Biology.* 4th ed. ed. **New York: W. H. Freeman;** 2000.
53. Feinberg AP. *Cancer epigenetics takes center stage.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2001;98(2):392-4.
54. Stein RA. *Epigenetics--the link between infectious diseases and cancer.* **JAMA.** 2011;305(14):1484-5.

55. Portela A, Esteller M. *Epigenetic modifications and human disease*. **Nat Biotechnol**. 2010;28(10):1057-68.
56. Parry L, Clarke AR. *The Roles of the Methyl-CpG Binding Proteins in Cancer*. **Genes Cancer**. 2011;2(6):618-30.
57. Saintigny P, Zhang L, Fan YH, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou VA, Feng L, et al. *Gene expression profiling predicts the development of oral cancer*. **Cancer Prev Res (Phila)**. 2011;4(2):218-29.
58. Smith ZD, Meissner A. *DNA methylation: roles in mammalian development*. **Nat Rev Genet**. 2013;14(3):204-20.
59. Suzuki MM, Bird A. *DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics*. **Nat Rev Genet**. 2008;9(6):465-76.
60. Rodriguez-Paredes M, Esteller M. *Cancer epigenetics reaches mainstream oncology*. **Nat Med**. 2011;17(3):330-9.
61. Costello JF, Fruhwald MC, Smiraglia DJ, Rush LJ, Robertson GP, Gao X, et al. *Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns*. **Nat Genet**. 2000;24(2):132-8.
62. Pierini S, Jordanov SH, Mitkova AV, Chalakov IJ, Melnicherov MB, Kunev KV, et al. *Promoter hypermethylation of CDKN2A, MGMT, MLH1, and DAPK genes in laryngeal squamous cell carcinoma and their associations with clinical profiles of the patients*. **Head Neck**. 2014;36(8):1103-8.
63. Carvalho AL, Jeronimo C, Kim MM, Henrique R, Zhang Z, Hoque MO, et al. *Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma*. **Clin Cancer Res**. 2008;14(1):97-107.
64. Brait M, Loyo M, Rosenbaum E, Ostrow KL, Markova A, Papagerakis S, et al. *Correlation between BRAF mutation and promoter methylation of TIMP3, RARBeta2 and RASSF1A in thyroid cancer*. **Epigenetics**. 2012;7(7):710-9.
65. Demokan S, Chuang A, Suoglu Y, Uluhan M, Yalniz Z, Califano JA, et al. *Promoter methylation and loss of p16(INK4a) gene expression in head and neck cancer*. **Head Neck**. 2012;34(10):1470-5.
66. Righini CA, de Fraipont F, Timsit JF, Faure C, Brambilla E, Reyt E, et al. *Tumor-specific methylation in saliva: a promising biomarker for early detection of head and neck cancer recurrence*. **Clin Cancer Res**. 2007;13(4):1179-85.
67. Marsit CJ, Posner MR, McClean MD, Kelsey KT. *Hypermethylation of E-cadherin is an independent predictor of improved survival in head and neck squamous cell carcinoma*. **Cancer**. 2008;113(7):1566-71.
68. de Moraes RV, Oliveira DT, Landman G, de Carvalho F, Caballero O, Nonogaki S, et al. *E-cadherin abnormalities resulting from CPG methylation promoter in metastatic and nonmetastatic oral cancer*. **Head Neck**. 2008;30(1):85-92.
69. Singh J, Jayaraj R, Baxi S, Mileva M, Skinner J, Dhand NK, et al. *Immunohistochemical expression levels of p53 and eIF4E markers in histologically negative surgical margins, and their association with the clinical outcome of patients with head and neck squamous cell carcinoma*. **Mol Clin Oncol**. 2016;4(2):166-72.
70. Ogbureke KU, Weinberger PM, Looney SW, Li L, Fisher LW. *Expressions of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), dentin sialophosphoprotein (DSPP), and osteopontin (OPN) at histologically negative surgical margins may predict recurrence of oral squamous cell carcinoma*. **Oncotarget**. 2012;3(3):286-98.

