

Cristiane Pereira Vargas Cousseau

**ANÁLISE DE miRNAs COMO BIOMARCADORES PREDITORES DE METÁSTASE LINFONODAL
EM PACIENTES COM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE 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: Promoção da Saúde
Oncologia

Orientadora: Prof. Dra. Lidia Maria Batista
Rebolho Arantes

Coorientador: Prof. Dr. André Lopes Carvalho

Barretos, SP

2019

C868a Cousseau, Cristiane Pereira Vargas.

Análise de microRNAs como biomarcadores preditores de metástase linfonodal em pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral. / Cristiane Pereira Vargas Cousseau. - Barretos, SP - 2019.

84 f. : il.

Orientadora: Lidia Maria Batista Rebolho Arantes.

Coorientador: André Lopes Carvalho.

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

1. Biomarcadores. 2. Metástase linfonodal. 3. Carcinoma epidermóide de cavidade oral. 4. microRNA. 5. Biomarcadores preditores. 6. OSCC. I. Autor. II. Arantes, Lidia Maria Batista Rebolho. III. Carvalho, André Lopes. IV. Título.

CDD 616.07

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital do 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 do 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 do Câncer de Barretos.

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

*Dedico este trabalho à minha família,
em especial aos meus pais: Carlos, Neuza e Frank.*

Sem vocês nada disso seria possível.

Vocês são a luz da minha vida!

“O resultado do que fazemos nos espera mais adiante.”

Allan Kardec

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao universo por todos os caminhos que me trouxeram até Barretos, essa história começou em 2014 e muita coisa aconteceu desde então, agradeço a todos os percalços vividos, pois me fizeram a pessoa que sou hoje, e me trouxeram milhares de aprendizados.

Sou imensamente grata à minha família, aos meus pais: Neuza Pereira Vargas, Carlos Theodoro Cousseau e Bartos Frank Filippin, por sempre terem me apoiado nesta caminhada que não foi fácil e nem foi curta. Sem vocês eu não seria metade da pessoa que eu sou e não teria chegado nem na metade do caminho que cheguei. Eu amo vocês mais que tudo na minha vida, vocês são os maiores e os melhores exemplos que eu poderia ter. Aos meus irmãos: Leonardo, Leticia, Laura e Joyce por serem tesouros maravilhosos na minha vida, por me amarem, me apoiarem e entenderem o motivo de eu estar longe. Aos meus avós: Iva e Isair por me amarem e me apoiarem sempre, vocês são pessoas exemplares que eu amo muito. Ao nono José e a nona Ivete por todo carinho sempre. Aos titios Ana Paula, Junior, Adriano, Agnes, Tiago e Ana Patrícia e aos primos Ana Julia, Lavínia, José por tornarem os meus momentos de férias em família incríveis.

Agradeço aos meus orientadores Dra. Lidia Rebolho Arantes e Dr. André Lopes Carvalho, pela confiança em mim depositada para realizar este trabalho, por terem me apoiado ao longo desta caminhada e contribuído imensamente para minha formação pessoal e profissional, pela disponibilidade e acessibilidade. Vocês são pessoas incríveis e profissionais exemplares. A caminhada está chegando ao fim mas sempre levarei comigo um pouquinho de vocês através dos exemplos repassados.

Agradeço ao grupo de pesquisa em Câncer de Cabeça e Pescoço, por toda contribuição em todas as minhas apresentações, pelas tardes de segundas-feiras que sempre agregaram muito em minha formação. Em especial ao Dr. Renato Capuzzo e ao Dr. Ricardo Gama por toda paciência toda vez que eu necessitava tirar dúvidas sobre a parte clínica que engloba meu trabalho, pelos procedimentos cirúrgicos que pude acompanhar e me fizeram entender melhor todo este universo da pesquisa translacional. À Dra. Ana Carolina de Carvalho, por toda paciência em me auxiliar nas análises e em dúvidas que ocorreram durante o

desenvolvimento e escrita do trabalho. As colegas Laís e Bruna por todos os momentos compartilhados e os auxílios prestados.

Agradeço a Dra. Ana Carolina Laus, por todo auxílio durante o desenvolvimento dos experimentos práticos, as explicações e a paciência.

Agradeço à Dra. Luciane Sussuchi, por todo auxílio para entender esse universo complicado das análises bioinformáticas, e também por toda paciência.

Agradeço ao departamento de patologia, Pati, Bia, Alexandra e em especial ao Dr. Nei Menezes, vocês foram muito importantes para a conclusão deste trabalho.

Ao Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME), por todo apoio durante o momento de coleta de dados de prontuários.

À Coordenação de Pós-graduação do Hospital do Câncer de Barretos, Mariana, Dely, Cintia, Dr. Carlos Paiva e Dra. Edenir Palmero, por todo apoio, contribuição e empatia durante estes dois anos de mestrado.

À Dra. Bianca Paiva, por despertar em mim o olhar para esta área apaixonante que é a Qualidade de Vida, e por tudo que agregou em minha caminhada pessoal e também profissional.

Ao NEC, Gerson, Carla Oliveira, Carla Camargo, Sara, Ester, Keneder. Vocês foram essenciais para minha formação, e eu amei fazer parte de todos os projetos, que venham muitos mais.

Agradeço ao Caio e ao Clóvis, pelas oportunidades e por toda a parceria, pessoal e profissional, vocês são um pedacinho da minha família barretense, com certeza!

Aos amigos do CPOM Isa, Karina, Tais por todas as conversas regadas a café, foram momentos importantes e muito especiais.

Ao meu amigo Raphael pela parceria sempre, tanto para as horas boas quanto para as ruins, por todas as vezes que teve paciência de me ouvir 'chorando as pitangas', por todas as piadas sem graça que a gente faz e morre de rir, por todos os almoços de domingo, e por ter me apresentado a Talita (melhor coisa que tu já fizeste na vida). Tah, obrigada por todos os momentos maravilhosos, animados, pelos conselhos, e por me ouvir sempre. Vocês já são um pedacinho da minha família aqui em Barretos. Valeu BFFs.

Às 'TOPS', Gabi, Talita (de novo), Gi e Hevlylyn, por todos os momentos de descontração que me ajudaram a não surtar na fase final do mestrado, que venham muitos momentos mais.

Agradeço a minha banca de acompanhamento, Dra. Miriam Jasiulionis e Dra. Márcia Silveira, por toda a contribuição para o desenvolvimento e escrita do trabalho e também para minha formação ao longo destes 2 anos, foi muito enriquecedor.

Agradeço à CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se concretizasse.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço	1
1.2	Metástases cervicais	6
1.3	Sistema linfático e linfonodos	7
1.4	Biomarcadores	8
1.5	miRNAs: biogênese e função	9
2	JUSTIFICATIVA	14
3	OBJETIVOS	15
3.1	Objetivo Geral	15
3.2	Objetivos Específicos	15
4	MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1	Delineamento do estudo	16
4.2	Delineamento Experimental	16
4.3	Delineamento clínico	17
4.4	Aspectos éticos	17
4.5	População de estudo	18
4.6	Análise histopatológica e obtenção do material para análise molecular	19
4.7	Análise molecular	19
4.7.1	<i>Screening</i>	20
4.7.1.1	Extração de RNA	20
4.7.1.2	nanoString	20
4.7.1.3	Análise dos dados de expressão dos miRNAs	21
4.7.2	Validação	22

4.7.2.1 Extração de RNA	22
4.7.2.2 Síntese de cDNA	23
4.7.2.3 <i>Polimerase Chain Reaction Quantitative Real Time - qPCR</i>	23
4.8 Análises Estatísticas	24
4.8.1 <i>Screening</i> – nanoString	24
4.8.2 Validação – qPCR	25
4.9 Validação da expressão dos miRNAs no “The Cancer Genome Atlas” (TCGA)	26
5 RESULTADOS	27
5.1 Seleção dos casos	27
5.2 <i>Screening</i>	27
5.2.1 Características clínico-patológicas	27
5.2.2 Análises de controle de qualidade e normalização dos dados de perfil de expressão de miRNAs	28
5.3 Validação	34
5.3.1 Características clínico-patológicas	34
5.3.2 Análise do perfil de expressão dos quatro miRNAs selecionados em amostras tumorais metastáticas e não metastáticas	35
5.4 Associação das variáveis clínicas, histopatológicas e terapêuticas com os resultados obtidos através das análises moleculares do miR-99a-5p na coorte de validação	37
5.5 Validação <i>in silico</i> da expressão dos miRNAs selecionados no TCGA	39
6. DISCUSSÃO	42
7 CONCLUSÃO	45
8 REFERÊNCIAS	46
ANEXOS	57

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Sobrevida global e livre de doença em pacientes que realizaram Esvaziamento Cervical Eletivo e Esvaziamento Cervical Terapêutico. (A) Sobrevida global e a razão de risco correspondente no grupo de cirurgia eletiva e no grupo de cirurgia terapêutica. (B) Sobrevida livre de doença e a razão de risco correspondente.
- Figura 2** Diretrizes de prática clínica para pacientes com câncer de cavidade oral clinicamente livres de metástase linfonodal.
- Figura 3** Vias de biogênese de miRNAs. Via não canônica e via canônica.
- Figura 4** Ação do miRNA através do complexo RISC.
- Figura 5** Fluxograma do estudo.
- Figura 6** Delineamento clínico do estudo.
- Figura 7** Boxplots pré-normalização. (A) Boxplot com os dados brutos de contagem dos miRNAs, com a amostra P12. (B) Boxplot com os dados brutos de contagem dos miRNAs, após a exclusão da amostra P12 das análises.
- Figura 8** Curvas relacionando a densidade e contagens dos microRNAs por amostra. (A) Com a amostra P12. (B) Sem a amostra P12.
- Figura 9** Boxplots referentes a normalização dos dados de contagem de miRNAs em amostras de CECO (T1/T2 cN/cN+) com o método

Quantile. (A) Endógenos após da normalização. (B) Endógenos antes da normalização.

- Figura 10** miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com CECO em estadiamento T1/T2 livres de metástase linfonodal *versus* pacientes com metástase linfonodal.
- Figura 11** Distribuição da expressão relativa dos miRNAs hsa-miR-1249-3p (A) e hsa-miR-99a-5p (B) em amostras tumorais com metástase linfonodal (N+) e sem metástase linfonodal (N0). No eixo Y está representada a expressão relativa em *fold-change* ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).
- Figura 12** Curvas ROC obtidas para os miRNAs has-miR-1249-3p (A) e has-miR-99a-5p (B).
- Figura 13** Dotplots gerados a partir dos dados de expressão dos miRNAs hsa-mir-3202 e hsa-miR-548ad-3p em coortes de CECP e CECO contidas no TCGA. **(A)** Expressão do hsa-miR-3202 em CECO. **(B)** Expressão do hsa-miR-3202 em CECP. **(C)** Expressão do hsa-miR-548ad-3p em CECO. **(D)** Expressão do hsa-miR-548ad-3p em CECP.
- Figura 14** Dotplots gerados a partir dos dados de expressão dos miRNAs hsa-mir-99a-5p e hsa-miR-1249-3p em coortes de CECP e CECO contidas no TCGA. **(A)** Expressão do hsa-miR-99a-5p em CECO. **(B)** Expressão do hsa-miR-99a-5p em CECP. **(C)** Expressão do hsa-miR-1249-3p em CECO. **(D)** Expressão do hsa-miR-1249-3p em CECP.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Avaliação clínica da morbidade pós-operatória.
- Tabela 2** Tabela utilizada para os cálculos de sensibilidade, especificidade e acurácia.
- Tabela 3** Características clínico-patológicas dos 24 pacientes incluídos na fase de *screening*.
- Tabela 4** Valores de p e AUC dos biomarcadores avaliados em amostras de pacientes com CECO em estadiamento clínico inicial (T1/T2) livres de metástase versus com metástase linfonodal.
- Tabela 5** Características clínico-patológicas dos 42 pacientes incluídos na fase de validação.
- Tabela 6** Resultados da análise univariada das características clínicas, patológicas e expressão do miR99a-5p dos 42 pacientes incluídos na fase de validação.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGO	Proteínas agonautas
AUC	<i>Area Under the Curve</i>
APC	Célula apresentadora de antígeno
ATP	Adenosina trifosfato
CECO	Carcinoma Epidermóide de Cavidade Oral
CECP	Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CID	Código Internacional de Doenças
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CCP	Câncer de Cabeça e Pescoço
cDNA	<i>Complementary DNA</i>
CPOM	Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular
CV	Coefficiente de Variação
cm	Centímetro
cN0	Clinicamente livres de metástase linfonodal
cN+	Com metástase linfonodal
DGCR8	Proteína de ligação ao RNA
DNA	Ácido desoxirribunucleico
dsRNA	RNA dupla fita
ECE	Esvaziamento Cervical Eletivo
ECT	Esvaziamento Cervical Terapêutico
FC	<i>Fold-change</i>

FFPE	<i>Formalin-Fixed Paraffin-Embedded</i>
HCB	Hospital do Câncer de Barretos
H&E	Coloração de Hematoxilina e Eosina
log	Logaritmo
miRNA	microRNAs
mRNA	RNA mensageiro
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NDII	<i>Neck Dissection Impairment Index</i>
ng	Nanogramas
OMS	Organização Mundial da Saúde
piwiRNA	Piwi-interactin RNAs
Pol II	Polimerase II
PLS	Pesquisa do Linfonodo Sentinela
pNO	Patologicamente livre de metástase linfonodal
pri-miRNA	microRNA primário
qPCR	<i>Polymerase chain reaction quantitative real time</i>
QT	Quimioterapia
RAN-GTP	Proteínas envolvidas o transporte de moléculas do núcleo para o citoplasma
RCC	<i>Reporter Code Count</i>
RISC	<i>RNA Induced Scilencing Complex</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
RNA	Ácido Ribonucleico

RT	Radioterapia
siRNA	RNAs de interferência
sf	<i>Scaling fator</i>
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
ssRNA	RNA simples fita
TNM	Tumor/Linfonodo/Metástase
T1/T2	Tumores em estadios iniciais
T3/T4	Tumores em estadios avançados
VPN	Valor Preditivo Negativo
VPP	Valor Preditivo Positivo
XPO5	Exportina 5
.xlsx	<i>Extensible Style Language</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
+	Positivo
-	Negativo
<	Menor que
>	Maior que
μL	Microlitro

RESUMO

Cousseau, Cristiane P. V. *Análise de microRNAs como biomarcadores preditores de metástase linfonodal em pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral*. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital do Câncer de Barretos; 2019.

JUSTIFICATIVA: O Câncer de Cabeça e Pescoço é o oitavo tipo mais comum no mundo, e engloba tumores de cavidade oral, faringe e laringe, tendo uma incidência mundial anual de 830.000 casos novos e 430.000 mortes. Dentre os tumores de cabeça e pescoço, o mais incidente é o Carcinoma Epidermóide de Cavidade Oral (CECO), relacionado com mais de 90% dos casos e foco deste estudo. Para este tipo tumoral, a presença de doença metastática nos linfonodos, além de ser um importante indicador de prognóstico, influencia a escolha do tratamento inicial e da terapia adjuvante dos pacientes. Porém muitos pacientes submetidos ao estadiamento cirúrgico dos linfonodos do pescoço (esvaziamento cervical ou linfonodo sentinela), após a análise patológica, tem um resultado negativo para metástases linfonodais.

OBJETIVO: Identificar microRNAs (miRNAs) diferencialmente expressos em amostras tumorais de pacientes com CECO clinicamente livres de metástase (cN0) capazes de distinguir pacientes com linfonodos patologicamente positivos (pN+) dos patologicamente negativos (pN0).

MATERIAIS E MÉTODOS: O nível de expressão de 800 miRNAs foi avaliado em 12 amostras cN+ e 12 tumores cN0 de pacientes com CECO, utilizando a tecnologia nanoString. Posteriormente, a expressão diferencial dos mesmos foi validada em um grupo independente de 15 amostras cN+ e 25 amostras cN0, através da técnica de qPCR. A análise de expressão diferencial da fase de *screening* foi realizada utilizando a ferramenta Galaxy e o SPSS 23.0, levando em consideração $p < 0,05$, fold-change $> 1,5$ e AUC $> 0,7$. Para a validação, os cálculos de expressão diferencial foram realizados utilizando-se as médias dos valores de Cts dos miRNAs e a média do valor de Ct do *small nuclear RNA U6* utilizado como controle endógeno, considerando um *cutoff* maior ou menor 2,01, para considerar o miRNA hipoexpresso ou hiperexpresso. **RESULTADOS:** Quatro miRNAs diferencialmente expressos foram identificados: hsa-miR-1249-3p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-3202 e hsa-miR-548ad-3p, sendo os dois primeiros mais expressos no grupo pN0 e os dois últimos mais expressos no grupo pN+. O nível de expressão destes miRNAs foi validado em uma casuística maior e o hsa-miR-99a-5p

apresentou uma expressão diferencial entre os dois grupos avaliados. **CONCLUSÃO:** Este estudo mostrou que o microRNA hsa-miR-99a-5p foi eficiente em detectar pacientes que são negativos para metástase linfonodal em amostras de tumores primários de CECO, sugerindo que a sua utilização conjuntamente com as técnicas convencionais empregadas atualmente, constitui uma ferramenta útil que pode auxiliar os médicos nas decisões de esvaziamento cervical dos pacientes em questão.

Palavras-chave: Biomarcadores, Metástase Linfonodal, Carcinoma Epidermóide de Cavidade Oral, microRNA

ABSTRACT

Cousseau, Cristiane P. V. *miRNAs as biomarker to predict lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma patients*. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Hospital do Câncer de Barretos; 2019.

BACKGROUND: Head and Neck Cancer is the eight most common cancer worldwide, affecting the oral cavity, pharynx and larynx, with an incidence of 830,000 new cases and 430,000 deaths per year. Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) constitutes the largest group in head and neck tumors, is related to over 90% of the cases and is the primary tumor in this study. To this tumor type, besides being an important prognostic indicator, the presence of metastatic disease in lymph nodes also influences the choice of the therapy. Although many patients submitted to the surgical staging of the neck lymph nodes (neck dissection or sentinel lymph node), after pathological analysis, they have a negative result for lymph node metastasis. **AIM:** Identify differentially expressed microRNAs (miRNAs) in tumor samples from OSCC patients without clinical evidence of metastases in cervical lymph nodes (cN0) capable of distinguishing cases with pathologically positive (pN+) from pathologically negative lymph nodes (pN0). **MATERIALS AND METHODS:** The expression level of 800 miRNAs was evaluated in 12 OSCC cN+ tumors and 12 OSCC cN0, using nanoString platform. Subsequently, the differentially expressed microRNAs were evaluated in an independent cohort of 15 cN+ samples and 25 cN0 samples, using real time PCR technique. Differential expression analysis of the screening phase was performed using the Galaxy tool and SPSS 23.0, taking into consideration $p < 0.05$, fold-change > 1.5 and AUC > 0.7 . For validation, differential expression calculations were performed using the average Cts values of the miRNAs and the average Ct value of the small nuclear RNA U6 used as an endogenous control, with a cutoff of greater or less than 2.01, to consider the miRNA hypoexpressed or hyperexpressed. **RESULTS:** Four differentially expressed miRNAs were identified: hsa-miR-1249-3p, hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-3202 and hsa-miR-548ad-3p, with the first two being highly expressed in pN0 group and the last two being lower expressed in pN+ group. The expression level of these miRNAs was validated in a larger sample and miRNA hsa-miR-99a-5p presented a differential expression between the evaluated groups. **CONCLUSION:** This study showed that hsa-miR-99a-5p miRNA was efficient in detecting patients who are negative for lymph node metastasis in primary OSCC tumor samples,

suggesting that its use in combination with conventional techniques currently employed is an useful tool that may assist physicians in the neck dissection decisions.

Key Words: Biomarkers, lymph node metastasis, oral squamous cell carcinoma, microRNA

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço

O Câncer de Cabeça e Pescoço (CCP) é o oitavo tipo de câncer mais comum no mundo, e engloba tumores de cavidade oral, faringe e laringe, tendo uma incidência mundial anual de 834.860 casos novos e 431.131 mortes¹.

Este trabalho abordará exclusivamente os tumores da cavidade oral, que é formada por diversos tipos teciduais, o que abre a possibilidade para o desenvolvimento de diferentes tipos tumorais. O enfoque será no Carcinoma Epidermóide de Cavidade Oral (CECO), que constitui o maior grupo dos tumores de cabeça e pescoço, sendo responsável por mais de 90% dos casos², e sua incidência mundial é estimada em 300.000 casos novos a cada ano¹. No Brasil, o número de casos novos de câncer de cavidade oral estimados para os o biênio 2018/2019 é de 11.200 para os homens e 3.500 para as mulheres³.

Um estudo retrospectivo (2008-2012) mostra que este tipo tumoral acomete em sua maioria indivíduos do sexo masculino (69%) e com faixa etária superior aos 50 anos (87,71%)⁴. Também foi observado que o consumo de tabaco e álcool são os fatores de risco independentes que mais tem relação com o aumento do risco CCP, e além disso, também apresentam uma relação sinérgica, o que pode aumentar o risco e explicar cerca de 75 a 85% de todos os casos^{5, 6}.