71. Goldenberg D, Harden S, Masayeva BG, Ha P, Benoit N, Westra WH, et al. *Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer*. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. 2004;130(1):39-44.
72. Martone T, Gillio-Tos A, De Marco L, Fiano V, Maule M, Cavalot A, et al. *Association between hypermethylated tumor and paired surgical margins in head and neck squamous cell carcinomas*. **Clin Cancer Res**. 2007;13(17):5089-94.
73. Sinha P, Bahadur S, Thakar A, Matta A, Macha M, Ralhan R, et al. *Significance of promoter hypermethylation of p16 gene for margin assessment in carcinoma tongue*. **Head Neck**. 2009;31(11):1423-30.
74. Tan HK, Saulnier P, Auperin A, Lacroix L, Casiraghi O, Janot F, et al. *Quantitative methylation analyses of resection margins predict local recurrences and disease-specific deaths in patients with head and neck squamous cell carcinomas*. **Br J Cancer**. 2008;99(2):357-63.
75. Hayashi M, Guerrero-Preston R, Sidransky D, Koch WM. *Paired box 5 methylation detection by droplet digital PCR for ultra-sensitive deep surgical margins analysis of head and neck squamous cell carcinoma*. **Cancer Prev Res (Phila)**. 2015;8(11):1017-26.
76. Shaw RJ, Hobkirk AJ, Nikolaidis G, Woolgar JA, Triantafyllou A, Brown JS, et al. *Molecular staging of surgical margins in oral squamous cell carcinoma using promoter methylation of p16(INK4A), cytoglobin, E-cadherin, and TMEFF2*. **Ann Surg Oncol**. 2013;20(8):2796-802.
77. Roh JL, Westra WH, Califano JA, Sidransky D, Koch WM. *Tissue imprint for molecular mapping of deep surgical margins in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. **Head Neck**. 2012;34(11):1529-36.
78. Supic G, Kozomara R, Jovic N, Zeljic K, Magic Z. *Prognostic significance of tumor-related genes hypermethylation detected in cancer-free surgical margins of oral squamous cell carcinomas*. **Oral Oncol**. 2011;47(8):702-8.
79. Cheng SJ, Chang CF, Ko HH, Liu YC, Peng HH, Wang HJ, et al. *Hypermethylated ZNF582 and PAX1 genes in oral scrapings collected from cancer-adjacent normal oral mucosal sites are associated with aggressive progression and poor prognosis of oral cancer*. **Oral Oncol**. 2017;75:169-77.
80. *DNA Bisulfite Conversion*. [Internet] Farmingdale: Epigentek; 2019; Available from: www.epigentek.com/catalog/dna-bisulfite-conversion-c-75_21_47.html.
81. Yang AS, Estecio MR, Doshi K, Kondo Y, Tajara EH, Issa JP. *A simple method for estimating global DNA methylation using bisulfite PCR of repetitive DNA elements*. **Nucleic Acids Res**. 2004;32(3):e38.
82. Ehrlich M. *DNA hypomethylation in cancer cells*. **Epigenomics**. 2009;1(2):239-59.
83. Pidsley R, Zotenko E, Peters TJ, Lawrence MG, Risbridger GP, Molloy P, et al. *Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling*. **Genome Biol**. 2016;17(1):208.
84. Sandoval J, Heyn H, Moran S, Serra-Musach J, Pujana MA, Bibikova M, et al. *Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome*. **Epigenetics**. 2011;6(6):692-702.
85. *Illumina Methylation Assay*. [Internet]: Wikipedia; 2017 [cited 2018 Mar 15]; Available from: en.wikipedia.org/wiki/Illumina_Methylation_Assay.
86. Illumina. *Infinium® HumanMethylation450 BeadChip*. San Diego: Illumina; 2012.
87. Wu MC, Kuan PF. *A Guide to Illumina BeadChip Data Analysis*. **Methods Mol Biol**. 2018;1708:303-30.

88. Irizarry RA, Ladd-Acosta C, Wen B, Wu Z, Montano C, Onyango P, et al. *The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores.* **Nat Genet.** 2009;41(2):178-86.
89. *MethHC: A database of DNA Methylation and gene expression in Human Cancer.* [Internet] Taiwan: National Chiao Tung University; 2014 [cited 2018 Jun 22]; Available from: <http://methhc.mbc.nctu.edu.tw>.
90. Wright ML, Dozmorov MG, Wolen AR, Jackson-Cook C, Starkweather AR, Lyon DE, et al. *Establishing an analytic pipeline for genome-wide DNA methylation.* **Clin Epigenetics.** 2016;8:45.
91. Aryee MJ, Jaffe AE, Corrada-Bravo H, Ladd-Acosta C, Feinberg AP, Hansen KD, et al. *Minfi: a flexible and comprehensive Bioconductor package for the analysis of Infinium DNA methylation microarrays.* **Bioinformatics.** 2014;30(10):1363-9.
92. Du P, Zhang X, Huang CC, Jafari N, Kibbe WA, Hou L, et al. *Comparison of Beta-value and M-value methods for quantifying methylation levels by microarray analysis.* **BMC Bioinformatics.** 2010;11:587.
93. Dedeurwaerder S, Defrance M, Bizet M, Calonne E, Bontempi G, Fuks F. *A comprehensive overview of Infinium HumanMethylation450 data processing.* **Brief Bioinform.** 2014;15(6):929-41.
94. Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, et al. *limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies.* **Nucleic Acids Res.** 2015;43(7):e47.
95. Peters TJ, Buckley MJ, Statham AL, Pidsley R, Samaras K, R VL, et al. *De novo identification of differentially methylated regions in the human genome.* **Epigenetics Chromatin.** 2015;8:6.
96. Martin TC, Yet I, Tsai PC, Bell JT. *coMET: visualisation of regional epigenome-wide association scan results and DNA co-methylation patterns.* **BMC Bioinformatics.** 2015;16:131.
97. Imgenberg-Kreuz J, Sandling JK, Almlöf JC, Nordlund J, Signer L, Norheim KB, et al. *Genome-wide DNA methylation analysis in multiple tissues in primary Sjogren's syndrome reveals regulatory effects at interferon-induced genes.* **Ann Rheum Dis.** 2016;75(11):2029-36.
98. Kuleshov MV, Jones MR, Rouillard AD, Fernandez NF, Duan Q, Wang Z, et al. *Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update.* **Nucleic Acids Res.** 2016;44(W1):W90-7.
99. Kanehisa M, Goto S. *KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes.* **Nucleic Acids Res.** 2000;28(1):27-30.
100. Maksimovic J, Phipson B, Oshlack A. *A cross-package Bioconductor workflow for analysing methylation array data.* **F1000Res.** 2016;5:1281.
101. Safari A, Silver MJ, Zavattari P, Moi L, Columbano A, Meaburn EL, et al. *Estimation of a significance threshold for epigenome-wide association studies.* **Genet Epidemiol.** 2018;42(1):20-33.
102. Chen H, Boutros PC. *VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R.* **BMC Bioinformatics.** 2011;12:35.
103. *GeneCards: The Human Gene Database.* [Internet] Israel: Weizmann Institute of Science; 1996-2018 [cited 2018 Jan 03]; Available from: <http://www.genecards.org/>.
104. Gleich LL, Ryzenman J, Gluckman JL, Wilson KM, Barrett WL, Redmond KP. *Recurrent advanced (T3 or T4) head and neck squamous cell carcinoma: is salvage possible?* **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 2004;130(1):35-8.
105. Haque R, Contreras R, McNicoll MP, Eckberg EC, Petitti DB. *Surgical margins and survival after head and neck cancer surgery.* **BMC Ear Nose Throat Disord.** 2006;6:2.