A carcinogênese oral é um processo que envolve várias etapas, seu desenvolvimento pode ocorrer a partir de mucosas normais ou lesões pré-neoplásicas. Independente do tipo tecidual envolvido, esse processo se inicia com o desequilíbrio de algumas atividades celulares, desequilíbrios estes que pode ocorrer através da ação de agentes carcinogênicos, que com uma ação conjunta afetam processos como crescimento, proliferação e morte celular, fazendo com que as células normais se transformem em células tumorais, alterando assim seu ritmo de crescimento e metabolismo^{7, 8}.

O tratamento e a sobrevida dos pacientes com CECO dependem em grande parte do estadiamento do tumor primário (TNM: Tumor/Linfonodo/Metástase). Quando o diagnóstico acontece em um período tardio, o tratamento é bem debilitante e muitas vezes a doença pode ser fatal, enquanto que o diagnóstico em estadios iniciais tem um prognóstico mais favorável e um tratamento menos agressivo⁹. A sobrevida global em 5 anos não chega a 60% enquanto para tumores em estadios iniciais (T1/T2) é de aproximadamente 80%¹⁰⁻¹³. Porém, um pior

prognóstico é esperado em pacientes com metástase linfonodal¹⁴, o que é agravado com a presença de extravasamento capsular¹⁵. A incidência de metástases ocultas nos linfonodos em tumores em estadios iniciais (T1/T2) está entre 27 a 40%¹⁶⁻¹⁸ e pode chegar a 30% nos pacientes que realizam biópsia de linfonodo sentinela e foram previamente estadiados como clinicamente livres (cNO)^{11, 19}. Além de ser um importante indicador de prognóstico, a presença de doença metastática nos linfonodos também influencia a escolha do tratamento inicial e a terapia adjuvante para diminuir a taxa de recorrência da doença²⁰⁻²².

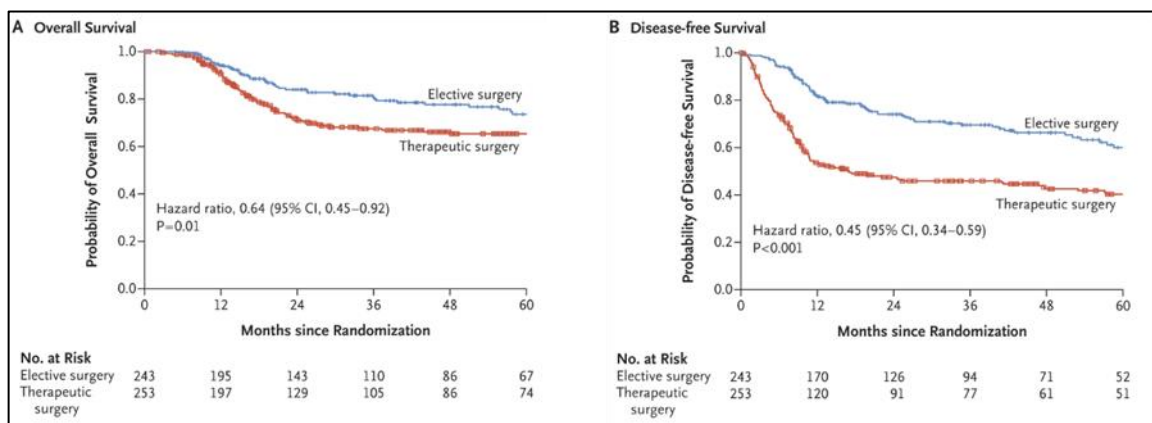
A abordagem terapêutica para pacientes diagnosticados clinicamente com metástase linfonodal (cN+) já possui uma estratégia bem definida e aceita, que inclui esvaziamento cervical terapêutico, seguida de radioterapia pós-operatória, com ou sem quimioterapia concomitante. No entanto, a escolha de tratamento para pacientes sem evidências clínicas de metástases cervicais permaneceu controversa durante muito tempo e atualmente ainda não há uma técnica pouco invasiva e muito eficiente para tal diagnóstico^{23, 24}. Antigamente as abordagens utilizadas eram: “*wait-and-see*” (o que posteriormente poderia levar ao esvaziamento cervical terapêutico) ou o esvaziamento cervical eletivo (profilático). Tumores iniciais são altamente curáveis somente com cirurgia e radioterapia e por esta razão a abordagem “*wait-and-see*” foi bem aceita durante muito tempo, onde o pescoço não era tratado e os pacientes eram monitorados com atenção especial para o desenvolvimento de metástases cervicais. Entretanto, estudos recentes mostram que 30 a 60% destes casos com tumores iniciais podem apresentar metástase cervical, o que aumenta o risco de progressão para uma doença incurável^{25, 26}.

O esvaziamento cervical eletivo é uma abordagem na qual pacientes clinicamente livres de metástases linfonodais são submetidos à remoção de linfonodos cervicais nos níveis I, II e III. Uma limitação para a correta avaliação de metástases linfonodais cervicais em pacientes com CECO submetidos à linfadenectomia cervical eletiva é a falta de sensibilidade da avaliação histopatológica pós-operatória, dos linfonodos ressecados através da análise de cortes de tecido incluído em parafina corados com hematoxilina e eosina (H&E), especialmente em relação à identificação de micrometástases.

Dados publicados em 2015, em um estudo tido como referência nos dias de hoje, mostraram que o esvaziamento cervical eletivo pode mostrar melhores resultado do que o “*wait-and-see*” em tumores cNO²⁷. Os pacientes que permanecem nesta abordagem, muitas

vezes, entre uma consulta de acompanhamento e outra, podem ter uma piora considerável (30 a 60% podem desenvolver metástases linfonodais), e isso levará ao esvaziamento cervical terapêutico, que é feito quando se sabe, através de exame clínico e de imagem, que há presença de linfonodos positivos.

Em seu estudo, D’Cruz e colaboradores²⁸ fizeram uma comparação entre o esvaziamento cervical eletivo (ECE) e o esvaziamento cervical terapêutico (ECT), que era utilizado caso o pescoço dos pacientes da abordagem ‘*wait-and-see*’ se tornasse positivo. No estudo foram incluídos 245 pacientes em cada um dos grupos de tratamentos, e os mesmos foram acompanhados durante 39 meses. Os resultados mostraram que, dos pacientes que realizaram ECT, 146 apresentaram recorrência e houveram 79 óbitos. E dos que realizaram ECE, apenas 81 tiveram recorrência e foram registrados 50 óbitos. Além disso, a sobrevida global (67,5% ECT e 80% ECE) e livre de doença (45,9% ECT e 69,5% ECE) é menor do grupo que realizou ECT (Figura 1).



Fonte: D’Cruz et al., 2015²⁸

Figura 1: Sobrevida global e livre de doença em pacientes que realizaram Esvaziamento Cervical Eletivo e Esvaziamento Cervical Terapêutico. (A) Sobrevida global e a razão de risco correspondente no grupo de cirurgia eletiva e no grupo de cirurgia terapêutica. (B) Sobrevida livre de doença e a razão de risco correspondente.

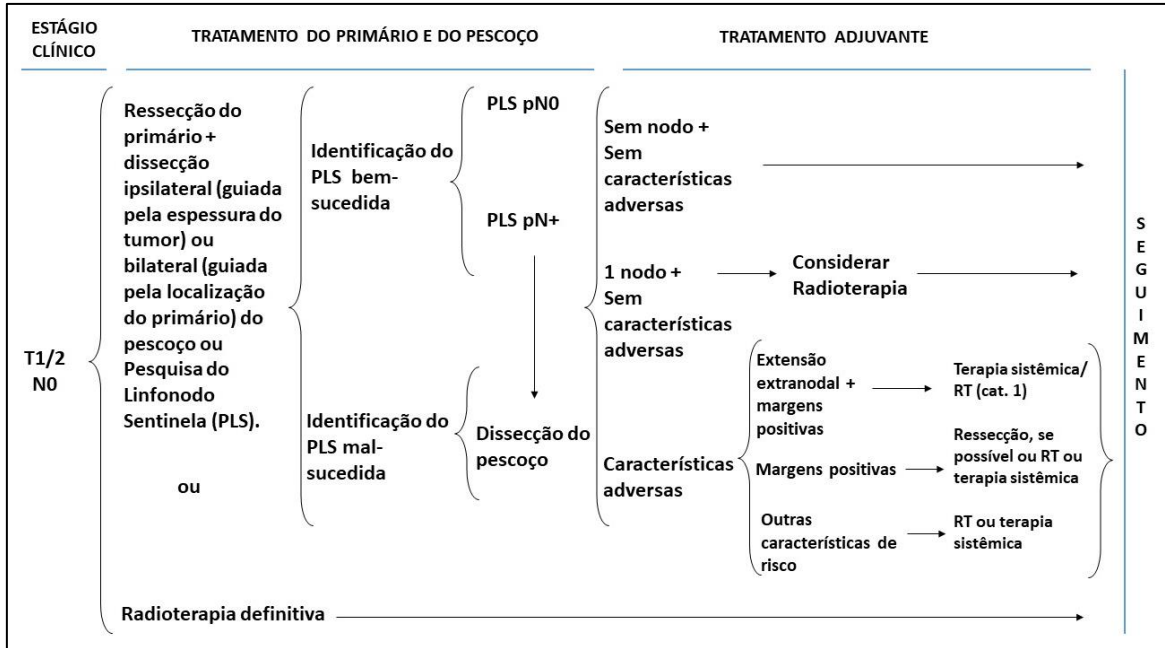
Contudo, outra técnica para diagnóstico de metástases cervicais veio ganhando espaço, a Pesquisa do Linfonodo Sentinela (PLS). Que é baseada no pressuposto da existência de um padrão de drenagem linfática para um grupo de linfonodos regionais, ou somente um

linfonodo, que será o primeiro a receber as células tumorais, que é denominado linfonodo sentinela^{29, 30}.

Neste contexto, o uso da técnica de linfonodo sentinela tem sido promissor, uma vez que ele avalia um número menor de linfonodos e os submete ao estudo imuno-histoquímico aumentando a acurácia na identificação de micrometástases³¹. Isso mantém a segurança de controle destes linfonodos²⁹⁻³¹, diminuindo a morbidade quando comparada ao esvaziamento cervical eletivo³².

Atualmente, o estadiamento cirúrgico dos linfonodos do pescoço clinicamente N0 (cN0) pode ser feito tanto com a linfadenectomia supraomohioidea como com a pesquisa do linfonodo sentinela, ambas apresentando resultados oncológicos semelhantes^{32, 33}. Quando, após a técnica do linfonodo sentinela o pescoço é estadiado como positivo, os pacientes são adequadamente encaminhados para linfadenectomia supraomohioidea.

As diretrizes de prática clínica da NCCN (do inglês: *National Comprehensive Cancer Network*)³⁴ publicadas em 2018 para câncer de cavidade oral, estão demonstradas na figura 2, onde é possível notar que as opções terapêuticas para os linfonodos do pescoço de pacientes cT1/T2 cN0 M0, são a dissecação destes linfonodos (esvaziamento cervical eletivo) ou a pesquisa do linfonodo sentinela (PLS). Tanto o esvaziamento cervical quanto a PLS, apresentam resultados oncológicos semelhantes³², sendo o esvaziamento cervical muito mais invasivo e com maior morbidade dos pacientes.



Fonte: Adaptado de *National Comprehensive Cancer Network*³⁴

Figura 2: Diretrizes de prática clínica para pacientes com câncer de cavidade oral clinicamente livres de metástase linfonodal.

Um estudo prospectivo tido como referência, comparou as morbidades e complicações pós-operatórias de pacientes submetidos a PLS e ao esvaziamento cervical eletivo, através de dados obtidos pelo NDII (do inglês: *Neck Dissection Impairment Index*), um questionário que avalia o índice de deficiência da dissecação do pesçoço, e de um exame físico do ombro, a avaliação do ombro de Constant. Os resultados obtidos mostraram que o esvaziamento cervical eletivo proporciona mais morbidades e complicações pós-operatórias do que a PLS (Tabela 1). Além de demonstrar uma diferença significativa entre o comprimento da cicatriz deixada por ambos os procedimentos³².

Tabela 1. Avaliação clínica da morbidade pós-operatória.

Item avaliado	Nº de pacientes		<i>p</i> -valor
	PLS	ECE	
Comprimento da cicatriz – cm	4,8	9,2	< 0,0001
Força	Número de pacientes		
Normal	33	25	
Moderadamente prejudicada	0	2	
Gravemente prejudicada	0	2	
Complicações pós-operatórias totais	0	15	< 0,0001
Sangramento (revisão na sala de cirurgia)	0	5	
Lesão do ramo mandibular marginal do nervo facial	0	7	
Traqueotomia	0	1	
Lesão do nervo lingual	0	1	
Infecção da lesão	0	1	

Fonte: Adaptado de Murer et al., 2010³²

Abreviações: PLS, Pesquisa de Linfonodo Sentinela; ECE, Esvaziamento Cervical Eletivo

Além da PLS apresentar uma menor morbidade e complicações pós-operatórias, esta abordagem é de alta viabilidade técnica e de precisão^{30, 35-39}, podendo ter um valor preditivo negativo (VPN) de até 96% em pacientes com câncer de cavidade oral em estadios iniciais (T1/T2)³⁰, fazendo com que seja uma boa alternativa ao ECE. O problema é que muitos pacientes ainda são estadiados como pN0 após a realização da PLS.

1.2 Metástases cervicais

O processo metastático é complexo e dispõe de muitas etapas, as quais envolvem a disseminação de células cancerosas primárias para órgãos distantes. Este processo é muitas vezes precedido por alterações no microambiente do nicho metastático. O *crosstalk* entre a

célula tumoral (semente) e o microambiente (solo) foi observado e descrito por Paget em 1889, e ficou conhecido como hipótese '*Seed and Soil*'^{33, 40, 41}.

A disseminação das células cancerosas para outros tecidos pode ocorrer de duas maneiras: através da corrente sanguínea ou dos vasos linfáticos. A metástase linfática não é um processo completamente passivo, é regulado em múltiplas etapas, incluindo o trânsito de células tumorais através dos vasos linfáticos e a 'semeadura' bem-sucedida na drenagem de gânglios linfáticos⁴².

A disseminação metastática dos tumores de cabeça e pescoço usualmente ocorre através do sistema linfático, sendo os linfonodos dos níveis I e II os mais envolvidos. A rota linfática é particularmente relevante para estes tumores, com os linfonodos regionais geralmente sendo os primeiros órgãos a desenvolverem metástases, servindo como uma ponte de disseminação para outros sítios^{43, 44}.

1.3 Sistema linfático e linfonodos

O sistema linfático é um sistema circulatório que transporta linfa pelo nosso organismo, através de vasos específicos. A anatomia microvascular e a hemodinâmica dos linfonodos foram caracterizadas em linfonodos inguinais de ratos⁴⁵. Esta vasculatura está espalhada por todo corpo. A pele, os epitélios e os órgãos contêm numerosos capilares linfáticos que absorvem e drenam o líquido dos espaços entre as células, que é chamado de linfa. Existem os vasos aferentes, que transportam a linfa para dentro dos linfonodos e os vasos eferentes, que a transportam a partir dos linfonodos. A linfa desempenha papéis importantes na homeostase dos tecidos, equilíbrio de fluidos, função imune e transporte de lipídios^{42, 43, 45}.

Os linfonodos, ou gânglios linfáticos, são pequenos órgãos com uma importante função no sistema imunológico. Pode-se dizer que são estações de coleta para antígenos estrategicamente posicionados no organismo, que estão presentes em tecidos periféricos de mamíferos e outros vertebrados. Os antígenos, sejam eles microrganismos, partículas virais ou qualquer outro, podem entrar no organismo por diversas vias: oral, respiratória, gastrintestinal, entre outras. O epitélio que reveste estes tecidos serve de porta de entrada para os antígenos, que são drenados pelos vasos linfáticos, e possuem células especializadas

que capturam estes antígenos e viajam por estes vasos até chegar aos linfonodos. Estes linfonodos estão interpostos ao longo dos vasos linfáticos e tem por função filtrar a linfa antes de chegar ao sangue. Após esta filtragem, entram em ação as células apresentadoras de antígenos (APC), que vão 'apresentar' este antígeno às células T *naive*, que são um tipo de linfócito, a fim de iniciar uma resposta imune adquirida. Os linfócitos buscam seus antígenos cognatos durante visitas constantes a estas bibliotecas de antígenos locais (linfonodos). No caminho, interagem com outras células, desencadeando uma resposta imune, que representa a defesa produzida pelo organismo contra algum corpo estranho específico⁴⁶⁻⁴⁸.

Essa resposta imune efetiva é desencadeada por células chamadas efetoras, que tem um papel crucial no reconhecimento e produção de anticorpos contra os antígenos. Após o antígeno ser eliminado do organismo, a maioria dessas células efetoras morre, porém uma pequena fração permanece como células de memória de longa duração. Quando o organismo entrar em contato novamente com estes mesmos antígenos, a receita para produzir os respectivos anticorpos já estará armazenada nestas células, que em sua maioria residem nos linfonodos, possibilitando uma forte resposta de *recall* sempre que o antígeno retornar^{42, 48}.

Dado a esta importante função dos linfonodos durante a ação do sistema linfático no organismo, é possível notar a importância dos mesmos para o bom funcionamento do corpo. Quando os pacientes são submetidos a retirada dessas estruturas, certamente esta ação imunitária ficará em parte comprometida, o que pode aumentar o risco de morbidades aos pacientes em questão.

1.4 Biomarcadores

Na literatura, alguns marcadores de anatomia patológica são de longa data conhecidos (infiltração perineural, embolização angio-lymfática, modo de invasão do tumor e mensuração de invasão em profundidade) como preditores de metástase linfonodal cervical, cujas sensibilidade, especificidade e acuracidade não são suficientes para poupar os pacientes do estadiamento cirúrgico dos linfonodos do pescoço⁴⁹⁻⁵¹. Em consequência, a pesquisa de biomarcadores moleculares parece promissora.

Biomarcadores são definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS), como: “qualquer substância, estrutura ou processo que possa ser medido no corpo ou em seus produtos e influencie ou preveja a incidência de desfecho ou doença”⁵².

Muitos estudos avaliam características do tumor primário, capazes de ajudar na predição de metástases linfonodais ocultas em CECO, que podem servir como biomarcadores, como por exemplo: pior padrão de invasão⁵³; assinaturas de expressão gênica^{54, 55}; profundidade tumoral^{15, 56-58}. Porém muitos destes estudos não são implementados na rotina da prática clínica por possuírem baixo custo-benefício⁵⁹ ou falta de validação suficiente^{54, 55}.

Os microRNAs (miRNAs) tem sido muito estudados atualmente com evidências da sua participação, além de processos biológicos normais, em algumas doenças, incluindo o câncer⁶⁰⁻⁶². Eles reduzem a estabilidade dos mRNAs, incluindo genes que participam de processos importantes na tumorigênese, como inflamação, regulação do ciclo celular, resposta ao estresse, diferenciação, apoptose e invasão, evidenciando o fato de que sua desregulação pode ser essencial no desenvolvimento do câncer⁶³. Muitos estudos avaliam miRNAs como biomarcadores (prognóstico, diagnóstico, preditivos de resposta a tratamentos específicos), sendo alguns em CECP, embora nenhum traga estes marcadores especificamente como preditores de metástase linfonodal em cavidade oral⁶⁴⁻⁶⁹.