106. Smeele LE, Leemans CR, Langendijk JA, Tiwari R, Slotman BJ, van Der Waal I, et al. *Positive surgical margins in neck dissection specimens in patients with head and neck squamous cell carcinoma and the effect of radiotherapy.* **Head Neck.** 2000;22(6):559-63.
107. Clark DJ, Mao L. *Understanding the Surgical Margin: A Molecular Assessment.* **Oral Maxillofac Surg Clin North Am.** 2017;29(3):245-58.
108. Heyn H, Esteller M. *DNA methylation profiling in the clinic: applications and challenges.* **Nat Rev Genet.** 2012;13(10):679-92.
109. Strzelczyk JK, Krakowczyk L, Owczarek AJ. *Methylation status of SFRP1, SFRP2, RASSF1A, RARBeta and DAPK1 genes in patients with oral squamous cell carcinoma.* **Arch Oral Biol.** 2019;98:265-72.
110. Marsit CJ, Christensen BC, Houseman EA, Karagas MR, Wrensch MR, Yeh RF, et al. *Epigenetic profiling reveals etiologically distinct patterns of DNA methylation in head and neck squamous cell carcinoma.* **Carcinogenesis.** 2009;30(3):416-22.
111. Demokan S, Dalay N. *Role of DNA methylation in head and neck cancer.* **Clin Epigenetics.** 2011;2(2):123-50.
112. Degli Esposti D, Sklias A, Lima SC, Beghelli-de la Forest Divonne S, Cahais V, Fernandez-Jimenez N, et al. *Unique DNA methylation signature in HPV-positive head and neck squamous cell carcinomas.* **Genome Med.** 2017;9(1):33.
113. Cancer Genome Atlas N. *Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas.* **Nature.** 2015;517(7536):576-82.
114. Colacino JA, Dolinoy DC, Duffy SA, Sartor MA, Chepeha DB, Bradford CR, et al. *Comprehensive analysis of DNA methylation in head and neck squamous cell carcinoma indicates differences by survival and clinicopathologic characteristics.* **PLoS One.** 2013;8(1):e54742.
115. Misawa K, Misawa Y, Kanazawa T, Mochizuki D, Imai A, Endo S, et al. *Epigenetic inactivation of galanin and GALR1/2 is associated with early recurrence in head and neck cancer.* **Clin Exp Metastasis.** 2016;33(2):187-95.
116. Misawa K, Mochizuki D, Imai A, Mima M, Misawa Y, Mineta H. *Analysis of Site-Specific Methylation of Tumor-Related Genes in Head and Neck Cancer: Potential Utility as Biomarkers for Prognosis.* **Cancers (Basel).** 2018;10(1).
117. Misawa K, Mochizuki D, Endo S, Mima M, Misawa Y, Imai A, et al. *Site-specific methylation patterns of the GAL and GALR1/2 genes in head and neck cancer: Potential utility as biomarkers for prognosis.* **Mol Carcinog.** 2017;56(3):1107-16.
118. Yoon D, Bae K, Lee MK, Kim JH, Yoon KA. *Galanin is an epigenetically silenced tumor suppressor gene in gastric cancer cells.* **PLoS One.** 2018;13(2):e0193275.
119. Sepulveda JL, Gutierrez-Pajares JL, Luna A, Yao Y, Tobias JW, Thomas S, et al. *High-definition CpG methylation of novel genes in gastric carcinogenesis identified by next-generation sequencing.* **Mod Pathol.** 2016;29(2):182-93.
120. Guo S, Yan F, Xu J, Bao Y, Zhu J, Wang X, et al. *Identification and validation of the methylation biomarkers of non-small cell lung cancer (NSCLC).* **Clin Epigenetics.** 2015;7:3.
121. Darido C, Georgy SR, Wilanowski T, Dworkin S, Auden A, Zhao Q, et al. *Targeting of the tumor suppressor GRHL3 by a miR-21-dependent proto-oncogenic network results in PTEN loss and tumorigenesis.* **Cancer Cell.** 2011;20(5):635-48.
122. Georgy SR, Cangkruma M, Srivastava S, Partridge D, Auden A, Dworkin S, et al. *Identification of a Novel Proto-oncogenic Network in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.* **J Natl Cancer Inst.** 2015;107(9).

123. Wang XK, Zhou FF, Tao HR, Wang X, Zhang C, Su F, et al. *Knockdown of GRHL3 inhibits activities and induces cell cycle arrest and apoptosis of human colorectal cancer cells.* **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.** 2017;37(6):880-5.
124. Feng N, Wang Y, Zheng M, Yu X, Lin H, Ma RN, et al. *Genome-wide analysis of DNA methylation and their associations with long noncoding RNA/mRNA expression in non-small-cell lung cancer.* **Epigenomics.** 2017.
125. Campan M, Moffitt M, Houshdaran S, Shen H, Widschwendter M, Daxenbichler G, et al. *Genome-scale screen for DNA methylation-based detection markers for ovarian cancer.* **PLoS One.** 2011;6(12):e28141.
126. Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H. *A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal.* **Genes Dev.** 1998;12(23):3715-27.
127. Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Ijiri TW, Isobe T, Asada N, Fujita Y, et al. *Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis.* **Development.** 2004;131(4):839-49.
128. Sasaki T, Shiohama A, Minoshima S, Shimizu N. *Identification of eight members of the Argonaute family in the human genome.* **Genomics.** 2003;82(3):323-30.
129. Chen C, Liu J, Xu G. *Overexpression of PIWI proteins in human stage III epithelial ovarian cancer with lymph node metastasis.* **Cancer Biomark.** 2013;13(5):315-21.
130. Qu X, Liu J, Zhong X, Li X, Zhang Q. *PIWIL2 promotes progression of non-small cell lung cancer by inducing CDK2 and Cyclin A expression.* **J Transl Med.** 2015;13:301.
131. Li J, Xu L, Bao Z, Xu P, Chang H, Wu J, et al. *High expression of PIWIL2 promotes tumor cell proliferation, migration and predicts a poor prognosis in glioma.* **Oncol Rep.** 2017;38(1):183-92.
132. Yang Y, Zhang X, Song D, Wei J. *Piwi2 modulates the invasion and metastasis of prostate cancer by regulating the expression of matrix metalloproteinase-9 and epithelial-mesenchymal transitions.* **Oncol Lett.** 2015;10(3):1735-40.
133. Wang Y, Liu Y, Shen X, Zhang X, Chen X, Yang C, et al. *The PIWI protein acts as a predictive marker for human gastric cancer.* **Int J Clin Exp Pathol.** 2012;5(4):315-25.
134. Oh SJ, Kim SM, Kim YO, Chang HK. *Clinicopathologic Implications of PIWIL2 Expression in Colorectal Cancer.* **Korean J Pathol.** 2012;46(4):318-23.
135. Cheng C, Cui H, Zhang L, Jia Z, Song B, Wang F, et al. *Genomic analyses reveal FAM84B and the NOTCH pathway are associated with the progression of esophageal squamous cell carcinoma.* **Gigascience.** 2016;5:1.
136. Camps J, Nguyen QT, Padilla-Nash HM, Knutsen T, McNeil NE, Wangsa D, et al. *Integrative genomics reveals mechanisms of copy number alterations responsible for transcriptional deregulation in colorectal cancer.* **Genes Chromosomes Cancer.** 2009;48(11):1002-17.
137. Berg M, Agesen TH, Thiis-Evensen E, group IN-s, Merok MA, Teixeira MR, et al. *Distinct high resolution genome profiles of early onset and late onset colorectal cancer integrated with gene expression data identify candidate susceptibility loci.* **Mol Cancer.** 2010;9:100.
138. Bultmann I, Conradi A, Kretschmer C, Sterner-Kock A. *Latent transforming growth factor beta-binding protein 4 is downregulated in esophageal cancer via promoter methylation.* **PLoS One.** 2013;8(5):e65614.
139. Wang J, Cazzato E, Ladewig E, Frattini V, Rosenbloom DI, Zairis S, et al. *Clonal evolution of glioblastoma under therapy.* **Nat Genet.** 2016;48(7):768-76.

140. Baylin SB, Jones PA. *A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications.* **Nat Rev Cancer.** 2011;11(10):726-34.
141. Lim YC, Li J, Ni Y, Liang Q, Zhang J, Yeo GSH, et al. *A complex association between DNA methylation and gene expression in human placenta at first and third trimesters.* **PLoS One.** 2017;12(7):e0181155.
142. Barry CP, Ahmed F, Rogers SN, Lowe D, Bekiroglu F, Brown JS, et al. *Influence of surgical margins on local recurrence in T1/T2 oral squamous cell carcinoma.* **Head Neck.** 2015;37(8):1176-80.
143. Bauml JM, Cohen RB, Aggarwal C. *Immunotherapy for head and neck cancer: latest developments and clinical potential.* **Ther Adv Med Oncol.** 2016;8(3):168-75.