1.5 miRNAs: biogênese e função

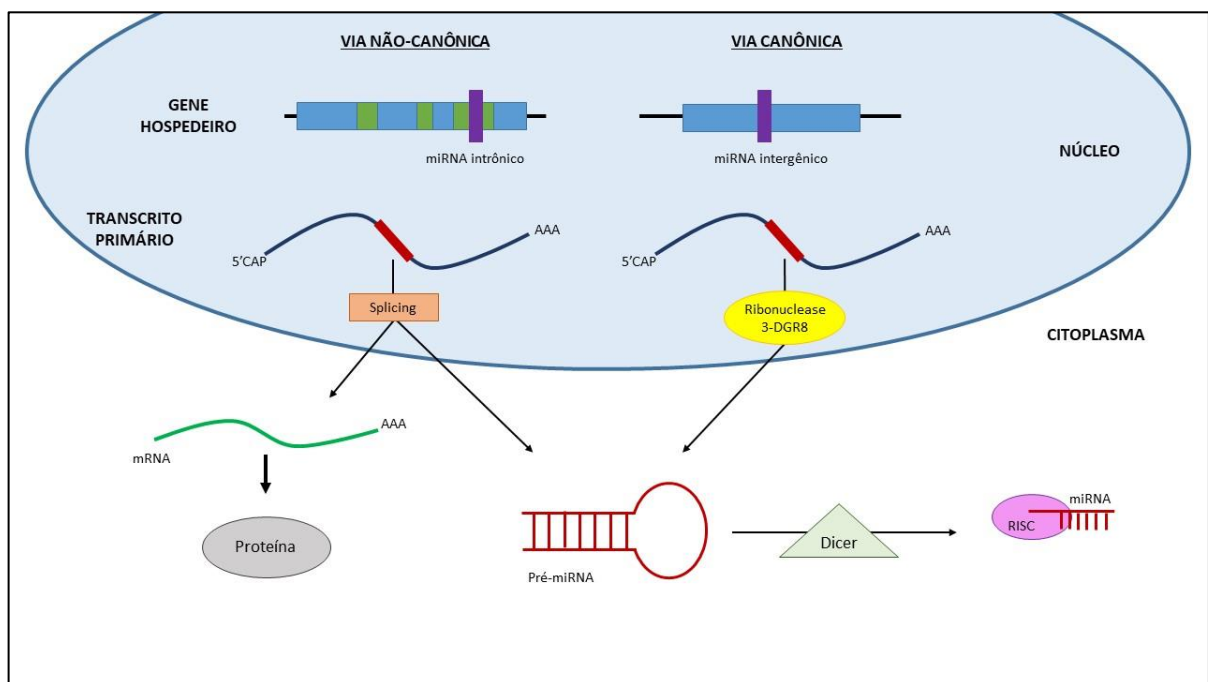
Os miRNAs são moléculas de RNA não codificantes que possuem de 18 a 25 nucleotídeos e constituem uma classe dominante de pequenos RNAs na maioria dos tecidos somáticos. Sua função consiste na regulação pós-transcricional de vários genes, através da degradação ou inibição do mRNA^{70, 71}, sendo importantes em vários processos celulares como proliferação, crescimento, migração, apoptose e diferenciação⁷²⁻⁷⁴. Existem também outros tipos de pequenos RNAs descritos na literatura, envolvidos em processos celulares eucarióticos, como RNAs de interferência (siRNA)⁷⁵ e *Piwi-interactin* RNAs (piwiRNA)⁷⁶, que como os miRNAs, também atuam no silenciamento de RNA, porém o que os diferencia é sua biogênese⁷⁷.

Atualmente, já foram identificados 1917 sequências de miRNAs humanos (*miRBase release 22.1 2018*), ilustrando o enorme potencial destas moléculas na regulação da expressão

gênica, com estimativas de que cerca de 60% de todos os mRNAs humanos estejam sob o controle de miRNAs^{78, 79}.

A maioria dos miRNAs em humanos, são codificados por íntrons⁸⁰, e assim alguns genes codificadores de miRNAs, localizados nestas regiões intrônicas, acabam compartilhando a mesma região promotora do gene codificante de proteínas ao qual estão próximos. Porém, tem-se observado que muitas vezes estes genes de miRNAs possuem muitos sítios de inicialização de transcrição⁸¹ e que algumas vezes seus promotores podem diferir dos promotores dos genes 'hospedeiros'⁸².

A biogênese dos miRNAs ocorre preferencialmente pela via canônica, no entanto estudos revelaram estruturas de pequenos RNAs que se assemelham aos miRNAs típicos, mas que seguem outra via de biogênese, contornando alguns dos processos que acontecem na via canônica clássica, chamada de via não canônica⁸³⁻⁸⁷ (figura 3).



Fonte: a autora.

Figura 3. Vias de biogênese de miRNAs. Via não canônica e via canônica.

Na via canônica a transcrição dos miRNAs é realizada pela RNA polimerase II (Pol II), dando origem a moléculas de miRNA primário (pri-miRNA). O processamento nuclear destas moléculas é feito por um complexo microprocessador, composto pela enzima Drosha, que é

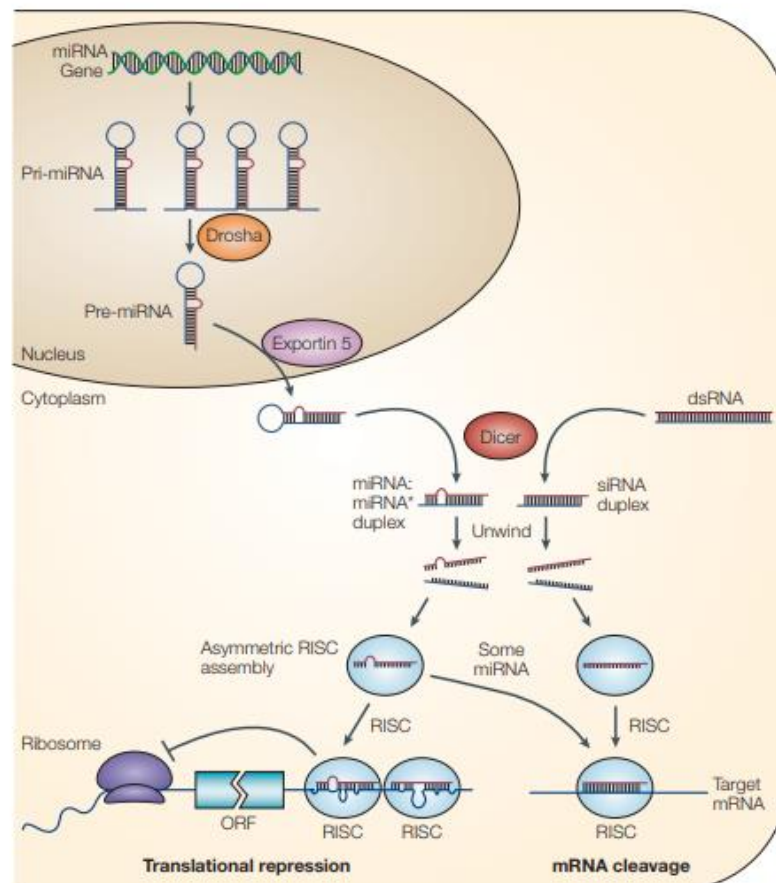
uma endonucelase específica de RNA e a DGCR8, que é uma proteína de ligação ao RNA, que funciona como âncora molecular fazendo o reconhecimento da junção dsRNA-ssRNA (dupla fita e simples fita), e direcionando a Drosha. Assim, a Drosha cliva as extremidades 3' e 5' do *stem-loop* de pri-miRNA, liberando um pré-miRNA em forma de *hairpin* que será exportado para o citoplasma⁸⁸. Para que este pré-miRNA seja transportado para o citoplasma, é necessária a formação de um complexo transportador, através da associação de duas proteínas: XPO5 (exportina 5) e RAN-GTP. As proteínas irão reconhecer e se ligar a molécula de pré-miRNA, a fim de que ela seja exportada para o citoplasma para completar sua maturação⁸⁹.

Estas pequenas moléculas exercem uma função de guia no processo de silenciamento de mRNAs, porém não agem sozinhas. Para que o processo efetivamente aconteça, elas precisam se associar a algumas proteínas, formando um complexo ribonucleoproteico, chamado Complexo de Silenciamento Induzido de RNA- RISC (do inglês: *RNA Induced Silencing Complex*), para completar seu processamento no citoplasma⁹⁰.

O pré-miRNA que é exportado para o citoplasma possui um *loop* em uma das extremidades, que será processado pela Dicer, com ação de helicase em seu domínio N-terminal, facilitando o reconhecimento do pré-miRNA ao interagir com o *loop*. Enquanto isso, o domínio C-terminal em *tandem*, forma um dímero intramolecular, para criar um centro catalítico que irá clivar este *loop* liberando um miRNA duplex, que irá se associar a um complexo proteico AGO1-4, formando um pré-RISC. Um recurso de choque térmico formado pelas proteínas HSC70-HSP90 hidrolisa ATP para carregar este miRNA duplex, que é em seguida descartado e o miRNA maduro permanece preso a uma das proteínas do complexo AGO1-4, dando origem a um complexo RISC maduro⁷¹.

O complexo RISC é a associação do miRNA maduro com as proteínas Agonautas, e através deste complexo é possível mediar o silenciamento de alguns genes. Este silenciamento pode ocorrer de duas maneiras: repressão da tradução do mRNA ou clivagem do mRNA, dependendo da complementariedade entre as moléculas. A clivagem é induzida por um domínio de RNase presente nas proteínas Agonautas, e ocorre quando o miRNA é totalmente ou quase que totalmente complementar ao mRNA alvo, ocorrendo uma ligação por complementariedade entre ambos e o mRNA é clivado, ou degradado⁹¹. Vários mecanismos

foram descritos na literatura para explicar como ocorre a repressão da tradução, onde os miRNAs se ligam aos mRNAs através de um pareamento incompleto (por não serem totalmente complementares), o complexo RISC recruta outros complexos proteicos e essa ação conjunta faz com que o ribossomo seja incapaz de traduzir aquela sequência de mRNA, inibindo assim a tradução e possibilitando o silenciamento do gene⁹⁰ (Figura 4).



Fonte: He et al., 2004⁹².

Figura 4. Ação do miRNA através do complexo RISC.

Na via não canônica não ocorre a ação da Drosha e da DGCR8 na biogênese do miRNA, embora estudos demonstrem que elas desempenham outras funções importantes relacionadas a processos celulares como desenvolvimento, regulação transcricional e manutenção da integridade do genoma, que são independentes da biogênese dos miRNAs⁹³,

Nessa via, os pré-miRNAs são originados através do processamento de íntrons pelos spliceossomos (figura 3), e são exportados para o citoplasma pela XPO5 e clivados pela Dicer, posteriormente dando origem ao RISC. Ou seja, na via não canônica o complexo microprocessador é substituído pela atividade de *splicing*, e os processos seguintes se fundem com a via canônica, também descrita como via de mirtons^{85, 93}.

Diversos estudos tem mostrado perfis distintos de expressão de microRNAs entre amostras normais e tumorais e também variações entre tipos tumorais diferentes^{95, 96} atribuindo à estas moléculas um papel importante na tumorigênese, justamente por terem um papel fundamental da regulação pós-transcricional da expressão gênica^{60, 96, 97}.

Assim, apesar da PLS ser a técnica referência utilizada hoje para tumores em estágios iniciais com os linfonodos do pescoço clinicamente negativos, como mencionado anteriormente, muitos pacientes que realizam este procedimento tem uma confirmação patológica de ausência de metástase linfonodal. Um estudo anterior do grupo que analisou os dados da PLS da instituição, revelou que 80,8% dos pacientes incluídos no protocolo foram confirmados como pN0, ou seja, apenas 19,2% foram pN+⁹⁸. Portanto um biomarcador acurado, de rápida e fácil detecção poderia ser uma ferramenta útil para auxiliar os médicos durante a decisão de esvaziamento cervical.

Também cabe mencionar que já foi demonstrado que esta abordagem pode ser realizada em tecido parafinado fixado com formalina, pois este tipo de amostra conserva um perfil de expressão de miRNAs similar aquele observado em amostras de tecido fresco por conta de seu tamanho reduzido, o que torna mais difícil sua degradação e fazendo com que sejam mais estáveis⁹⁹⁻¹⁰¹.

2 JUSTIFICATIVA

O estadiamento cirúrgico dos linfonodos pescoço é muito importante para a eficácia do tratamento, diminuição de mortalidade e recidivas em pacientes com CECO. Porém, os pacientes submetidos à esta abordagem também apresentam morbidades, como dor e limitação nos movimentos do braço devido a possíveis lesões no nervo espinal acessório e XI par craniano, além de dano no sistema imune, devido a retirada dos linfonodos.

Apesar de esvaziamentos cervicais ainda serem muito utilizados na clínica (tratamento padrão para pacientes T3-T4), para tumores em estádios iniciais a NCCN preconiza a Pesquisa do Linfonodo Sentinela, o que diminui estas possíveis morbidades, por retirar um número muito menor de linfonodos do que os esvaziamentos. Contudo, não poupa os pacientes de um estadiamento cirúrgico dos linfonodos do pescoço, que na maioria das vezes é confirmado como negativo para metástases linfonodais pelos testes patológicos.

A detecção de CECO em uma amostra de tecido linfonodal requer marcadores altamente específicos e sensíveis, sendo que o marcador ideal deve ser expresso no epitélio escamoso e estar ausente em linfócitos e nos estromas linfáticos e vasculares. Assim, os miRNAs podem vir a construir uma excelente ferramenta para a detecção de metástases linfonodais, por apresentarem perfis de expressão específicos às células tumorais, reduzindo um possível viés de expressão relacionado a outras células presentes nos linfonodos.

Portanto este trabalho visa identificar miRNAs capazes de distinguir os pacientes com CECO clinicamente livres de metástase linfonodal (cN0) dos pacientes com linfonodos patologicamente positivos e negativos (pN+ pN0) de uma forma sensível, específica, acurada e rápida, podendo constituir uma ferramenta útil para auxiliar os patologistas na tarefa de localizar metástases presentes nos linfonodos tidos como livres pelas técnicas convencionais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste estudo é identificar miRNAs diferencialmente expressos em amostras tumorais de pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral clinicamente livres de metástase (cN0), que sejam capazes de distinguir casos com linfonodos patologicamente positivos (pN+) dos casos patologicamente negativos (pN0).

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar miRNAs cujo nível de expressão seja capaz de diferenciar tumores de pacientes T1/T2 cN0/pN0 dos T1/T2 cN0/pN+ (com micrometástase e macrometástase);
- Validar o perfil de expressão dos miRNAs que apresentaram um padrão diferencial na etapa inicial do estudo, em um grupo amostral maior, determinando sua aplicabilidade como biomarcador preditor de metástase linfonodal em pacientes com CECO;
- Avaliar a associação das variáveis sociodemográficas, clínicas, histopatológicas e terapêuticas com os resultados obtidos através das análises moleculares.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

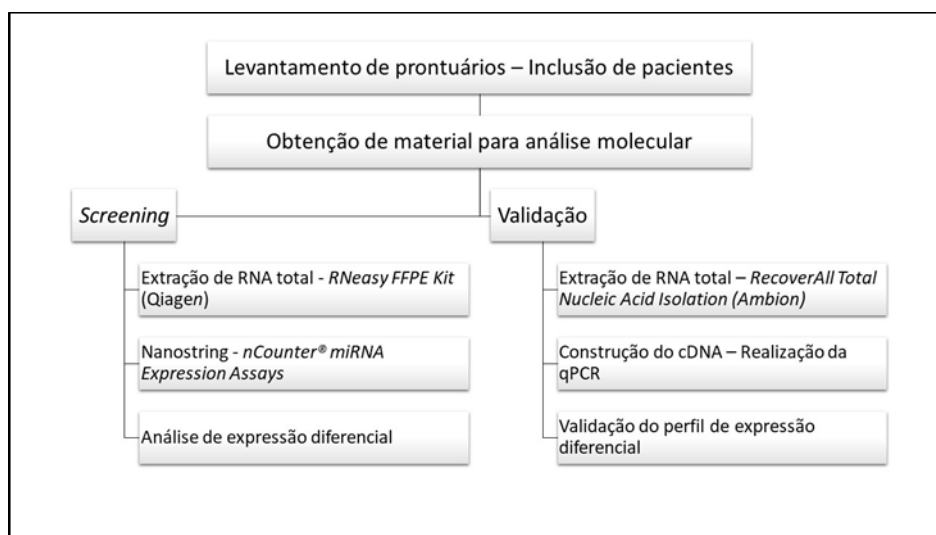
Estudo observacional retrospectivo.

4.2 Delineamento Experimental

Inicialmente realizou-se um levantamento de prontuários dos casos passíveis de inclusão neste estudo, que posteriormente foram filtrados de acordo com os critérios de inclusão e exclusão determinados no item 4.5. Após a seleção dos casos, foi realizado um pedido ao departamento de patologia do Hospital do Câncer de Barretos, a separação dos blocos de parafina e corte das lâminas para extração de RNA, para as duas etapas do estudo.

As amostras selecionadas para o *screening*, passaram por um protocolo de extração de RNA total, e então a expressão diferencial de 798 sequências de miRNAs conhecidas foi avaliada. Além disso, foram realizadas as análises dos resultados através de programa estatístico-matemático.

As amostras selecionadas para a validação do estudo passaram por extração de RNA total, construção de um DNA complementar e a expressão diferencial dos microRNAs selecionados na primeira etapa será validada (figura 5).

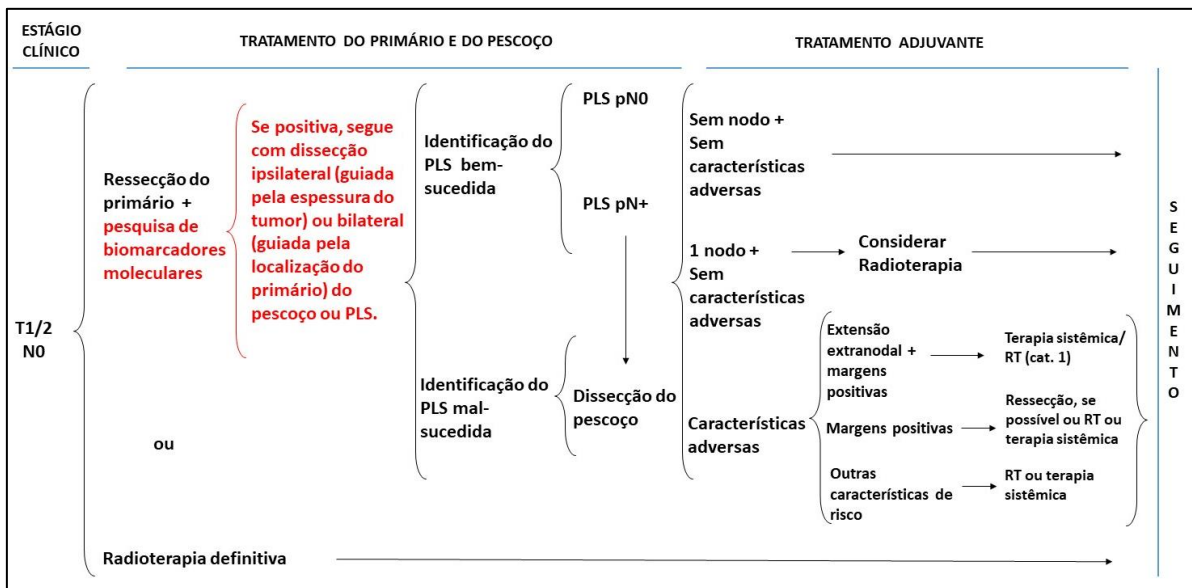


Fonte: a autora.

Figura 5. Fluxograma do estudo.

4.3 Delineamento clínico

A pesquisa de um biomarcador de metástase linfonodal, que esteja sendo expresso no tumor primário, poderia poupar os pacientes de um estadiamento cirúrgico invasivo e passível de complicações. A pesquisa seria feita após a ressecção do tumor primário e antecedendo a PLS, onde um resultado negativo para metástase linfonodal, levaria o paciente para o acompanhamento destes linfonodos do pescoço, sem a necessidade de cirurgia para a retirada dos mesmos.



Fonte: adaptado de NCCN³⁴.

Figura 6. Delineamento clínico do estudo.

4.4 Aspectos éticos

O projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII e encontra-se aprovado (CEP: 1418/2017).

Foi solicitado ao Comitê de Ética desta instituição a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em razão desta pesquisa apresentar caráter retrospectivo e ainda representar riscos mínimos para os participantes, sendo estes inerentes a quebra accidental da confidencialidade dos dados, e por tratar de levantamento de dados junto à prontuários e não ser possível o contato com alguns participantes de pesquisa selecionadas.

Ainda, seu desenvolvimento não resultará em impacto no manejo clínico dos participantes bem como necessidade de aconselhamento genético.

Contudo os pesquisadores comprometem-se a preservar a privacidade dos participantes de pesquisa, garantindo que os dados coletados serão utilizados única e exclusivamente para a execução do projeto em questão, e que as informações divulgadas, de maneira nenhuma identifiquem o participante de pesquisa.

O estudo não deve trazer benefícios diretos aos seus participantes, mas gerar conhecimentos que trarão benefícios futuros a outras pessoas.

4.5 População de estudo

O estudo está sendo desenvolvido no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, em Barretos/SP.

As amostras foram coletadas por conveniência de tumores primários (com linfonodos cervicais metastáticos e não metastáticos) de pacientes com CECO (cT1-T2cN0M0) submetidos a tratamento cirúrgico no Hospital de Câncer de Barretos. Foram levantados dados epidemiológicos (sexo, idade, etnia, *status* de tabagismo e etilismo), clínicos (sub-localização anatômica, estadiamento T, *performance* clínico, tratamentos realizados) e de anatomia patológica (pT, pN, infiltração perineural, infiltração angio-linfática, modo de invasão do tumor, profundidade de invasão tumoral, *status* das margens de segurança, dados de imunohistoquímica).

I. Critérios de inclusão:

- Diagnóstico histológico de CCE;
- Tratamento cirúrgico no HCB;
- Lesão situada na cavidade oral, de acordo com CID-O;
- Ausência de tratamento prévio;
- Ausência de história pregressa de câncer;
- Clinicamente livres de metástase linfonodal

II. Critérios de exclusão:

- Tratamento neoadjuvante;
- Tumores sincrônicos;
- Sítios não localizados na cavidade oral;
- T3/T4;
- Dados clínicos incompletos

Este estudo possui duas fases, sendo a primeira de *screening*: onde foi analisada a expressão diferencial de microRNAs em 24 amostras de tumores primários de pacientes com CECO incluídas em parafina através da técnica de nanoString; e a segunda de validação: onde foram avaliadas 40 amostras nas mesmas condições, e a expressão dos miRNAs encontrados no *screening* foram analisadas pela técnica de *Polimerase Chain Reaction Quantitative Real Time* (qPCR).