ANEXOS**Anexo A** - Tabela Suplementar 1

Tabela Suplementar 1 - Características clínico-patológicas detalhadas dos pacientes selecionados para o *array* de metilação.

ID patient	Idade	Gênero	Tabagista	Etilista	Data diagnóstico	Sítio	TNM	EC	Data tratamento	Recidiva	Seguimento	Data seguimento	Infiltração perineural	Infiltração vascular
1	45	Masculino	Sim	Não	28/04/10	Assoalho	T4AN0M0	IVA	18/08/10	Sim	Óbito	19/09/11	Sim	Não
2	89	Feminino	Não	Não	08/07/10	Língua	T1N0M0	I	19/07/10	Não	Óbito	11/02/18	Não	Não
3	55	Masculino	Sim	Sim	01/05/10	Assoalho	T2N1M0	III	26/08/10	Sim	Óbito	15/05/13	Sim	Não
4	64	Masculino	Sim	Sim	01/03/11	Língua	T1N0M0	I	24/05/11	Não	Vivo	11/02/19	Não	Não
5	54	Masculino	Sim	Sim	22/07/11	Assoalho	T2N2CM0	IVA	01/09/11	Sim	Óbito	17/08/12	Sim	Sim
6	57	Feminino	Ex	Sim	09/01/13	Língua	T1N0M0	I	06/03/13	Não	Vivo	20/09/18	Não	Não
7	57	Feminino	Ex	Não	15/06/09	Gengiva	T1N0M0	I	19/11/09	Sim	Vivo	30/11/18	-	-
8	61	Masculino	Ex	Ex	13/05/13	Assoalho	T3N0M0	III	16/07/13	Sim	Óbito	04/09/14	Sim	Não
9	83	Masculino	Sim	Ex	17/01/13	Assoalho	T2N2BM0	IVA	18/03/13	Sim	Óbito	13/12/13	Não	Não
10	61	Masculino	Sim	Ex	10/06/13	Língua	T2N0M0	II	07/08/13	Sim	Vivo	04/10/18	Não	Não
11	54	Masculino	Sim	Não	16/04/13	Assoalho	T4AN2CM0	IVA	05/02/14	Sim	Óbito	10/09/15	Sim	Sim
12	64	Masculino	Sim	Sim	13/04/07	Língua	T2N0M0	II	26/09/07	Não	Vivo	05/02/14	-	-
13	82	Masculino	Ex	Ex	08/08/07	Língua	T3N2AM0	IVA	11/10/07	Sim	Óbito	05/10/08	Não	Não
14	48	Masculino	Sim	Ex	24/06/08	Língua	T1N0M0	I	08/07/08	Não	Vivo	10/05/18	-	-
15	72	Masculino	Sim	Sim	13/05/08	Língua	T1N0M0	I	15/08/08	Não	Vivo	31/01/19	-	-
16	73	Feminino	Sim	Sim	23/05/08	Língua	T2N0M0	II	23/07/08	Sim	Óbito	20/07/09	Não	Não
17	47	Feminino	Não	Não	01/09/08	Língua	T2N0M0	II	20/11/08	Sim	Vivo	09/01/19	Não	Não
18	62	Masculino	Sim	Sim	24/09/09	Língua	T1N0M0	I	23/11/09	Não	Óbito	17/07/15	Não	Não
19	70	Masculino	Não	Ex	11/08/09	Língua	T1N1M0	III	23/11/09	Não	Vivo	21/09/18	Não	Não
20	69	Masculino	Ex	Ex	01/12/08	Língua	T2N0M0	II	21/01/09	Não	Óbito	22/05/12	Não	Não
21	80	Feminino	Não	Não	07/03/09	Língua	T2N0M0	II	27/05/09	Não	Vivo	10/01/18	Não	Não
22	55	Masculino	Sim	Sim	11/02/09	Assoalho	T1N0M0	I	10/08/09	Não	Vivo	07/06/18	Não	Não
23	55	Masculino	Sim	Sim	14/08/09	Língua	T3N2BM0	IVA	17/11/09	Sim	Óbito	14/08/10	-	-
24	48	Masculino	Ex	Sim	03/12/10	Língua	T2N0M0	II	28/02/11	Não	Vivo	05/07/18	-	-
25	54	Masculino	Sim	Sim	27/09/13	Assoalho	T4AN2BM0	IVA	17/01/14	Sim	Vivo	09/03/17	Não	Sim
26	54	Masculino	Sim	Sim	30/06/09	Assoalho	T2N0M0	II	24/09/09	Não	Óbito	02/11/17	Não	Não
27	70	Feminino	Sim	Não	04/09/08	Assoalho	T2N0M0	II	11/12/08	Não	Vivo	31/01/18	Não	Não
28	65	Masculino	Sim	Sim	22/06/12	Língua	T1N0M0	I	21/08/12	Não	Óbito	11/10/14	Não	Não
29	78	Feminino	Sim	Ex	19/10/09	Gengiva	T4AN0M0	IVA	12/08/10	Sim	Óbito	06/09/12	Não	Não
30	60	Masculino	Ex	Ex	20/12/12	Assoalho	T4AN0M0	IVA	07/01/14	Sim	Vivo	30/11/17	Não	Não
31	54	Feminino	Sim	Sim	18/07/07	Gengiva	T4AN0M0	IVA	30/08/07	Sim	Óbito	02/09/08	Não	Não
32	55	Feminino	Não	Não	18/12/14	Língua	T2N0M0	II	03/03/15	Não	Vivo	12/12/18	Sim	Não

Anexo B - Tabela Suplementar 2

Tabela Suplementar 2 - Concentração e qualidade de DNA das amostras de margens criopreservadas de pacientes com CCECO após extração pelo Qiasymphony, quantificadas e com qualidade medidas pelo Nanodrop 2000 (*Thermo Scientific*).

ID	[ng/uL]	260/280	260/230
01_R	57,2	1,84	2,30
02_N	23,2	1,81	1,55
03_R	63,2	1,84	2,44
04_N	75,2	1,84	2,36
05_S	146,0	1,84	2,38
06_N	48,8	1,81	1,59
07_S	67,4	1,83	1,74
08_S	83,0	1,86	2,43
09_S	69,4	1,86	2,21
10_S	64,6	1,85	2,18
11_S	53,6	1,83	2,18
12_N	46,4	1,82	1,81
13_S	147,0	1,84	2,48
14_N	60,4	1,82	1,78
15_N	28,4	1,85	1,70
16_S	79,2	1,82	2,24
17_S	32,6	2,06	1,72
18_N	20,6	1,78	1,24
19_N	120	1,84	2,16
20_N	66,4	1,85	1,83
21_N	18,1	1,89	0,90
22_N	50,0	1,88	1,44
23_S	39,4	1,82	1,52
24_N	27,0	1,91	1,07
25_S	76,2	1,81	1,89
26_N	42,6	1,81	1,35
27_N	181,6	1,87	2,44
28_N	37,0	1,92	2,09
29_S	198	1,85	2,48
30_S	18,0	1,88	0,44
31_S	125,7	1,83	1,57
32_N	195,1	1,83	1,81

R: Recidiva; N: Não-recidiva.