4.6 Análise histopatológica e obtenção do material para análise molecular

O material analisado neste estudo consiste em amostras de tumores CECO incluídos em parafina. Após análise dos resultados dos exames anatomopatológicos, as lâminas de hematoxilina & eosina correspondentes aos blocos de parafina contendo as amostras de interesse foram revisadas pelo patologista para confirmação do diagnóstico e caracterização dos componentes celulares presentes nas amostras selecionadas. As amostras foram então submetidas à macrodissecção manual para separação das regiões mais representativas de tecido tumoral (pelo menos 60% de células tumorais) e marcadas pelo patologista. Todas as análises histopatológicas e de imunohistoquímica foram realizadas, a fim de avaliar a presença de metástases nos linfonodos e seleção dos cortes avaliados pela análise molecular.

Cuidados foram tomados visando o não esgotamento do material biológico (bloco de parafina) armazenado na patologia.

4.7 Análise molecular

Inicialmente, o padrão de expressão de 800 miRNAs foi avaliado em 12 amostras de tumores com linfonodos metastáticos e 12 tumores com linfonodos não metastáticos, de

pacientes com CECO. Dentre o grupo de linfonodos metastáticos, 8 foram provenientes de linfonodos com macrometástases e 4 com micrometástases. Posteriormente, a expressão diferencial de 4 miRNAs selecionados a partir dos dados obtidos na primeira etapa do estudo, foi avaliada em um grupo independente de 15 amostras de tumores com linfonodos com micrometástases e macrometástases e 25 tumores com linfonodos não metastáticos.

4.7.1 Screening

4.7.1.1 Extração de RNA

A extração do RNA tumoral foi feita a partir de cortes dos blocos incluídos em parafina utilizando-se o *RNeasy FFPE Kit (Qiagen)*. Primeiramente a área tumoral das lâminas foi retirada através de raspagem com o auxílio de um bisturi e este material contendo tecido tumoral e parafina passou por uma etapa de desparafinização, com *Desparaffinization Solution (Qiagen)*. Após a remoção da parafina, foi adicionado às amostras Buffer PKD e as amostras foram centrifugadas a 11.000 g por 1 minuto. Posteriormente, ocorreu a adição de 10 µl de Proteinase K, e as amostras foram incubadas a 56 °C por 15 minutos e posteriormente a 80 °C por 15 minutos. A fase incolor gerada pela centrifugação foi transferida para um tubo de 2 mL e incubada no gelo por 3 minutos e centrifugada a 20.000 g por 15 minutos. Então o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se DNase Booster Buffer, incubando a temperatura ambiente por 15 minutos. Após esta incubação, adicionou-se 500 µl de Buffer RBC, 1200 µl de etanol 100%, a amostra foi transferida para a coluna, sendo centrifugado a 8.000 g por 15 segundos. Em seguida foi adicionado 500 µl do Buffer RPE e o passo de centrifugação foi repetido nas mesmas condições. Por fim a coluna foi adicionada a um novo tubo, onde adicionou-se 30 µl de água nuclease *free*, e através de uma centrifugação de 1 minuto em velocidade máxima o RNA foi eluído.

O RNA total foi quantificado no equipamento Qubit (*Invitrogen*), também sob orientações do fabricante. Todas as amostras extraídas foram armazenadas a -80 °C até o momento de utilização.

4.7.1.2 nanoString

A tecnologia nanoString (*nanoString Technologies, Seattle, WA, EUA*) para análise de miRNAs humanos foi derivada do miRBase v.18 e é um dispositivo altamente automatizado,

que possibilita a análise de 12 amostras por vez, e requer pouco tempo de atividades de bancada. Além disso, esta técnica é capaz de detectar fragmentos muito pequenos de amostras degradadas, como amostras derivadas de tecido parafinado, por exemplo. Para este estudo foi escolhido o painel *nCounter® miRNA Expression Assays*, que é capaz de avaliar a expressão de 800 miRNAs conhecidos e de interesse terapêutico, com um *input* de apenas 100 ng de RNA total para cada amostra.

Toda a preparação e processamento das amostras foram efetuados de acordo com o protocolo do fabricante. O protocolo exclusivo de miRNAs possui uma etapa de preparação das amostras, que consiste em ligar uma *tag* ao miRNA, que alonga a fita para que as ligações das etapas seguintes ocorram de maneira mais efetiva. Após a ligação, as amostras foram purificadas e diluídas, e as reações de hibridização foram realizadas por incubação a 65 °C durante 21 horas. Nessa etapa, cada molécula de miRNA foi ligada a duas sondas, uma de captura e uma repórter. A sonda de captura possui uma biotina na extremidade 3', e a sonda repórter possui um *barcode* (código de cores) na extremidade 5'. Este código é composto de 4 cores que são dispostas em 6 posições diferentes a fim de identificar a sequência de miRNA a qual estão ligadas. A biotina da sonda de captura foi importante para que os complexos formados se ligassem na superfície do cartucho, onde haviam moléculas de estreptavidina. As sondas hibridizadas foram purificadas e contadas na estação *nCounter Prep Station* e *Digital Analyzer* (nanoString), seguindo as instruções do fabricante. Para cada ensaio, foi feita uma varredura de alta densidade (600 campos de visão)¹⁰².

A coleta dos dados do experimento foi realizada no *nCounter Digital Analyzer*. Nesta etapa ocorreu a contagem absoluta de miRNAs presentes em cada uma das amostras. Os dados foram tabulados em formato RCC (*Reporter Code Count*), e a partir deles foram realizadas as análises posteriores.

4.7.1.3 Análise dos dados de expressão dos miRNAs

Após a importação dos dados do *nCounter Digital Analyzer*, os valores obtidos foram normalizados, com o objetivo de minimizar os possíveis efeitos causados por variações técnicas, permitindo assim, que os dados fossem comparáveis entre si, podendo então, identificar variações biológicas reais nas amostras analisadas.

Esse processo foi realizado através da ferramenta *nanoStringNorm*¹⁰³, que é uma extensão do pacote R, no Galaxy. E para isso utilizou-se o método *Quantile*.

Foi estabelecido um *cutoff*, através dos cálculos citados acima, e a partir deste valor foi aplicado um filtro que retirou da análise os miRNAs que tiveram dados de expressão menor que o valor de *cutoff* estabelecido.

4.7.2 Validação

4.7.2.1 Extração de RNA

Após a seleção dos casos e obtenção do material parafinado foi realizada a extração de RNA total das amostras pN0 incluídas na fase de validação do estudo.

A extração do RNA tumoral foi feita a partir de cortes dos blocos incluídos em parafina utilizando-se o *RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion)*. Inicialmente as amostras foram raspadas das lâminas com o auxílio de um bisturi, e passaram por uma etapa de desparafinização, utilizando Xilol. As amostras desparafinizadas foram incubadas com tampão de digestão e protease durante 3 horas a 50 °C e 500 rpm. Em seguida adicionou-se 120 µl do aditivo de isolamento e 275 µl de etanol 100%, transferindo-se posteriormente para a coluna e centrifugado a 10.000 g por 1 minuto. Após, 700 µl do Wash 1 foi adicionado na mesma coluna, centrifugado a 10.000 g por 1 minuto. O mesmo foi realizado com o Wash 2/3, e ao fim realizou-se mais uma centrifugação a 10.000 g por 1 minuto, a fim de remover qualquer resíduo da coluna. Para ter certeza de que ocorreu apenas o isolamento de RNA, foi adicionado um mix para degradar qualquer DNA presente na amostra (6 µl DNase buffer, 4 µl DNase e 50 µl água livre de ácidos nucleicos), incubando-se a mistura adicionada a coluna por 30 minutos em temperatura ambiente. As lavagens com Wash 1 e Wash 2/3 se repetiram, sendo a Wash 2/3 realizada duas vezes. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor, adicionou-se 30 µl de água livre de ácidos nucleicos, e o material foi centrifugado a velocidade máxima por 1 minuto.

O RNA total foi quantificado no equipamento Qubit (*Invitrogen*), também sob orientações do fabricante. Todas as amostras extraídas foram armazenadas a -80 °C até o momento de utilização.

4.7.2.2 Síntese de cDNA

Para a fase de validação, os miRNAs selecionados passaram por uma etapa anterior a análise da sua expressão, que foi a construção de um cDNA para cada um deles. A técnica escolhida para esta etapa, a PCR quantitativa necessita de uma molécula dupla fita para que a reação ocorra.

Para isto, dez nanogramas do RNA total das amostras foram submetidos à transcrição reversa com a utilização do Taqman microRNA Kit (*Applied Biosystems*) e primers stem-loop específicos para cada um dos miRNAs selecionados. Para a reação utilizou-se 0,15 µl de dNTP, 1 µl de multiscrbe, 1,5 µl de tampão, 0,19 µl RNase Inhibitor, 3 µl de primer, 7,16 µl de água livre de ácidos nucleicos e 2 µl de RNA total. A incubação aconteceu no termociclador ProFlex PCR System (*Thermo Fisher Scientific*) com a seguinte ciclagem: 16 °C por 30 minutos, 42 °C por 30 segundos e 85°C por 5 minutos. A avaliação da qualidade das amostras de RNA extraídas foi realizada através da amplificação dos RNAs endógenos U6 (*small nuclear RNA U6*) por PCR em Tempo Real. Testes anteriores realizados pelo grupo de pesquisa demonstraram que este endógeno atende aos critérios de expressão para esse controle de qualidade neste tipo amostral.

4.7.2.3 Polimerase Chain Reaction Quantitative Real Time - qPCR

O nível de expressão dos miRNAs selecionados como diferencialmente expressos na fase exploratória (4 miRNAs) foi avaliado em amostras de tumores com linfonodos metastáticos e não-metastáticos através de análises de PCR em tempo real utilizando-se os *TaqMan MicroRNA Assays* (*Applied Biosystems*) individuais para os miRNAs hsa-miR99a-3p, hsa-miR-1249-5p, hsa-miR-3202 e hsa-miR548-ad-3p. Para estas reações foram utilizados 2,5 µL de água, 5 µL de *TaqMan Universal PCR Master Mix 2X* (*Applied Biosystems*), 0,5 µL de *TaqMan MicroRNA Assay 20X* (*Applied Biosystems*) que contém *primer* e sonda específicos para cada um dos miRNAs e 2 µL de cDNA de cada amostra, num volume final de reação de 10 µL. A ciclagem da PCR foi composta por uma desnaturação inicial a 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 10 minutos, amplificação com 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e temperatura de *annealing* de 60 °C por 60 segundos. Todas as reações foram feitas em triplicata. Para a avaliação da expressão diferencial de cada miRNA entre as amostras de tumores com linfonodos metastáticos e não-metastáticos utilizou-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ¹⁰⁴. Como normalizador utilizou-

se a média do valor dos Cts do *small nuclear* RNA U6. Em todos os cálculos foram utilizadas as médias dos valores obtidos nas triplicatas.

4.8 Análises Estatísticas

Os resultados moleculares encontrados foram correlacionados com os dados clínicos e patológicos dos pacientes, principalmente em relação ao desenvolvimento de metástases cervicais, através da utilização do programa SPSS 23.0 para Windows, para a digitação e análise estatística dos dados. A significância estatística foi determinada para um valor de $p < 0,05$.

4.8.1 *Screening* – nanoString

Os resultados obtidos na fase de *screening* foram importados e processados no programa estatístico-matemático R (*R-project v3.2.1; The R Foundation, Viena, Áustria*) por meio de scripts customizados:

Os arquivos em formato RCC foram importados simultaneamente e convertidos em uma matriz de expressão de dados brutos.

A avaliação do controle de qualidade foi conduzida conforme descrito abaixo:

- a. Avaliou-se a dispersão dos dados pela relação média *versus* desvio padrão de todas as *probes*, incluindo controles positivos e negativos;
- b. Calculou-se o coeficiente de variação (CV) das amostras;
- c. Avalou-se dos efeitos de *batch* entre as amostras e entre cartuchos por meio de regressão linear;
- d. Verificou-se a relação entre a proporção de *probes* não detectadas pela média das amostras nos dados brutos;
- e. Estimou-se o conteúdo de RNA pela relação entre genes *housekeeping*s pelos miRNAs de maior expressão nos dados brutos;
- f. Inspeccionou-se os controles positivos e negativos por meio da relação entre as contagens observadas em \log_2 pela concentração esperada em \log_2 de e fentomolar (fM).

Normalização: foram realizados três métodos de normalização, de caráter comparativo:

- a. 100 miRNAs com os menores CVs foram utilizados como *housekeepings*;
- b. MiRNAs com menores CVs foram identificados a partir de um *cut-off* de acordo com a média geométrica de todos os mRNAs avaliados (*housekeeping.geo.mean*);
- c. Média geométrica de 75% dos miRNAs de maior expressão (*top.geo.mean*).

A partir da definição dos *housekeepings*, foi calculado o *scaling factor* (sf) ou *normalization factor* de cada *lane* por meio da razão entre a média das médias geométricas de todas as *lanes* pela média geométrica de cada *lane*. A partir deste valor de sf calculado, foi realizada a normalização das amostras pela multiplicação de cada valor bruto de miRNA pelo sf da *lane* correspondente.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o método padrão de Teste t de Student, corrigido por Benjamini & Hochberg. Um outro método recentemente publicado conhecido por nanoStringDiff¹⁰⁵ que utiliza um modelo de regressão linear generalizada, também foi aplicado de forma comparativa.

4.8.2 Validação – qPCR

Os resultados dos ensaios de qPCR foram inicialmente analisados utilizando QuantStudio™ Real-Time PCR Software v1.3 (*Applied Biosystems*). Os cálculos foram realizados, utilizando as médias dos valores de Cts dos miRNAs e a média do valor de Ct do *small nuclear RNA U6* utilizado como controle endógeno. Para a validação da expressão diferencial de cada miRNA entre as amostras de tumores pN+ e pN0 utilizou-se o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrito por Livak e Schmittgen¹⁰⁴.

O teste *Mann-Whitney U* foi utilizado na comparação dos valores de ΔCt entre o grupo metastático e o grupo não-metastático, e assim, o miRNA que apresentou valor de $p < 0,05$ foi considerado diferencialmente expresso.

Para avaliar o potencial de diagnosticar amostras tumorais com linfonodos metastáticos em pacientes com CECO, calculou-se especificidade, sensibilidade, valor preditivo positivo,

valor preditivo negativo e acurácia do marcador selecionado, utilizando as fórmulas descritas a seguir e os termos descritos na tabela 2:

- Especificidade: $VP/(VP+FN)$;
- Sensibilidade: $VN/(VN+FP)$;
- Valor Preditivo Positivo: $VP/(VP+FP)$;
- Valor Preditivo Negativo: $VN/(VN+FN)$;
- Acurácia: $VN+VP/(VN+VP+FN+FP)$.

Tabela 2. Tabela utilizada para os cálculos de sensibilidade, especificidade e acurácia

Resultado patológico (padrão ouro)	Resultado do teste		
	Positivo	Negativo	Total
Negativo (N0)	VN	FN	VN+FN
Positivo (N+)	FP	VP	VP+FP
Total	VN+FP	VP+FN	N=VP+FN+VN+FP

VP: Verdadeiro Positivo; VN: Verdadeiro Negativo; FP: Falso Positivo; FN: Falso Negativo.

Para construção de curvas ROC e cálculo da área sob a curva (AUC) utilizou-se o programa estatístico SPSS 23.0.

4.9 Validação da expressão dos miRNAs no “The Cancer Genome Atlas” (TCGA)

A fim de verificar se os dados encontrados no presente estudo eram compatíveis com outras amostras com as mesmas características, foi realizada uma validação *in silico*. Foram acessados dados de expressão dos miRNAs selecionados para a validação, nas amostras do TCGA, utilizando a ferramenta UCSC Xena¹⁰⁶. Adotando-se os mesmos critérios de inclusão/exclusão do estudo, 66 pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral foram selecionados. A análise comparativa entre os grupos pN0 e pN+ foi realizada utilizando-se teste T.

5 RESULTADOS

5.1 Seleção dos casos

Foram encontrados 167 potenciais casos de CECO, dos quais 77 vieram de uma casuística do protocolo Linfonodo Sentinela, 31 de um projeto anterior do grupo de pesquisa de Câncer de Cabeça e Pescoço e 59 do registro hospitalar. Destas 167 amostras, foram selecionadas para a primeira etapa do estudo (*screening*), 12 casos cN0 e 6 pN+ (linfonodo sentinela), 4 pN+ (projeto anterior do grupo) e 2 pN+ (registro hospitalar).

Para a etapa de validação foram selecionadas 25 amostras cN0 (linfonodo sentinela) e 15 amostras pN+ (registro hospitalar), 2pN+ (projeto anterior do grupo), totalizando 42 amostras.

Para esta seleção foram levados em consideração os critérios de inclusão e exclusão descritos no item 3.3.

5.2 *Screening*

5.2.1 Características clínico-patológicas

As características clínico-patológicas dos pacientes incluídos na fase de *screening* do estudo podem ser observadas na tabela 3. Estes pacientes constituíam-se em sua maioria de homens (87,5%), onde o tabagismo esteve presente em 79,2% da população e o etilismo em 69,6%. O estadiamento clínico T2 esteve presente em 75% dos indivíduos e o patológico em 58,3%. Dos pacientes que apresentavam metástases linfonodais, 66,7% apresentavam macrometástases e 33,3% apresentavam micrometástases. Além disso, 79,2% destes pacientes realizaram radioterapia.

Tabela 3. Características clínico-patológicas dos 24 pacientes incluídos na fase de *screening*.

Características		n (%)
Sexo	Feminino	03 (12,5)
	Masculino	21 (87,5)
Tabagismo	Sim	19 (79,2)
	Não	05 (20,8)
Etilismo	Sim	16 (69,6)
	Não	07 (30,4)
Estadiamento clínico	cT1	06 (25,0)
	cT2	18 (75,0)
Estadiamento patológico	pT1	10 (41,7)
	pT2	14 (58,3)
Metástase linfonodal (diagnóstico após a cirurgia)	Micrometástases	04 (33,3)
	Macrometástases	08 (66,7)
Quimioterapia	Sim	02 (1,4)
	Não	22 (98,6)
Radioterapia	Sim	19 (79,2)
	Não	05 (20,8)

5.2.2 Análises de controle de qualidade e normalização dos dados de perfil de expressão de miRNAs

Os dados de saída do experimento, em formato RCC, foram exportados para o *nSolver Software 3.0 (nanoString Technologies, Seattle, Washington, EUA)*, onde foi feita uma primeira análise visual nos dados, e verificou-se que a amostra P21, apresentou uma *flag*, indicando algum problema no controle de ligação. A seguir estes dados foram exportados para uma planilha no formato *.xlsx (Extensible Style Language)*, onde foi incluída uma linha anterior aos controles, e intituladas as três primeiras colunas com *Code Class, Name e Acession*, que indicam a classe, o nome e o código de acesso dos controles e miRNAs presentes no ensaio.

Para a etapa de *screening*, haviam sido selecionadas 24 amostras (12 cN0 e 12 cN+), porém durante as análises iniciais, algumas amostras foram excluídas. Destas 24, foram excluídas 3 amostras, P03 e P13 por apresentarem apenas 50% de células tumorais e P21 por apresentar baixa contagem dos controles de ligação.

Após este primeiro filtro, seguiu-se com 21 amostras. O primeiro teste utilizado foi o Quantro¹⁰⁷, que serve para ver se há efeito de Batch entre as amostras e entre os cartuchos. Este teste apresentou dois gráficos, um boxplot e uma curva, que mostraram a variação entre as contagens dos miRNAs em cada uma das amostras.

Na figura 7, é possível observar a comparação do boxplot pré-normalização, com e sem a amostra P12. Na figura 8 é possível observar a curva que relaciona a densidade com as contagens de cada miRNA em cada amostra, com e sem a amostra P12. Nessa comparação concluiu-se que a amostra P12 apresentava uma contagem muito abaixo das demais, o que levou a sua exclusão. Assim, seguiu-se para as análises posteriores com 20 amostras.