Anexo C - Figura suplementar 1

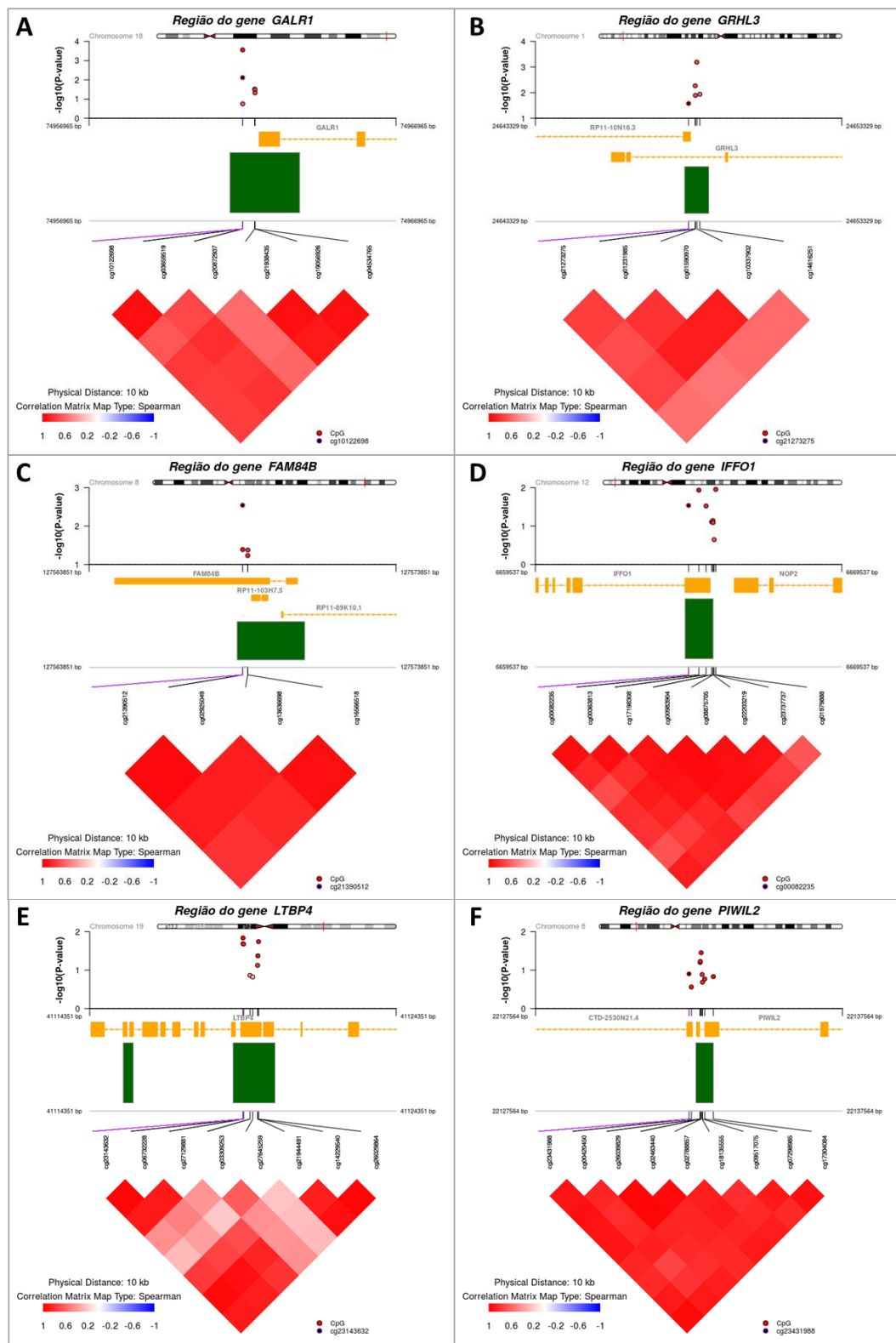
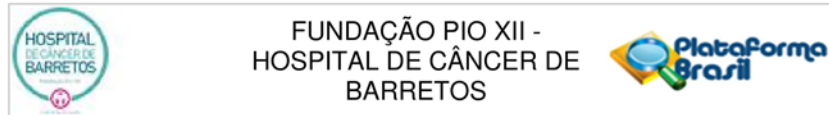


Figura suplementar 1 - Gráficos de co-metilação mostrando os CpGs diferencialmente metilados nas RDMs dos genes: A, *GALR1*; B, *GRHL3*; C, *FAM84B*; D, *IFFO1*; E, *LTBP4*; F, *PIWIL2*, visualizados com base em suas coordenadas cromossômicas e posição relativa para ilha CpG (barra verde). O gráfico de correlação mostra os valores de correlação de Spearman entre os CpGs na região.

Anexo D - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do perfil de metilação de promotores gênicos em margens cirúrgicas de pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral

Pesquisador: Lídia Maria Rebolho Batista Arantes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 54432416.3.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.596.012

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital do Câncer de Barretos de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional N° 001/2013 do CNS, e após a análise das respostas as pendências emitidas, manifesta-se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 17 de Junho de 2016

Assinado por:
Thiago Buosi Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br