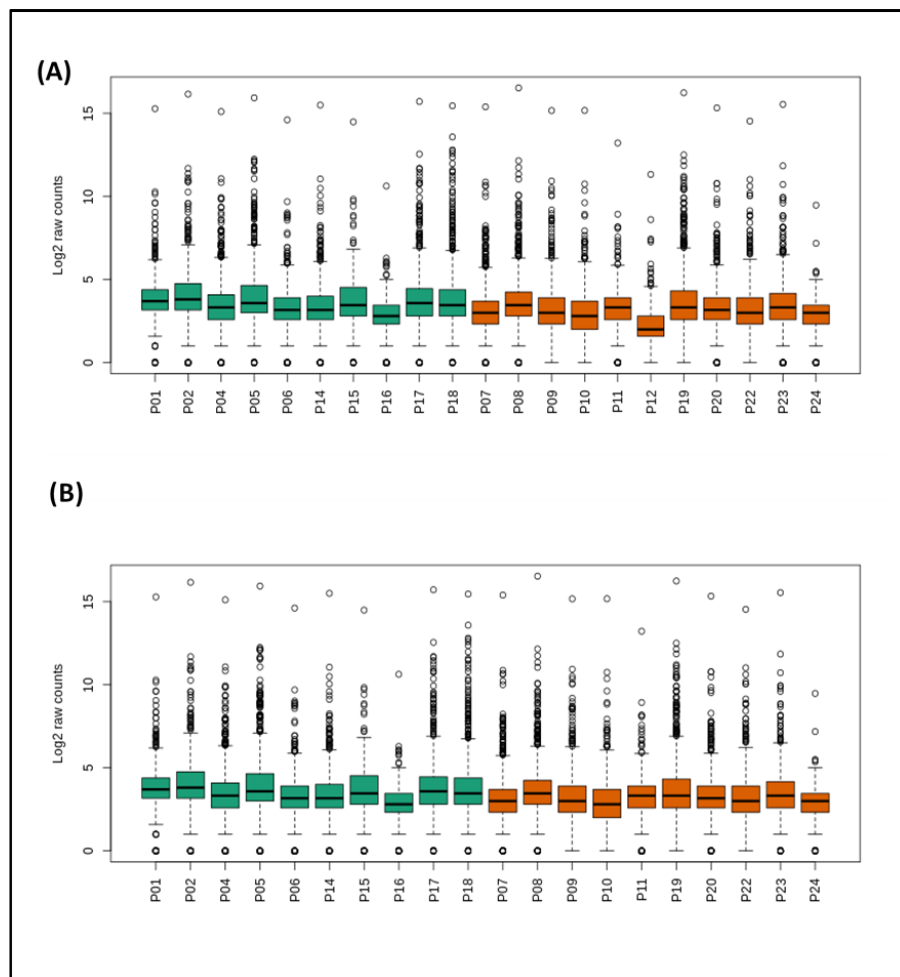


Figura 7. Boxplots pré-normalização. (A) Boxplot com os dados brutos de contagem dos miRNAs, com a amostra P12. (B) Boxplot com os dados brutos de contagem dos miRNAs, após a exclusão da amostra P12 das análises.

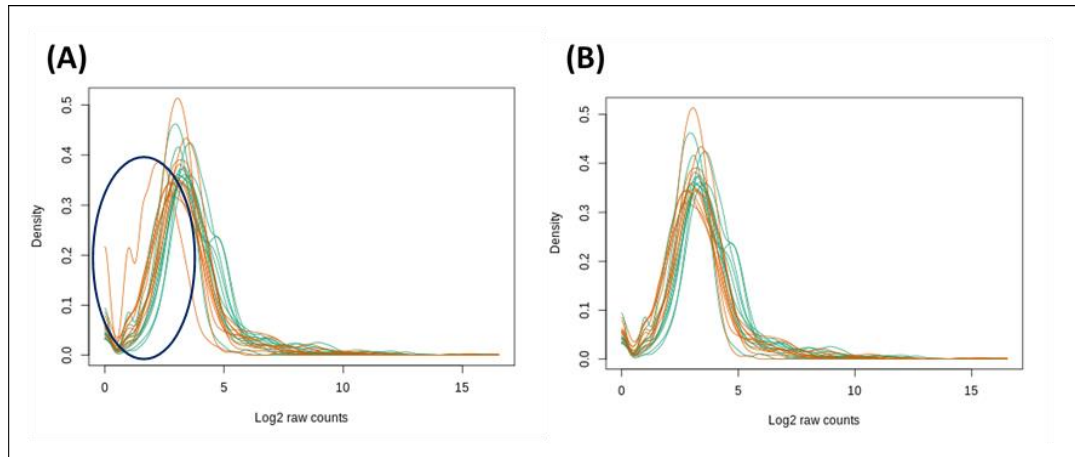


Figura 8. Curvas relacionando a densidade e contagens dos microRNAs por amostra. (A) Com a amostra P12. (B) Sem a amostra P12.

Também foi aplicado um filtro para os miRNAs, a fim de excluir os que estivessem com contagem abaixo do *background*. Para isto, foi calculada a média mais duas vezes o desvio padrão dos controles negativos, o que resultou em 24,74. Assim, foram excluídos todos os miRNAs com contagens abaixo de 25 em 100% das amostras (figura 12). Os dados de expressão de 313 miRNAs foram utilizados para as análises posteriores.

Para a análise de controle de qualidade do experimento e normalização dos dados obtidos com o *nanoString*, foi utilizado o pacote do *nanoStringNorm*¹⁰³, originalmente desenvolvido para a normalização e processamento de dados utilizando o ambiente estatístico-matemático R Studio (*R-project* v3.2.1; The R Foundation, Viena, Austria), e que posteriormente foi incluído no Galaxy, por se tratar de uma ferramenta *user-friendly* que executa scripts na linguagem R.

Dentre os métodos disponíveis para a normalização, existem 48 possíveis combinações de métodos (Anexo) que levam em consideração o coeficiente de variação, tanto entre os miRNAs quanto entre as amostras. A planilha *xlsx* gerada foi carregada para o Galaxy e estes métodos foram testados a fim de encontrar o que melhor se encaixasse para este experimento.

Dentre os métodos testados, o que apresentou melhor resultado foi o *Quantile*, onde os testes de controle de qualidade também apresentaram melhor resultado. Estes testes avaliam se houve efeito de batch entre os cartuchos e entre as amostras; verifica a relação entre os controles positivos e negativos, através da relação entre as contagens detectadas; avalia a

dispersão dos resultados, calculando uma média e a comparando com o desvio padrão das sondas da reação e dos controles; e posteriormente calcula o coeficiente de variação para cada amostra, baseado no desvio padrão e indica a variação de contagens dos miRNAs por amostra.

Na figura 9 é possível visualizar o *boxplot* antes e após a normalização pelo método *Quantile*, e devido a aproximação das medianas foi possível concluir que os valores de contagem foram normalizados com eficiência.

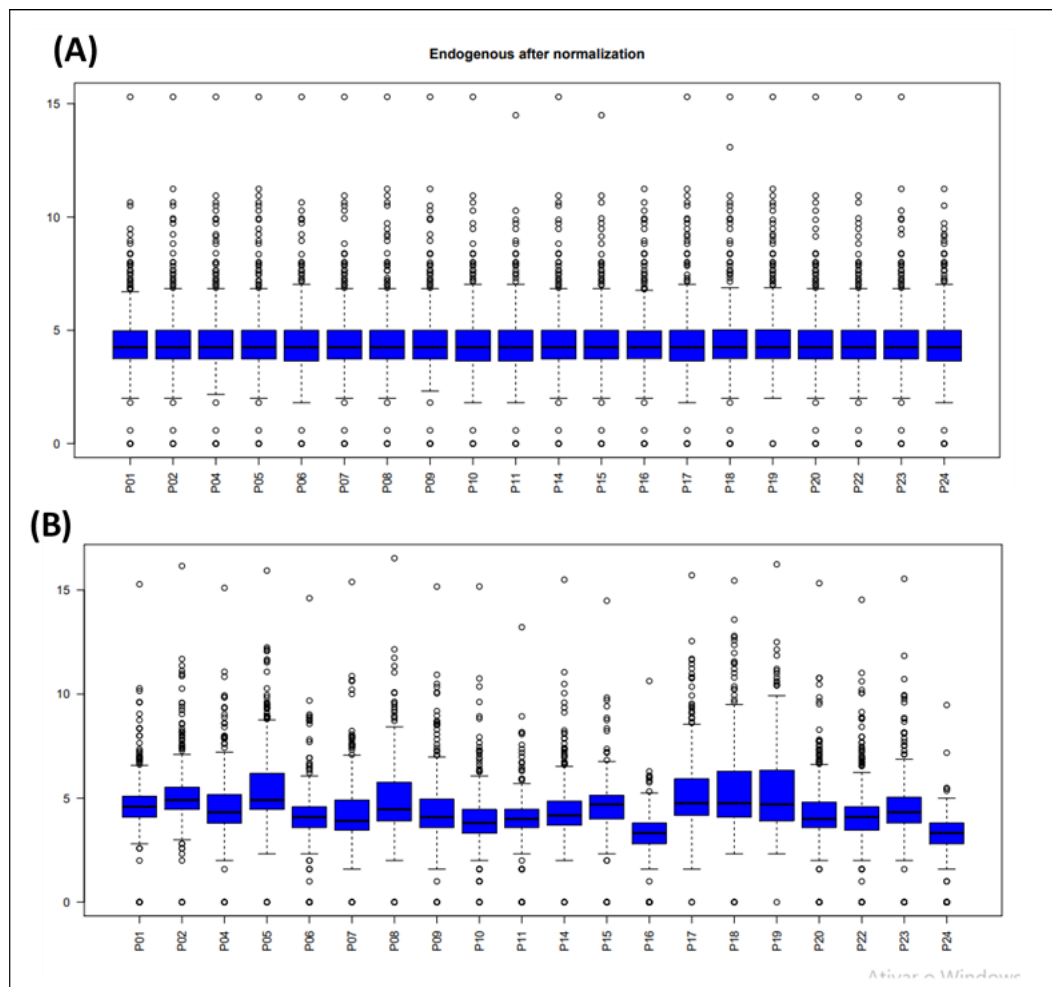


Figura 9. Boxplots referentes a normalização dos dados de contagem de miRNAs em amostras de CECO (T1/T2 cN/cN+) com o método *Quantile*. (A) Endógenos após da normalização. (B) Endógenos antes da normalização.

4.2.3 Assinatura molecular de miRNAs em pacientes com CECO pN e pN+

Para identificar miRNAs como possíveis biomarcadores para diagnosticar metástase linfonodal em pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral, foi avaliada a expressão de miRNAs em larga escala, através da tecnologia *nanoString*.

Após a normalização dos dados obtidos através desta técnica, é possível gerar uma planilha no Galaxy com os dados estatísticos a partir do cálculo do Teste T de Student dos dados normalizados. Para a expressão diferencial, foi considerado um *fold-change* $\leq 1,5$ ou $\geq 1,5$, e significância $\leq 0,05$. Estes dados passaram por análise de clusterização hierárquica pelo método de Pearson e Centroid, o que originou o *heatmap* da figura 10. Assim, as análises apresentaram 8 miRNAs com expressão diferencial significativa entre os dois grupos avaliados (hsa-miR-1249-3p: p=0,028; hsa-miR-125b-5p: p=0,043; hsa-miR-196b-5p: p=0,047; hsa-miR-3202: p=0,0096; hsa-miR376c-3p: p=0,038; hsa-miR-548ad-3p: p=0,013; hsa-miR-548d-5p: p=0,045; hsa-miR-99a-5p: p=0,029).

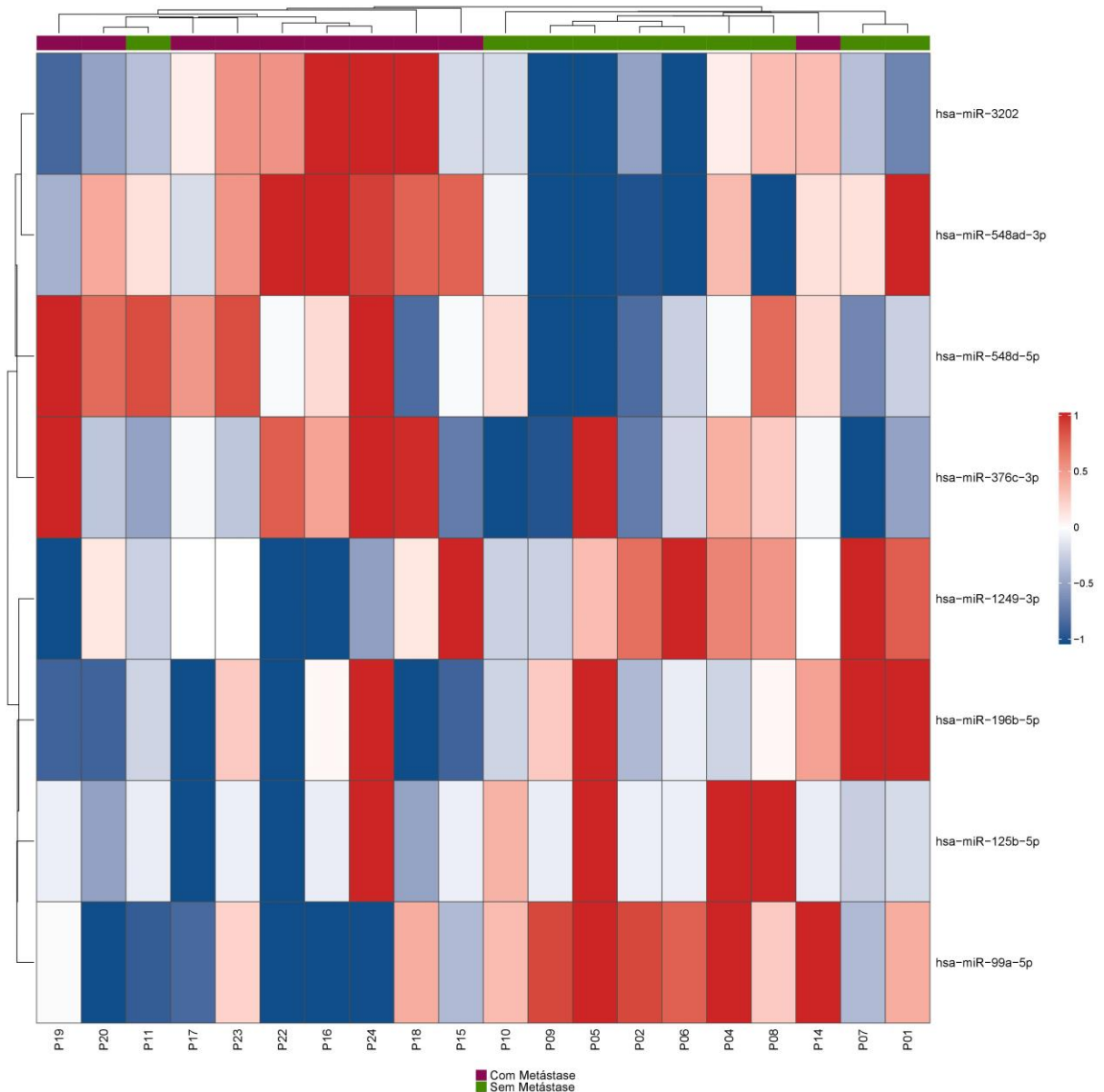


Figura 10. miRNAs diferencialmente expressos em pacientes com CECO em estadiamento T1/T2 livres de metástase linfonodal *versus* pacientes com metástase linfonodal.

Para selecionar os miRNAs alvos para a etapa de validação dos resultados, foram escolhidos os miRNAs com os menores valores de p para a etapa de validação: hsa-miR-1249-3p, hsa-miR-3202, hsa-miR-548ad-3p, hsa-miR-99a-5p. Além disso, foi possível notar que os miRNAs hsa-miR-1249-3p e hsa-miR-99a-5p estavam pelo menos 1,5 vezes mais expressos no grupo pN0, com um valor de AUC de 0,770 e 0,790, respectivamente, enquanto que os miRNAs hsa-miR-3202 e hsa-miR-548ad-3p estavam pelo menos 1,5 vezes mais expressos no grupo pN+, com valor de AUC de 0,830 e 0,810, respectivamente, gerando dois biomarcadores para

metástases linfonodais, e dois para tumores livres de metástase. Posteriormente os cálculos de AUC, sensibilidade e especificidade para estes 4 miRNAs escolhidos, foram realizados através do SPSS 23.0 e estão descritos na tabela 4.

Tabela 4. Valores de p e AUC dos biomarcadores avaliados em amostras de pacientes com CECO em estadiamento clínico inicial (T1/T2) livres de metástase versus com metástase linfonodal.

MicroRNA	AUC	P
miR-3202	0,830	0,009
miR-548ad-39	0,830	0,013
miR-1249-39	0,770	0,028
miR-99a-5p	0,790	0,029

5.3 Validação

5.3.1 Características clínico-patológicas

As características clínico-patológicas dos pacientes incluídos na fase de validação do estudo podem ser observadas na tabela 5. Estes pacientes constituíam-se em sua maioria de homens (81%), onde o tabagismo esteve presente em 66,72% da população e o etilismo em 64,3%, além disso, o estadiamento clínico T2 esteve presente em 57,2% dos indivíduos. Dos pacientes que apresentavam metástases linfonodais, todos eles apresentavam macrometástases. Além disso, 52,4% destes pacientes realizaram radioterapia.

Tabela 5. Características clínico-patológicas dos 42 pacientes incluídos na fase de validação.

Características		n (%)
Sexo	Feminino	08 (19,0)
	Masculino	34 (81,0)
Tabagismo	Sim	28 (66,7)
	Não	11 (26,2)
	<i>Missing</i>	3 (7,1)
Etilismo	Sim	27 (64,3)
	Não	11 (26,2)
	<i>Missing</i>	04 (9,5)
Estadiamento clínico	cT1	18 (42,8)
	cT2	24 (57,2)
Metástase linfonodal (diagnóstico após a cirurgia)	Micrometástases	0 (0)
	Macrometástases	17 (100)
Radioterapia	Sim	22 (52,4)
	Não	20 (47,6)

5.3.2 Análise do perfil de expressão dos quatro miRNAs selecionados em amostras tumorais metastáticas e não metastáticas

O nível de expressão dos quatro miRNAs selecionados na primeira fase do estudo, foi avaliado em um grupo amostral de 25 amostras tumorais pN0 e 15 amostras tumorais pN+. Das amostras tumorais de pacientes sem metástase linfonodal (pN0), 05 foram utilizadas como grupo controle para normalização dos dados.

Os resultados mostraram que o miRNA hsa-miR-99a-5p apresentou expressão diferencial significativa entre o grupo de amostras tumorais com linfonodos metastáticos (pN+) e o grupo com tumores não metastáticos (pN0), indicando assim um possível biomarcador de metástase linfonodal ($p=0,0068$) (Figura 11B). Além disso, apesar do miRNA hsa-miR-1249-3p apresentar expressão nas amostras avaliadas, este resultado não apresentou diferença estatística significativa entre a expressão das amostras pN0 e pN+ ($p=0,69$) (Figura 11A). Em relação aos miRNAs hsa-miR-3202 e hsa-miR-548ad-3p, ambos não apresentaram expressão em nenhuma das amostras avaliadas.

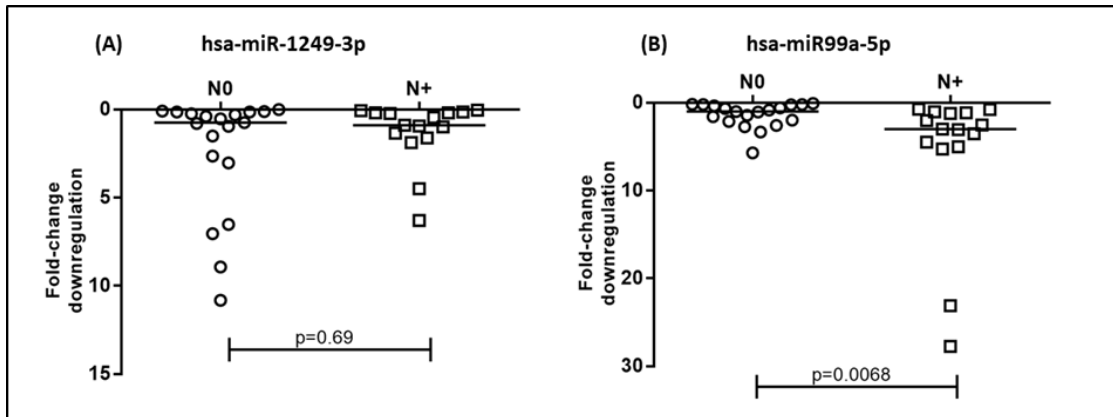


Figura 11. Distribuição da expressão relativa dos miRNAs hsa-miR-1249-3p (A) e hsa-miR-99a-5p (B) em amostras tumorais com metástase linfonodal (N+) e sem metástase linfonodal (N0). No eixo Y está representada a expressão relativa em *fold-change* ($2^{-\Delta\Delta C_t}$).

Os níveis de sensibilidade e especificidade foram calculados conforme a frequência de hipoexpressão do hsa-miR-99a-5p nas amostras pN0 e pN+. Para considerar o miRNA hipoexpresso, determinou-se arbitrariamente um *cutoff* <2 , o que significa que amostras com um *fold-change* <2 apresentam resultado negativo para o teste.

A avaliação da expressão dos miRNAs nas amostras avaliadas permitiu a construção de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) para determinar a AUC destes miRNAs (figura 12). O miRNA hsa-miR-99a-5p apresentou valor de AUC de 0,775 e a partir disto, foi possível determinar uma sensibilidade de 66%, especificidade de 73%, valor preditivo positivo de 66% (VPP), valor preditivo negativo (VPN) de 73% e acurácia de 70%. O miRNA hsa-miR-1249-3p não apresentou significância estatística na diferenciação entre os grupos amostrais estudados, apresentando um valor de AUC de 0,460.

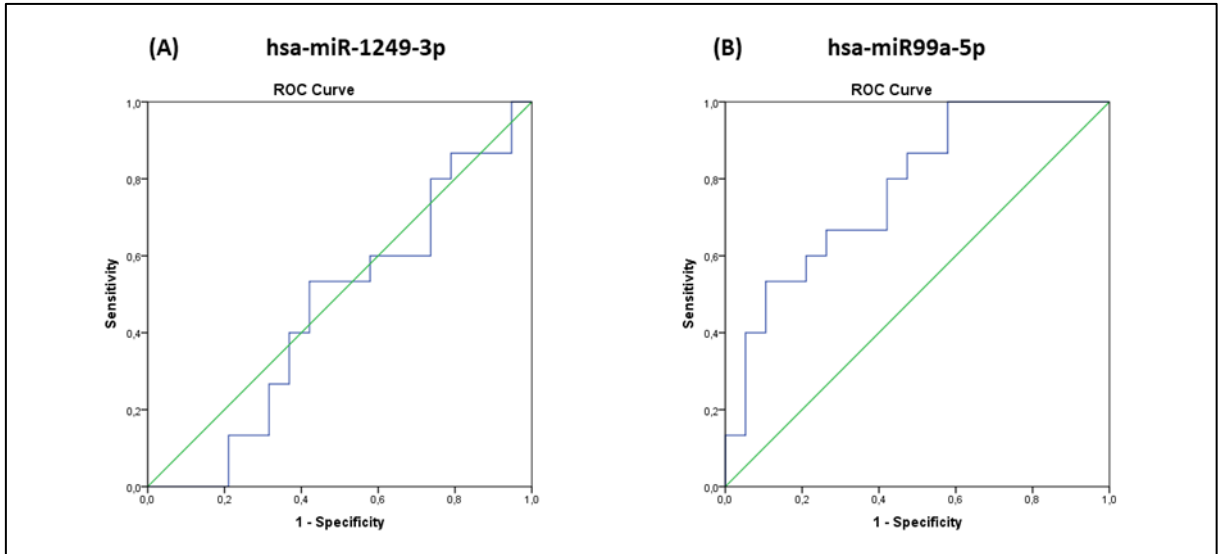


Figura 12. Curvas ROC obtidas para os miRNAs has-miR-1249-3p (A) e has-miR-99a-5p (B).

Assim, estes resultados indicam que o miRNA hsa-miR-99a-5p apresenta bons níveis de sensibilidade, especificidade, VPP, VPN, AUC e acurácia, sugerindo ser um bom marcador para diagnosticar amostras tumorais de pacientes com comprometimento metastático nos linfonodos.

5.4 Associação das variáveis clínicas, histopatológicas e terapêuticas com os resultados obtidos através das análises moleculares do miR-99a-5p na coorte de validação

A associação das variáveis clínicas, histopatológicas e terapêuticas com os resultados obtidos através das análises moleculares do miR99a-5p na coorte de validação mostrou que utilizando-se o mesmo cutoff de 2, para considerar o miRNA hipoexpresso (<2) e hiperexpresso (>2), nenhuma das variáveis avaliadas foi associada com o perfil de expressão. No entanto, 75% dos indivíduos sem extravasamento capsular apresentaram hiperexpressão deste miRNA com valor *borderline* de $p=0,056$, corroborando com os resultados anteriores que indicaram hiperexpressão do miR-99a-5p em linfonodos não metastáticos de pacientes com CECO.

Tabela 6. Resultados da análise univariada das características clínicas, patológicas e expressão do miR99a-5p dos 42 pacientes incluídos na fase de validação.

		miR-99a-5p		
		Low n (%)	High n (%)	P-value
Sexo	Feminino	3 (50,0)	3 (50,0)	1,000*
	Masculino	19 (57,6)	14(42,4)	
Tabagismo	Sim	18 (66,7)	9 (33,3)	0,089
	Não	4 (40,0)	6 (60,0)	
	<i>Missing</i>	0 (0,0)	2 (100)	
Etilismo	Sim	17 (63,0)	10 (37,0)	0,113
	Não	5 (55,6)	4 (44,4)	
	<i>Missing</i>	0 (0,0)	3 (100)	
Sítio	Língua	12 (50,0)	12 (50,0)	0,550
	Assoalho	7 (63,6)	4 (36,4)	
	Área retromolar	3 (75,0)	1 (25,0)	
Estadiamento patológico	pT1/T2 N0	16 (72,7)	6 (27,3)	0,129
	pT1/T2 N+	4 (33,3)	8 (66,7)	
	pT3/T4 N0	1 (50,0)	1 (50,0)	
	pT3/T4 N+	1 (33,3)	2 (66,7)	
Recidiva local	Sim	4 (80,0)	1 (20,0)	0,364*
	Não	17 (53,1)	15 (46,9)	
Invasão angiolinfática	Sim	2 (50,0)	2 (50,0)	0,919
	Não	18 (58,1)	13 (41,9)	
	<i>Missing</i>	2 (50,0)	2 (50,0)	
Invasão perineural	Sim	1 (20,0)	4 (80,0)	0,124
	Não	20 (64,5)	11 (35,5)	
	<i>Missing</i>	1 (33,3)	2 (66,7)	
Extravasamento capsular	Sim	3 (42,9)	4 (57,1)	0,056
	Não	2 (25,0)	6 (75,0)	
	<i>Missing</i>	17 (70,8)	7 (29,2)	

*Teste exato de Fisher

5.5 Validação *in silico* da expressão dos miRNAs selecionados no TCGA

Para a seleção da coorte a ser avaliada, foram aplicados os mesmos critérios de inclusão e exclusão deste estudo, descritos no item 4.5. A análise foi realizada para pacientes com carcinoma epidermóide de cavidade oral e com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço geral. Após a aplicação destes filtros, restaram 66 pacientes com CECO e 83 pacientes com CECP. A coorte de CECO estava contida na coorte de CECP, com alguns sítios adicionais. Ambas coortes foram utilizadas a fim de se confirmar a expressão destes miRNAs em outros sítios da cabeça e pescoço.

Os resultados de expressão para os miRNAs hsa-miR-3202 e hsa-miR548ad-3p, para as duas coortes estão demonstrados na figura 13. Devido aos valores de expressão do miR-548ad-3p serem iguais a 0, não foi possível calcular sua significância (p). Já o hsa-miR-3202 apresentou um $p=0,82$ nas amostras de CECO e $p=0,58$ nas amostras de CECP, não tendo diferença de expressão entre os grupos pN0 e pN+ e sendo expresso apenas em uma pequena parte das amostras avaliadas. Estes resultados confirmam a ausência de expressão destes miRNAs na coorte de validação do estudo avaliada por qPCR.

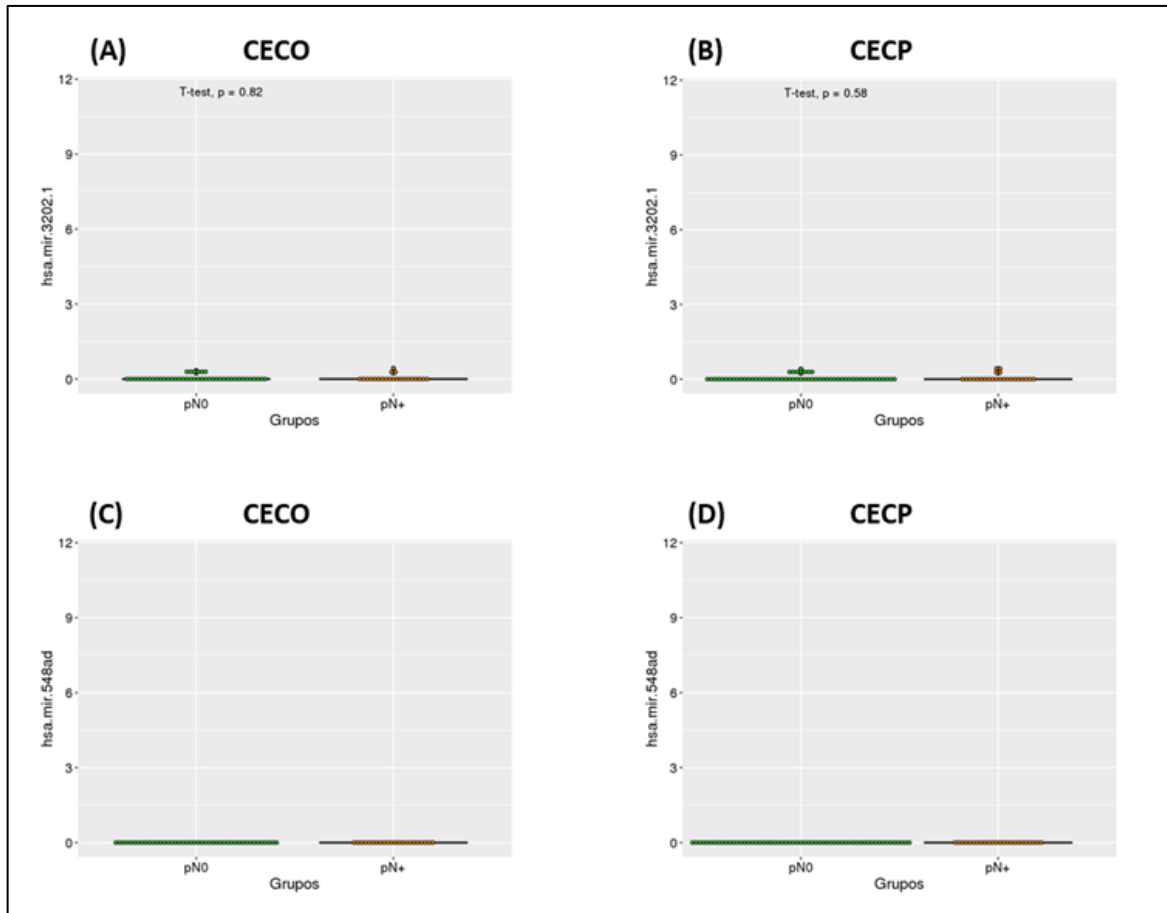


Figura 13. Dotplots gerados a partir dos dados de expressão dos miRNAs hsa-miR-3202 e hsa-miR-548ad-3p em coortes de CECP e CECO contidas no TCGA. **(A)** Expressão do hsa-miR-3202 em CECO. **(B)** Expressão do hsa-miR-3202 em CECP. **(C)** Expressão do hsa-miR-548ad-3p em CECO. **(D)** Expressão do hsa-miR-548ad-3p em CECP.

Os miRNAs hsa-miR-99a-5p (CECP: $p = 0,81$; CECO: $p = 0,57$) e hsa-miR-1249-3p (CECP: $p = 0,31$; CECO: $p = 0,26$) apresentaram expressão em ambos os tipos tumorais, porém esta expressão não foi estatisticamente significativa para diferenciar os pacientes com metástases linfonodais (pN+) dos pacientes sem metástases (pN0) (Figura 14).

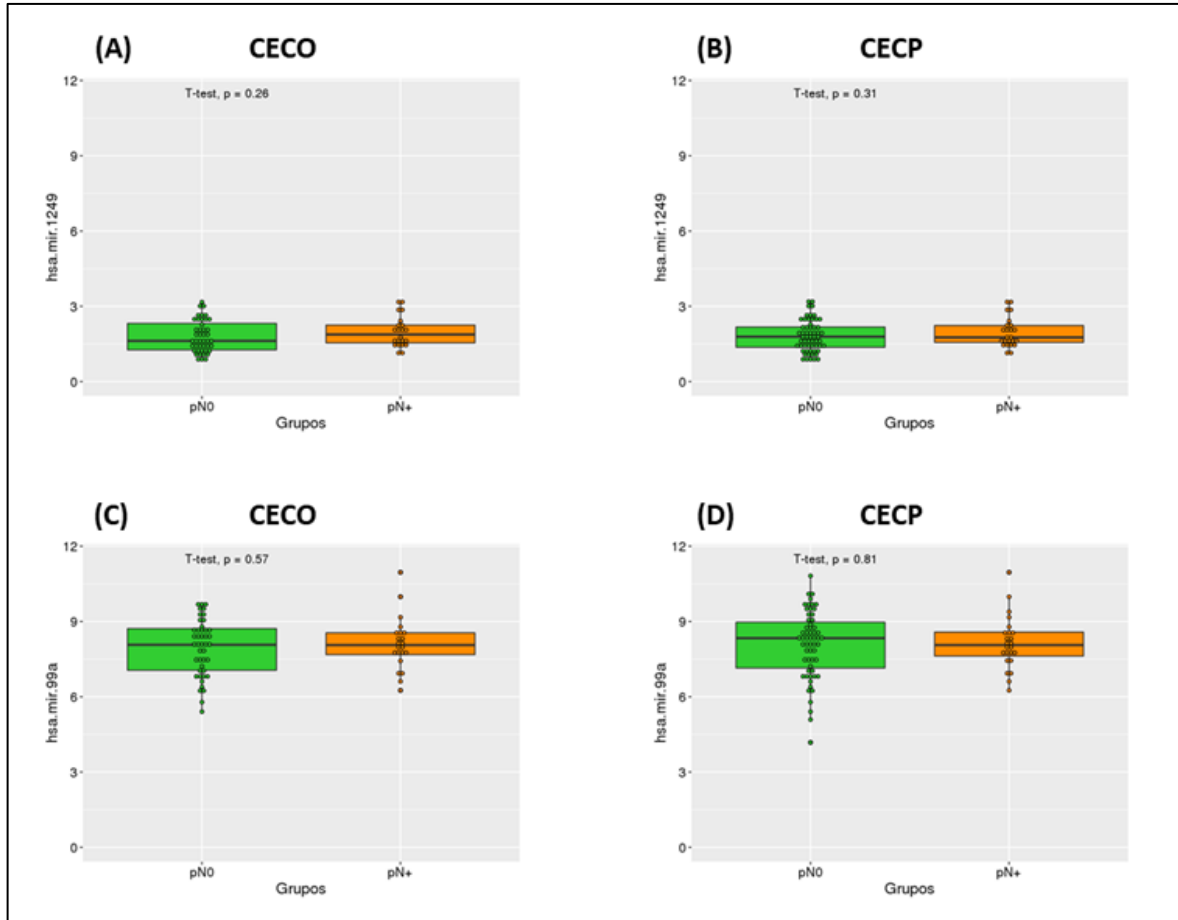


Figura 14. Dotplots gerados a partir dos dados de expressão dos miRNAs hsa-miR- 99a-5p e hsa-miR-1249-3p em coortes de CECP e CECE contidas no TCGA. **(A)** Expressão do hsa-miR-99a-5p em CECE. **(B)** Expressão do hsa-miR-99a-5p em CECP. **(C)** Expressão do hsa-miR-1249-3p em CECE. **(D)** Expressão do hsa-miR-1249-3p em CECP.

6. DISCUSSÃO

Apesar das diferentes estratégias utilizadas no tratamento dos tumores de carcinoma epidermóide de cavidade oral, a taxa de sobrevida global em cinco anos para estes pacientes é de 60%^{12, 13} e em pacientes com estadios iniciais pode chegar até a 80%^{10, 11}. Entretanto, pacientes que desenvolvem metástases linfonodais, além de apresentarem um pior prognóstico, tem uma taxa de controle da doença diminuída¹⁴. Assim, o diagnóstico de doença metastática nos linfonodos do pescoço se torna uma informação importante para a escolha da abordagem terapêutica e definição do prognóstico destes pacientes. Uma vez que o paciente apresenta metástase linfonodal, a abordagem terapêutica já é bem definida, onde o paciente é encaminhado para a ressecção dos linfonodos do pescoço seguida de radioterapia pós-operatória. Contudo, o tratamento dos pacientes sem evidências clínicas de metástases linfonodais ainda é controverso.

Pacientes com tumores em estadios iniciais clinicamente livres de metástase linfonodal, passam por um estadiamento cirúrgico dos linfonodos do pescoço, por meio da realização da pesquisa do linfonodo sentinela ou do esvaziamento cervical eletivo³⁴. O esvaziamento cervical eletivo é uma técnica na qual os pacientes são submetidos à remoção dos linfonodos do pescoço, e estes linfonodos passam por uma avaliação histopatológica para detecção de metástase. Na pesquisa do linfonodo sentinela é retirado um número menor de linfonodos, onde injeta-se um corante no tumor primário, e pressupõe-se que este corante seguirá o padrão de drenagem do tumor até os linfonodos do pescoço que possam estar comprometidos por metástase, e apenas os linfonodos marcados são ressecados^{29, 30}. A escolha da abordagem (PLS ou ECE) leva em consideração as características do tumor, como tamanho, sublocalização e perfil de invasão, por exemplo¹⁰⁸.

Dos pacientes clinicamente livres de metástase linfonodal, 70 a 80% são submetidos a estadiamento cirúrgico do pescoço, porém muitos acabam não tendo estadiamento patológico positivo^{22, 38}, o que indica a importância de buscar biomarcadores sensíveis e específicos que consigam auxiliar na escolha da conduta terapêutica mais apropriada para o correto estadiamento cervical destes pacientes.

Este estudo teve como objetivo encontrar um miRNA expresso em amostras de pacientes com CECO que pudesse diferenciar pacientes com e sem metástase linfonodal. Estudos já mostram que esta é uma abordagem possível de se realizar em amostras incluídas

em parafina, pois devido a sua grande estabilidade, seu perfil de expressão se mantém constante^{109, 110}. Além disso, devido às funções que desempenham (proliferação, invasão tumoral, metabolismo, inflamação, diferenciação celular, angiogênese, estabilidade do genoma)¹¹¹ possuem uma grande importância no processo carcinogênico, o que indica um bom potencial diagnóstico.

Em carcinoma epidermóide de cavidade oral, existem alguns estudos que trazem miRNAs como marcadores de diagnóstico^{67, 112-115}, prognóstico^{113, 115-120}, resposta a tratamento^{118,119, 121}, migração e invasão¹²². Além disso, um estudo publicado em 2011, trouxe o miR-181 como um biomarcador putativo para metástase linfonodal, onde foram avaliadas amostras tumorais e amostras normais adjacentes de 39 pacientes com CECCO¹²³. O alto nível de expressão deste miRNA foi correlacionado com o desenvolvimento de metástase linfonodal, invasão vascular e pior prognóstico, porém estes achados não foram validados¹²³.

Em um estudo retrospectivo realizado em nossa instituição em 2015, o miR-203 e o miR-205 foram apresentados como marcadores acurados para a detecção de metástase linfonodal em linfonodos de pacientes com CECCP, porém este teste visava a detecção dos alvos nos linfonodos. O presente estudo propõe uma abordagem que identifique estes marcadores nas amostras do tumor primário, podendo auxiliar os médicos em uma melhor decisão terapêutica para tratamento dos linfonodos do pescoço⁶⁸.

No presente foram avaliadas amostras de tumores primários de pacientes com CECCO em estadios iniciais e clinicamente livres de metástases linfonodais, onde foi possível encontrar 4 miRNAs diferencialmente expressos na fase de *screening* do trabalho. Destes 4 miRNAs, o hsa-miR-99a-5p apresentou um perfil de expressão diferencial entre as amostras dos pacientes com e sem metástases linfonodais, com potencial sensível e específico para diferenciar os pacientes sem evidência alguma de metástases cervicais, o que pouparia o estadiamento cirúrgico aqueles pacientes que são verdadeiramente negativos para estas metástases.

Estudos demonstram que este miRNA possui expressão diminuída em tumores orais humanos em comparação com amostras normais¹¹³, e que sua superexpressão regulou negativamente o gene NOX4, diminuindo a expressão da proteína NOX4 (NADPH Oxidase 4), e inibindo a viabilidade, migração e diminuiu da proliferação de células tumorais¹²⁴. Além disso, por meio de uma Análise Interativa de Perfis de Expressão Gênica (GEPIA), detectou-se que o miRNA hsa-miR-99a-5p teve influência na progressão do CECCP através da regulação da

via de sinalização PI3k-AKT, devido aos principais genes alvo serem regulados positivamente em 519 tecidos de CECP, em comparação a 44 tecidos normais¹²⁵.

O presente estudo não avaliou amostras livres de neoplasia, porém a expressão do hsa-miR-99a-5p foi maior nos pacientes sem metástase linfonodal em comparação com os pacientes com metástases. Além disso, já foi demonstrado que sua expressão é mais elevada em pacientes com neoplasias de baixo grau histológico¹²⁵, o que corrobora com o presente resultado, pois esta coorte era composta por amostras tumorais clinicamente em estádios iniciais (T1/T2).

Em relação ao miRNA hsa-miR-1249-3p, o mesmo apresentou expressão nas amostras avaliadas, porém não teve uma expressão diferencialmente significativa, indicando que o que mesmo não seja candidato a biomarcador. Este miRNA foi apenas descrito como um possível biomarcador para Esclerose Lateral Amiotrófica, sem estudos em câncer¹²⁶.

Os miRNAs hsa-miR-3202 e hsa-miR548ad-3p não apresentaram expressão em nenhuma das amostras avaliadas, e não existem estudos que os correlacionem com o tipo tumoral aqui estudado. O hsa-miR-3202 já foi descrito como biomarcador de Doença Pulmomar Obstrutiva Crônica (DPOC)¹²⁷, e correlacionado ao desenvolvimento de câncer de pulmão^{128, 129}. Já o hsa-miR-548ad-3p não está descrito na literatura como sendo relacionado a nenhum tipo tumoral, porém um estudo publicado em 2010 analisou células B humanas normais e malignas e teve este miRNA identificado¹³⁰. Estes dois miRNAs apresentaram expressão diferencial apenas na fase inicial (*screening*), tendo sido avaliados pela técnica de *nanoString*, que é uma técnica muito sensível, fazendo com que baixas expressões pudessem ser detectadas. Ambos miRNAs tiveram expressão muito baixa ou ausente nas amostras avaliadas pelo TCGA.

Cabe ainda ressaltar a importância de estudos em diferentes coortes a fim de confirmar este miRNA como marcador efetivo para predição de metástase linfonodal em pacientes com CECP, podendo auxiliar no manejo correto destes pacientes, na indicação de prognóstico e na melhoria da qualidade de vida e sobrevida destes pacientes.

7 CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou que existem alterações na expressão de miRNAs presentes em tumores de pacientes com CECO clinicamente livres de metástase, que foram capazes de distinguir casos com linfonodos patologicamente positivos dos casos patologicamente negativos.

A associação das variáveis clínicas, histopatológicas e terapêuticas com os resultados obtidos através das análises moleculares do miR99a-5p na coorte de validação não apresentou nenhum resultado estatístico significativo.

O miRNA hsa-miR-99a-5p apresentou uma expressão diferencial significativa em tumores de pacientes com CECO entre o grupo de pacientes com linfonodos metastáticos e não metastáticos. Este miRNA apresentou padrões de expressão diferencial no grupo de pacientes com ausência de linfonodos comprometidos, o que faz com que o uso deste miRNA em conjunto com as técnicas convencionais empregadas atualmente, constitua uma ferramenta útil que pode auxiliar os médicos nas decisões de esvaziamento cervical dos pacientes em questão.

8 REFERÊNCIAS

1. 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;68(6):394-424.
2. Perez-Sayans M, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F, Reboiras-Lopez MD, Gandara Rey JM, Garcia-Garcia A. *Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review)*. **Oncol Rep**. 2009;22(6):1277-82.
3. Estimativa I. *Incidência de câncer no Brasil [Internet]*. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. 2017. 130 p. 2018.
4. Fronie A, Bunget A, Afrem E, Preotescu LL, Corlan Puscu D, Streba L, et al. *Squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinical and pathological aspects*. **Rom J Morphol Embryol**. 2013;54(2):343-8.
5. Dhull AK, Atri R, Dhankhar R, Chauhan AK, Kaushal V. *Major Risk Factors in Head and Neck Cancer: A Retrospective Analysis of 12-Year Experiences*. **World J Oncol**. 2018;9(3):80-4.
6. IARC. *Alcohol drinking. Epidemiological studies of cancer in humans*. **IARC Monogr Eval Carcinog Risks Hum**. 1988;44:153-250.
7. Ramos-Garcia P, Gil-Montoya JA, Scully C, Ayen A, Gonzalez-Ruiz L, Navarro-Trivino FJ, et al. *An update on the implications of cyclin D1 in oral carcinogenesis*. **Oral Dis**. 2017;23(7):897-912.
8. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation*. **Cell**. 2011;144(5):646-74.
9. Hema KN, Smitha T, Sheethal HS, Mirnalini SA. *Epigenetics in oral squamous cell carcinoma*. **J Oral Maxillofac Pathol**. 2017;21(2):252-9.
10. Le Campion A, Ribeiro CMB, Luiz RR, da Silva Junior FF, Barros HCS, Dos Santos KCB, et al. *Low Survival Rates of Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma*. **Int J Dent**. 2017;2017:5815493.
11. Pedersen NJ, Jensen DH, Lelkaitis G, Kiss K, Charabi B, Specht L, et al. *Construction of a pathological risk model of occult lymph node metastases for prognostication by semi-automated image analysis of tumor budding in early-stage oral squamous cell carcinoma*. **Oncotarget**. 2017;8(11):18227-37.

12. 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.
13. Markopoulos AK. *Current aspects on oral squamous cell carcinoma.* **Open Dent J.** 2012;6:126-30.
14. Greenberg JS, El Naggar AK, Mo V, Roberts D, Myers JN. *Disparity in pathologic and clinical lymph node staging in oral tongue carcinoma. Implication for therapeutic decision making.* **Cancer.** 2003;98(3):508-15.
15. Greenberg JS, Fowler R, Gomez J, Mo V, Roberts D, El Naggar AK, et al. *Extent of extracapsular spread: a critical prognosticator in oral tongue cancer.* **Cancer.** 2003;97(6):1464-70.
16. Teichgraeber JF, Clairmont AA. *The incidence of occult metastases for cancer of the oral tongue and floor of the mouth: treatment rationale.* **Head Neck Surg.** 1984;7(1):15-21.
17. Keski-Santti H, Atula T, Tornwall J, Koivunen P, Makitie A. *Elective neck treatment versus observation in patients with T1/T2 N0 squamous cell carcinoma of oral tongue.* **Oral Oncol.** 2006;42(1):96-101.
18. Ross GL, Soutar DS, MacDonald DG, Shoaib T, Camilleri IG, Robertson AG. *Improved staging of cervical metastases in clinically node-negative patients with head and neck squamous cell carcinoma.* **Ann Surg Oncol.** 2004;11(2):213-8.
19. Bilde A, von Buchwald C, Johansen J, Bastholt L, Sorensen JA, Marker P, et al. *The Danish national guidelines for treatment of oral squamous cell carcinoma.* **Acta Oncol.** 2006;45(3):294-9.
20. Takes RP. *Staging of the neck in patients with head and neck squamous cell cancer: imaging techniques and biomarkers.* **Oral Oncol.** 2004;40(7):656-67.
21. Shores CG, Yin X, Funkhouser W, Yarbrough W. *Clinical evaluation of a new molecular method for detection of micrometastases in head and neck squamous cell carcinoma.* **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 2004;130(8):937-42.
22. Shah JP. *Patterns of cervical lymph node metastasis from squamous carcinomas of the upper aerodigestive tract.* **Am J Surg.** 1990;160(4):405-9.
23. Ferlito A, Rinaldo A, Silver CE, Gourin CG, Shah JP, Clayman GL, et al. *Elective and therapeutic selective neck dissection.* **Oral Oncol.** 2006;42(1):14-25.

24. Wei WI, Ferlito A, Rinaldo A, Gourin CG, Lowry J, Ho WK, et al. *Management of the NO neck--reference or preference.* **Oral Oncol.** 2006;42(2):115-22.
25. Rhee D, Wenig BM, Smith RV. *The significance of immunohistochemically demonstrated nodal micrometastases in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck.* **Laryngoscope.** 2002;112(11):1970-4.
26. Thomsen JB, Sorensen JA, Krogdahl A. *Sentinel lymph nodes in cancer of the oral cavity -- isolated tumour cells.* **J Oral Pathol Med.** 2005;34(2):65-9.
27. Broglie MA, Haerle SK, Huber GF, Haile SR, Stoeckli SJ. *Occult metastases detected by sentinel node biopsy in patients with early oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: impact on survival.* **Head Neck.** 2013;35(5):660-6.
28. D'Cruz AK, Vaish R, Kapre N, Dandekar M, Gupta S, Hawaldar R, et al. *Elective versus Therapeutic Neck Dissection in Node-Negative Oral Cancer.* **N Engl J Med.** 2015;373(6):521-9.
29. Alkureishi LW, Ross GL, Shoaib T, Soutar DS, Robertson AG, Thompson R, et al. *Sentinel node biopsy in head and neck squamous cell cancer: 5-year follow-up of a European multicenter trial.* **Ann Surg Oncol.** 2010;17(9):2459-64.
30. Civantos FJ, Zitsch RP, Schuller DE, Agrawal A, Smith RB, Nason R, et al. *Sentinel lymph node biopsy accurately stages the regional lymph nodes for T1-T2 oral squamous cell carcinomas: results of a prospective multi-institutional trial.* **J Clin Oncol.** 2010;28(8):1395-400.
31. Flach GB, Bloemena E, Klop WM, van Es RJ, Schepman KP, Hoekstra OS, et al. *Sentinel lymph node biopsy in clinically NO T1-T2 staged oral cancer: the Dutch multicenter trial.* **Oral Oncol.** 2014;50(10):1020-4.
32. Murer K, Huber GF, Haile SR, Stoeckli SJ. *Comparison of morbidity between sentinel node biopsy and elective neck dissection for treatment of the n0 neck in patients with oral squamous cell carcinoma.* **Head Neck.** 2011;33(9):1260-4.
33. Fidler IJ. *The organ microenvironment and cancer metastasis.* **Differentiation.** 2002;70(9-10):498-505.
34. Colevas AD, Yom SS, Pfister DG, Spencer S, Adelstein D, Adkins D, et al. *NCCN Guidelines Insights: Head and Neck Cancers, Version 1.2018.* **J Natl Compr Canc Netw.** 2018;16(5):479-90.
35. Stoeckli SJ. *Sentinel node biopsy for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma of the head and neck.* **Laryngoscope.** 2007;117(9):1539-51.

36. Kontio R, Leivo I, Leppanen E, Atula T. *Sentinel lymph node biopsy in oral cavity squamous cell carcinoma without clinically evident metastasis*. **Head Neck**. 2004;26(1):16-21.
37. Ross G. *Rationale for sentinel node biopsy to stage NO head and neck squamous-cell carcinoma*. **Cancer Biother Radiopharm**. 2004;19(3):273-84.
38. Hart RD, Nasser JG, Trites JR, Taylor SM, Bullock M, Barnes D. *Sentinel lymph node biopsy in NO squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx*. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**. 2005;131(1):34-8.
39. Kovacs AF, Landes CA, Hamscho N, Risse JH, Berner U, Menzel C. *Sentinel node biopsy as staging tool in a multimodality treatment approach to cancer of the oral cavity and the oropharynx*. **Otolaryngol Head Neck Surg**. 2005;132(4):570-6.
40. Peinado H, Lavotshkin S, Lyden D. *The secreted factors responsible for pre-metastatic niche formation: old sayings and new thoughts*. **Semin Cancer Biol**. 2011;21(2):139-46.
41. Paget S. *The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889*. **Cancer Metastasis Rev**. 1989;8(2):98-101.
42. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular e molecular: Elsevier Brasil*; 2015.
43. Alitalo K. *The lymphatic vasculature in disease*. **Nat Med**. 2011;17(11):1371-80.
44. Stacker SA, Williams SP, Karnezis T, Shayan R, Fox SB, Achen MG. *Lymphangiogenesis and lymphatic vessel remodelling in cancer*. **Nat Rev Cancer**. 2014;14(3):159-72.
45. Gowans JL, Knight EJ. *THE ROUTE OF RE-CIRCULATION OF LYMPHOCYTES IN THE RAT*. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**. 1964;159:257-82.
46. Marchesi VT, Gowans JL. *THE MIGRATION OF LYMPHOCYTES THROUGH THE ENDOTHELIUM OF VENULES IN LYMPH NODES: AN ELECTRON MICROSCOPE STUDY*. **Proc R Soc Lond B Biol Sci**. 1964;159:283-90.
47. Thomsen JB, Christensen RK, Sorensen JA, Krogdahl A. *Sentinel lymph nodes in cancer of the oral cavity: is central step-sectioning enough?* **J Oral Pathol Med**. 2007;36(7):425-9.
48. Kligerman J, Lima RA, Soares JR, Prado L, Dias FL, Freitas EQ, et al. *Supraomohyoid neck dissection in the treatment of T1/T2 squamous cell carcinoma of oral cavity*. **Am J Surg**. 1994;168(5):391-4.

49. Huang SH, Hwang D, Lockwood G, Goldstein DP, O'Sullivan B. *Predictive value of tumor thickness for cervical lymph-node involvement in squamous cell carcinoma of the oral cavity: a meta-analysis of reported studies.* **Cancer.** 2009;115(7):1489-97.
50. Chinn SB, Spector ME, Bellile EL, McHugh JB, Gernon TJ, Bradford CR, et al. *Impact of perineural invasion in the pathologically NO neck in oral cavity squamous cell carcinoma.* **Otolaryngol Head Neck Surg.** 2013;149(6):893-9.
51. Goerkem M, Braun J, Stoeckli SJ. *Evaluation of clinical and histomorphological parameters as potential predictors of occult metastases in sentinel lymph nodes of early squamous cell carcinoma of the oral cavity.* **Ann Surg Oncol.** 2010;17(2):527-35.
52. Strimbu K, Tavel JA. *What are biomarkers?* **Curr Opin HIV AIDS.** 2010;5(6):463-6.
53. Li Y, Bai S, Carroll W, Dayan D, Dort JC, Heller K, et al. *Validation of the risk model: high-risk classification and tumor pattern of invasion predict outcome for patients with low-stage oral cavity squamous cell carcinoma.* **Head Neck Pathol.** 2013;7(3):211-23.
54. Mendez E, Lohavanichbutr P, Fan W, Houck JR, Rue TC, Doody DR, et al. *Can a metastatic gene expression profile outperform tumor size as a predictor of occult lymph node metastasis in oral cancer patients?* **Clin Cancer Res.** 2011;17(8):2466-73.
55. Onken MD, Winkler AE, Kanchi KL, Chalivendra V, Law JH, Rickert CG, et al. *A surprising cross-species conservation in the genomic landscape of mouse and human oral cancer identifies a transcriptional signature predicting metastatic disease.* **Clin Cancer Res.** 2014;20(11):2873-84.
56. Fukano H, Matsuura H, Hasegawa Y, Nakamura S. *Depth of invasion as a predictive factor for cervical lymph node metastasis in tongue carcinoma.* **Head Neck.** 1997;19(3):205-10.
57. Kane SV, Gupta M, Kakade AC, A DC. *Depth of invasion is the most significant histological predictor of subclinical cervical lymph node metastasis in early squamous carcinomas of the oral cavity.* **Eur J Surg Oncol.** 2006;32(7):795-803.
58. Sparano A, Weinstein G, Chalian A, Yodul M, Weber R. *Multivariate predictors of occult neck metastasis in early oral tongue cancer.* **Otolaryngol Head Neck Surg.** 2004;131(4):472-6.
59. van Hooff SR, Leusink FK, Roepman P, Baatenburg de Jong RJ, Speel EJ, van den Brekel MW, et al. *Validation of a gene expression signature for assessment of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma.* **J Clin Oncol.** 2012;30(33):4104-10.
60. Esquela-Kerscher A, Slack FJ. *Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.* **Nat Rev Cancer.** 2006;6(4):259-69.

61. Li N, Xie C, Lu N. *Crosstalk between Hippo signalling and miRNAs in tumour progression*. **Febs j**. 2017;284(7):1045-55.
62. Tutar Y. *miRNA and cancer; computational and experimental approaches*. **Curr Pharm Biotechnol**. 2014;15(5):429.
63. Palmero EI, de Campos SG, Campos M, de Souza NC, Guerreiro ID, Carvalho AL, et al. *Mechanisms and role of microRNA deregulation in cancer onset and progression*. **Genet Mol Biol**. 2011;34(3):363-70.
64. Kumarasamy C, Devi A, Jayaraj R. *Prognostic value of microRNAs in head and neck cancers: a systematic review and meta-analysis protocol*. **Syst Rev**. 2018;7(1):150.
65. Dong Y, Zheng Y, Wang C, Ding X, Du Y, Liu L, et al. *MiR-876-5p modulates head and neck squamous cell carcinoma metastasis and invasion by targeting vimentin*. **Cancer Cell Int**. 2018;18:121.
66. Hersi HM, Raulf N, Gaken J, Folarin N, Tavassoli M. *MicroRNA-9 inhibits growth and invasion of head and neck cancer cells and is a predictive biomarker of response to plerixafor, an inhibitor of its target CXCR4*. **Mol Oncol**. 2018;12(12):2023-41.
67. Chang YA, Weng SL, Yang SF, Chou CH, Huang WC, Tu SJ, et al. *A Three-MicroRNA Signature as a Potential Biomarker for the Early Detection of Oral Cancer*. **Int J Mol Sci**. 2018;19(3).
68. de Carvalho AC, Scapulatempo-Neto C, Maia DC, Evangelista AF, Morini MA, Carvalho AL, et al. *Accuracy of microRNAs as markers for the detection of neck lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma*. **BMC Med**. 2015;13:108.
69. Cao M, Zheng L, Liu J, Dobleman T, Hu S, Go VLW, et al. *MicroRNAs as effective surrogate biomarkers for early diagnosis of oral cancer*. **Clin Oral Investig**. 2018;22(2):571-81.
70. Carthew RW, Sontheimer EJ. *Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs*. **Cell**. 2009;136(4):642-55.
71. Zhao B, Yang Y, Wang X, Chong Z, Yin R, Song SH, et al. *Redox-active quinones induces genome-wide DNA methylation changes by an iron-mediated and Tet-dependent mechanism*. **Nucleic Acids Res**. 2014;42(3):1593-605.
72. Carleton M, Cleary MA, Linsley PS. *MicroRNAs and cell cycle regulation*. **Cell Cycle**. 2007;6(17):2127-32.

73. Georges SA, Biery MC, Kim SY, Schelter JM, Guo J, Chang AN, et al. *Coordinated regulation of cell cycle transcripts by p53-Inducible microRNAs, miR-192 and miR-215*. **Cancer Res.** 2008;68(24):10105-12.
74. Chen CZ, Lodish HF. *MicroRNAs as regulators of mammalian hematopoiesis*. **Semin Immunol.** 2005;17(2):155-65.
75. Rhoades MW, Reinhart BJ, Lim LP, Burge CB, Bartel B, Bartel DP. *Prediction of plant microRNA targets*. **Cell.** 2002;110(4):513-20.
76. Aravin AA, Hannon GJ, Brennecke J. *The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race*. **Science.** 2007;318(5851):761-4.
77. Bartel DP. *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. **Cell.** 2004;116(2):281-97.
78. Bartel DP. *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. **Cell.** 2009;136(2):215-33.
79. Ha M, Kim VN. *Regulation of microRNA biogenesis*. **Nat Rev Mol Cell Biol.** 2014;15(8):509-24.
80. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. **Embo j.** 2002;21(17):4663-70.
81. Oszolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, et al. *Chromatin structure analyses identify miRNA promoters*. **Genes Dev.** 2008;22(22):3172-83.
82. Monteys AM, Spengler RM, Wan J, Tecedor L, Lennox KA, Xing Y, et al. *Structure and activity of putative intronic miRNA promoters*. **Rna.** 2010;16(3):495-505.
83. Berezikov E, van Tetering G, Verheul M, van de Belt J, van Laake L, Vos J, et al. *Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis*. 2006;16(10):1289-98.
84. Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJJN. *A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis*. 2010;465(7298):584.
85. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai ECJC. *The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila*. 2007;130(1):89-100.

86. Kim Y-K, Kim B, Kim VNJPotNAoS. *Re-evaluation of the roles of DROSHA, Exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis*. 2016;113(13):E1881-E9.
87. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. *Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing*. **Nature**. 2007;448(7149):83-6.
88. Nguyen TA, Jo MH, Choi YG, Park J, Kwon SC, Hohng S, et al. *Functional Anatomy of the Human Microprocessor*. **Cell**. 2015;161(6):1374-87.
89. Okada C, Yamashita E, Lee SJ, Shibata S, Katahira J, Nakagawa A, et al. *A high-resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery*. **Science**. 2009;326(5957):1275-9.
90. Iwakawa HO, Tomari Y. *The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression*. **Trends Cell Biol**. 2015;25(11):651-65.
91. Ameres SL, Zamore PD. *Diversifying microRNA sequence and function*. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2013;14(8):475-88.
92. He L, Hannon GJ. *MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation*. **Nat Rev Genet**. 2004;5(7):522-31.
93. Abdelfattah AM, Park C, Choi MY. *Update on non-canonical microRNAs*. **Biomol Concepts**. 2014;5(4):275-87.
94. Pong SK, Gullerova M. *Noncanonical functions of microRNA pathway enzymes - Drosha, DGCR8, Dicer and Ago proteins*. **FEBS Lett**. 2018;592(17):2973-86.
95. Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. *A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets*. 2006;103(7):2257-61.
96. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. **Nature**. 2005;435(7043):834-8.
97. Hammond SM. *Soaking up small RNAs*. **Nat Methods**. 2007;4(9):694-5.
98. Casado Alves CD, de Castro Capuzzo R, Timóteo da Rocha E, Scapulatempo Neto C, Boldrini Júnior D, dos Santos CR, et al. *Pesquisa do linfonodo sentinela em carcinomas espinocelulares de cavidade oral classificados como T1 e T2 N0*. 2011;40(4).

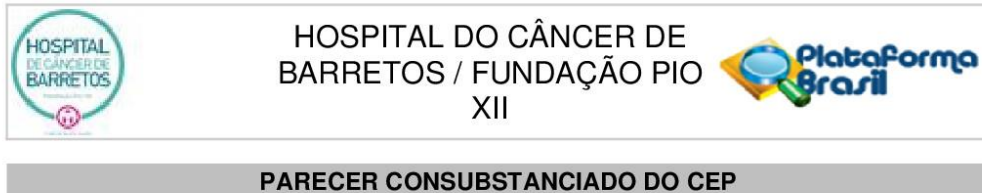
99. Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE. *Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues*. **J Mol Diagn**. 2008;10(3):203-11.
100. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, et al. *Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples*. **Rna**. 2007;13(10):1668-74.
101. Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, et al. *Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas*. **Clin Cancer Res**. 2010;16(4):1129-39.
102. Villaruz LC, Huang G, Romkes M, Kirkwood JM, Buch SC, Nukui T, et al. *MicroRNA expression profiling predicts clinical outcome of carboplatin/paclitaxel-based therapy in metastatic melanoma treated on the ECOG-ACRIN trial E2603*. **Clin Epigenetics**. 2015;7:58.
103. Waggott D, Chu K, Yin S, Wouters BG, Liu FF, Boutros PC. *NanoStringNorm: an extensible R package for the pre-processing of NanoString mRNA and miRNA data*. **Bioinformatics**. 2012;28(11):1546-8.
104. Livak KJ, Schmittgen TD. *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-Delta Delta C(T)} Method*. **Methods**. 2001;25(4):402-8.
105. Wang H, Horbinski C, Wu H, Liu Y, Sheng S, Liu J, et al. *NanoStringDiff: a novel statistical method for differential expression analysis based on NanoString nCounter data*. **Nucleic Acids Res**. 2016;44(20):e151.
106. Goldman M, Craft B, Hastie M, Repčeka K, Kamath A, McDade F, et al. *The UCSC Xena platform for public and private cancer genomics data visualization and interpretation*. 2019:326470.
107. Hicks SC, Irizarry RA. *quantro: a data-driven approach to guide the choice of an appropriate normalization method*. **Genome Biol**. 2015;16:117.
108. Shimamoto H, Oikawa Y, Osako T, Hirai H, Mochizuki Y, Tanaka K, et al. *Neck failure after elective neck dissection in patients with oral squamous cell carcinoma*. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. 2017;124(1):32-6.
109. Nagy ZB, Wichmann B, Kalmar A, Bartak BK, Tulassay Z, Molnar B. *miRNA Isolation from FFPE Specimen: A Technical Comparison of miRNA and Total RNA Isolation Methods*. **Pathol Oncol Res**. 2016;22(3):505-13.
110. Bovell L, Shanmugam C, Katkoori VR, Zhang B, Vogtman E, Grizzle WE, et al. *miRNAs are stable in colorectal cancer archival tissue blocks*. **Front Biosci (Elite Ed)**. 2012;4:1937-40.

111. Lin S, Gregory RI. *MicroRNA biogenesis pathways in cancer*. **Nat Rev Cancer**. 2015;15(6):321-33.
112. Pedersen NJ, Jensen DH, Lelkaitis G, Kiss K, Charabi BW, Ullum H, et al. *MicroRNA-based classifiers for diagnosis of oral cavity squamous cell carcinoma in tissue and plasma*. **Oral Oncol**. 2018;83:46-52.
113. Chen L, Hu J, Pan L, Yin X, Wang Q, Chen H. *Diagnostic and prognostic value of serum miR-99a expression in oral squamous cell carcinoma*. **Cancer Biomark**. 2018;23(3):333-9.
114. Sun G, Cao Y, Wang P, Song H, Bie T, Li M, et al. *miR-200b-3p in plasma is a potential diagnostic biomarker in oral squamous cell carcinoma*. **Biomarkers**. 2018;23(2):137-41.
115. Xu H, Yang Y, Zhao H, Yang X, Luo Y, Ren Y, et al. *Serum miR-483-5p: a novel diagnostic and prognostic biomarker for patients with oral squamous cell carcinoma*. **Tumour Biol**. 2016;37(1):447-53.
116. Jakob M, Mattes LM, Kuffer S, Unger K, Hess J, Bertlich M, et al. *MicroRNA expression patterns in oral squamous cell carcinoma: hsa-mir-99b-3p and hsa-mir-100-5p as novel prognostic markers for oral cancer*. **Head Neck**. 2019.
117. Moratin J, Hartmann S, Brands RC, Horn D, Fuchs A, Mutzbauer G, et al. *MicroRNA expression correlates with disease recurrence and overall survival in oral squamous cell carcinoma*. **J Craniomaxillofac Surg**. 2019;47(3):523-9.
118. Nakashima H, Yoshida R, Hirose A, Kawahara K, Sakata J, Arita H, et al. *Circulating miRNA-1290 as a potential biomarker for response to chemoradiotherapy and prognosis of patients with advanced oral squamous cell carcinoma: A single-center retrospective study*. **Tumour Biol**. 2019;41(3):1010428319826853.
119. Mazumder S, Datta S, Ray JG, Chaudhuri K, Chatterjee R. *Liquid biopsy: miRNA as a potential biomarker in oral cancer*. **Cancer Epidemiol**. 2019;58:137-45.
120. Kim H, Yang JM, Ahn SH, Jeong WJ, Chung JH, Paik JH. *Potential Oncogenic Role and Prognostic Implication of MicroRNA-155-5p in Oral Squamous Cell Carcinoma*. **Anticancer Res**. 2018;38(9):5193-200.
121. Lu M, Wang C, Chen W, Mao C, Wang J. *miR-654-5p Targets GRAP to Promote Proliferation, Metastasis, and Chemoresistance of Oral Squamous Cell Carcinoma Through Ras/MAPK Signaling*. **DNA Cell Biol**. 2018;37(4):381-8.

122. Guo Y, Qiao X, Zhu L, Song R. *MicroRNA-182-5p Modulates Oral Squamous Cell Carcinoma Migration and Invasion Via Targeting MTSS1 Gene*. **Pathol Oncol Res**. 2019.
123. Yang CC, Hung PS, Wang PW, Liu CJ, Chu TH, Cheng HW, et al. *miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma*. **J Oral Pathol Med**. 2011;40(5):397-404.
124. Shi Y, Bo Z, Pang G, Qu X, Bao W, Yang L, et al. *MiR-99a-5p regulates proliferation, migration and invasion abilities of human oral carcinoma cells by targeting NOX4*. **Neoplasma**. 2017;64(5):666-73.
125. Chen YT, Yao JN, Qin YT, Hu K, Wu F, Fang YY. *Biological role and clinical value of miR-99a-5p in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC): A bioinformatics-based study*. **FEBS Open Bio**. 2018;8(8):1280-98.
126. Matamala JM, Arias-Carrasco R, Sanchez C, Uhrig M, Bargsted L, Matus S, et al. *Genome-wide circulating microRNA expression profiling reveals potential biomarkers for amyotrophic lateral sclerosis*. **Neurobiol Aging**. 2018;64:123-38.
127. Shen W, Liu J, Fan M, Wang S, Zhang Y, Wen L, et al. *MiR-3202 protects smokers from chronic obstructive pulmonary disease through inhibiting FAIM2: An in vivo and in vitro study*. **Exp Cell Res**. 2018;362(2):370-7.
128. Cui FM, Li JX, Chen Q, Du HB, Zhang SY, Nie JH, et al. *Radon-induced alterations in micro-RNA expression profiles in transformed BEAS2B cells*. **J Toxicol Environ Health A**. 2013;76(2):107-19.
129. Ozbayer C, Degirmenci I, Ustuner D, Ak G, Saydam F, Colak E, et al. *miRSNPs of miR1274 and miR3202 Genes that Target MeCP2 and DNMT3b Are Associated with Lung Cancer Risk: A Study Conducted on MassARRAY Genotyping*. **J Environ Pathol Toxicol Oncol**. 2016;35(3):223-36.
130. Jima DD, Zhang J, Jacobs C, Richards KL, Dunphy CH, Choi WW, et al. *Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs*. **Blood**. 2010;116(23):e118-27.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de biomarcadores preditores de metástase linfonodal em pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral

Pesquisador: Lidia Maria Rebolho Batista Arantes

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 71827517.0.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO
Fundação Pio XII

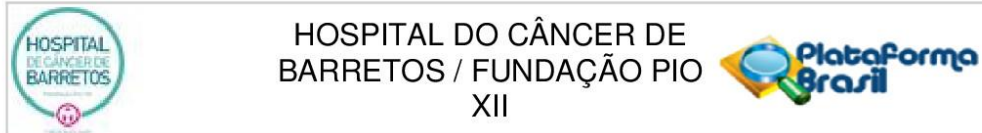
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.200.543

Apresentação do Projeto:

Em OSCC, um pior prognóstico é esperado em pacientes com metástase linfonodal, o que é agravado com a presença de extravasamento extracapsular. Além de ser um importante indicador de prognóstico, a presença de doença metastática nos linfonodos também influencia a escolha do tratamento inicial e a terapia adjuvante para diminuir a taxa de recorrência da doença. Há uma estratégia bem aceita para o tratamento de pacientes com linfonodos clinicamente positivos. No entanto, a escolha de tratamento para pacientes sem evidências clínicas de metástases permanece controversa. Cerca de 70 a 80% de pacientes com pescoço clinicamente N0 são submetidos à morbidade desnecessária dos tratamentos cirúrgicos. Neste contexto, a detecção de biomarcadores no tumor primário que pudessem prever a presença ou não de metástase poderia selecionar aqueles pacientes que se beneficiariam do estadiamento cirúrgico do pescoço, enquanto que pouparia os demais pacientes de um estadiamento cirúrgico desnecessário. Sendo assim, o objetivo deste estudo é identificar microRNAs diferencialmente expressos em amostras tumorais de pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral clinicamente livres de metástase capazes de distinguir casos com linfonodos patologicamente positivos e negativos. Inicialmente, o nível de expressão de 800 microRNAs será avaliado em 12 amostras de tumores com linfonodos metastáticos e 12 tumores com linfonodos não metastáticos de pacientes com

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@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.200.543

OSCC. Posteriormente, a expressão diferencial dos microRNAs selecionados será validada em um grupo independente de 30 amostras de tumores com linfonodos com micrometástases e macrometástases e 30 tumores com linfonodos não metastáticos, através da técnica de PCR em tempo real. A análise estatística será realizada no programa SPSS 21.0, através dos testes de qui-quadrado e exato de Fischer para verificar a associação entre as variáveis de interesse. A significância estatística será determinada para um valor de $p < 0,05$.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar microRNAs diferencialmente expressos em amostras tumorais de pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral clinicamente livres de metástase capazes de distinguir casos com linfonodos patologicamente positivos e negativos (pN0 e pN+).

Objetivo Secundário:

1. Identificar microRNAs cujo nível de expressão seja capaz de diferenciar tumores de pacientes T1/T2 cN0/pN0 dos T1/T2 cN0/pN+ micrometástase e cN0/PN+ macrometástase;
2. Validar o perfil de expressão encontrado na etapa inicial do estudo, utilizando os microRNAs que apontaram para um padrão diferencial de expressão, em um grupo amostral maior, e determinar prováveis biomarcadores preditores de metástase linfonodal em pacientes OSCC;
3. Avaliar a associação das variáveis sociodemográficas, clínicas, histopatológicas e terapêuticas com os resultados obtidos através das análises moleculares;
4. Avaliar a sensibilidade desta "expressão diferencial dos microRNAs" em identificar linfonodos N0 de N+ e sua acurácia na comparação com métodos de patologia convencionais na identificação de micrometástases.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o pesquisador:

"Riscos: Em razão desta pesquisa apresentar caráter retrospectivo, representa riscos mínimos para os participantes. O principal risco a que estarão expostos é a quebra acidental de sigilo, mas a equipe do estudo se compromete em adotar medidas para evitar que isso aconteça".

"Benefícios: O estudo não deve trazer benefícios diretos aos seus participantes, mas gerar conhecimentos que trarão benefícios futuros a outras pessoas".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de submissão inicial envolvendo um estudo retrospectivo utilizando amostras de parafina, com solicitação de dispensa de TCLE.

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



Continuação do Parecer: 2.200.543

Trata-se de um estudo de baixo risco em que não foram encontrados óbices éticos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos obrigatórios foram apresentados de forma adequada.

Recomendações:

1 - Recomenda-se a inclusão dos cuidados a serem tomados visando o não esgotamento do material biológico (bloco de parafina).

2 - Do ponto de vista estatístico, as análises realizadas para ensaios moleculares (nanosttring e pcr em tempo real) são análises quantitativas e diferem das análises propostas pelo pesquisador ("fisher e qui-quadrado para associação entre as variáveis de interesse"). Recomenda-se inclusão dos métodos estatísticos e bioinformáticos:

A) Processos de normalização dos dados de nanosttring;

B) Testes estatísticos para busca de microRNAs diferencialmente expressos, os níveis de significância a serem empregados nas análises estatísticas dos dados moleculares de Nanosttring e também nos de PCR em tempo real;

C) Análises posteriores de bioinformática para seleção/avalição da acurácia de biomarcadores).

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem óbice ético.

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 Nº 001/2013 do CNS, manifesta -se pela APROVAÇÃO do projeto de pesquisa proposto.

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 02/02/2018.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de participantes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o BIOBANCO para início do

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



Continuação do Parecer: 2.200.543

processamento.

5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
6. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 1418/2017.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_937955.pdf	25/07/2017 17:20:55		Aceito
Folha de Rosto	CEP_miRNA.pdf	24/07/2017 17:40:42	Lidia Maria Rebolho Batista Arantes	Aceito
Outros	CienciaEAutorizacao.pdf	06/07/2017 10:20:33	Bruna Pereira Sorroche	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_miRNA.docx	06/07/2017 10:19:56	Bruna Pereira Sorroche	Aceito
Outros	Mabin.pdf	04/07/2017 20:17:14	Bruna Pereira Sorroche	Aceito
Outros	CadastroNAP.pdf	04/07/2017 20:17:00	Bruna Pereira Sorroche	Aceito
Outros	Financiamento.pdf	04/07/2017 20:13:34	Bruna Pereira Sorroche	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	04/07/2017 20:12:12	Bruna Pereira Sorroche	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Infraestrutura.pdf	04/07/2017 20:09:05	Bruna Pereira Sorroche	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ResponsabilidadePesquisador.pdf	04/07/2017 20:07:28	Bruna Pereira Sorroche	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	04/07/2017 20:06:44	Bruna Pereira Sorroche	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

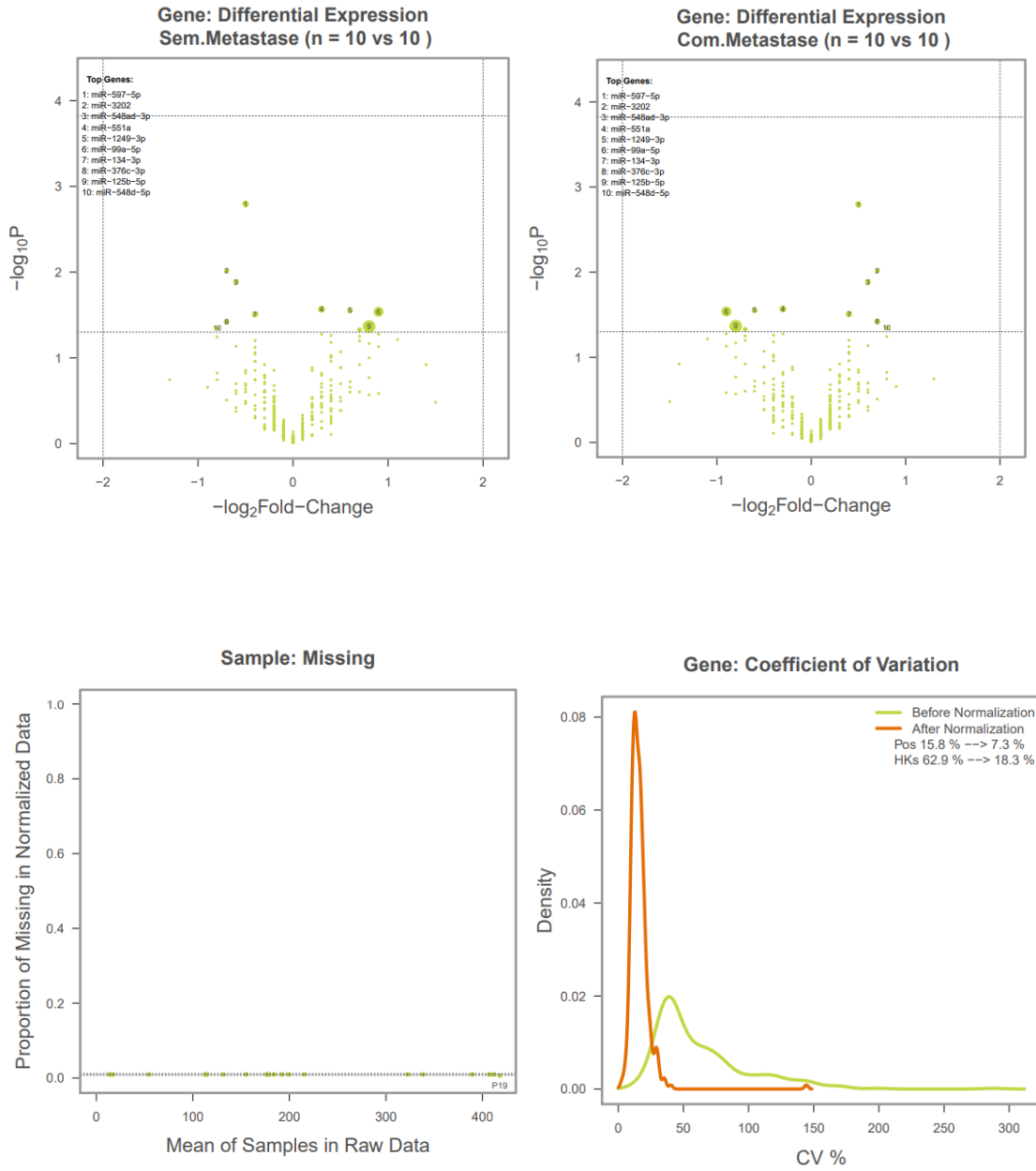
Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331
Bairro: Dr. Paulo Prata **CEP:** 14.784-400
UF: SP **Município:** BARRETOS
Telefone: (17)3321-0347 **Fax:** (17)3321-6600 **E-mail:** cep@hcancerbarretos.com.br

ANEXO B – Métodos de normalização

ID do método	Método
1	none_none_none_none
2	none_none_none_quantile
3	none_none_top.geo.mean_none
4	none_none_top.geo.mean_quantile
5	none_none_low.cv.geo.mean_none
6	none_none_low.cv.geo.mean_quantile
7	none_none_top.mean_none
8	none_none_top.mean_quantile
9	none_mean.2sd_none_none
10	none_mean.2sd_none_quantile
11	none_mean.2sd_top.geo.mean_none
12	none_mean.2sd_top.geo.mean_quantile
13	none_mean.2sd_low.cv.geo.mean_none
14	none_mean.2sd_low.cv.geo.mean_quantile
15	none_mean.2sd_top.mean_none
16	none_mean.2sd_top.mean_quantile
17	none_mean_none_none
18	none_mean_none_quantile
19	none_mean_top.geo.mean_none
20	none_mean_top.geo.mean_quantile
21	none_mean_low.cv.geo.mean_none
22	none_mean_low.cv.geo.mean_quantile
23	none_mean_top.mean_none
24	none_mean_top.mean_quantile
25	geo.mean_none_none_none
26	geo.mean_none_none_quantile
27	geo.mean_none_top.geo.mean_none
28	geo.mean_none_top.geo.mean_quantile

29	geo.mean_none_low.cv.geo.mean_none
30	geo.mean_none_low.cv.geo.mean_quantile
31	geo.mean_none_top.mean_none
32	geo.mean_none_top.mean_quantile
33	geo.mean_mean.2sd_none_none
34	geo.mean_mean.2sd_none_quantile
35	geo.mean_mean.2sd_top.geo.mean_none
36	geo.mean_mean.2sd_top.geo.mean_quantile
37	geo.mean_mean.2sd_low.cv.geo.mean_none
38	geo.mean_mean.2sd_low.cv.geo.mean_quantile
39	geo.mean_mean.2sd_top.mean_none
40	geo.mean_mean.2sd_top.mean_quantile
41	geo.mean_mean_none_none
42	geo.mean_mean_none_quantile
43	geo.mean_mean_top.geo.mean_none
44	geo.mean_mean_top.geo.mean_quantile
45	geo.mean_mean_low.cv.geo.mean_none
46	geo.mean_mean_low.cv.geo.mean_quantile
47	geo.mean_mean_top.mean_none
48	geo.mean_mean_top.mean_quantile

ANEXO C – Controles de qualidade gerados pelo pacote *NanoStringNorm* – Método *Quantile*



Sample: Positive Controls

