



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR

RODGER MARCEL LIMA ROCHA

**INVASÃO PERINEURAL NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E
PESCOÇO: IMPACTO DE GENES RELACIONADOS AO RITMO CIRCADIANO**

MACEIÓ
2022

RODGER MARCEL LIMA ROCHA

**INVASÃO PERINEURAL NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO:
IMPACTO DE GENES RELACIONADOS AO RITMO CIRCADIANO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Carvalho Fraga

MACEIÓ
2022

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecário: Marcelino de Carvalho Freitas Neto – CRB-4 – 1767

R672a

Rocha, Rodger Marcel Lima.

Invasão perineural no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: Impacto de genes relacionados ao ritmo circadiano / Rodger Marcel Lima Rocha – 2022.
64 f. : il.

Orientador: Carlos Alberto Carvalho Fraga.
Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Farmacêuticas. Maceió, 2022.

Bibliografia: f. 41-45.

1. Proliferação. 2. *Schwann*. 3. Progressão tumoral. 4. Metástases. I. Título.

CDU: 616.31-006

FOLHA DE APROVAÇÃO

AUTOR: RODGER MARCEL LIMA ROCHA

Invasão perineural no carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: Impacto de genes relacionados ao ritmo circadiano / Dissertação de Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular, da Universidade Federal de Alagoas

Carlos Alberto de Carvalho Fraga

Prof. Dr. Carlos Alberto Carvalho Fraga (UFAL) - Orientador

Banca Examinadora:

Amanda Karine Barros Ferreira Rodrigues
Dra. Amanda Karine Barros Ferreira Rodrigues - (UFAL)

Jussara A. Oliveira Baggio
Dra. Jussara Almeida de Oliveira Baggio - (UFAL)

Carolinne de Sales Marques
Dra. Carolinne de Sales Marques - (UFAL)

Maceió, 28 de março de 2022

À Deus, que nos dá oportunidades
para vencer os obstáculos todos os
dias.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, pois sempre acreditaram e me apoiaram em todos os passos que eu dei, cada um a sua maneira e desta forma eu pude chegar aonde estou agora;

A minha esposa, que em suas palavras e incentivos, conseguiu me impulsionar a concluir este mestrado;

Ao professor Dr. Carlos Fraga, pois ele foi muito mais que um orientador para mim, foi um parceiro e amigo, abriu minha mente para um mundo novo que une a informática com a biologia. Sem ele não teria conseguido nem chegar perto de onde estou agora;

A Genilda Castro e Helem, parceiras de laboratório e amigas que me guiaram enquanto eu me vislumbrava nesse mundo novo da biologia molecular e bioinformática, aprendi e aprendo muito com elas sempre que as encontro;

A equipe do laboratório (Miguel, Érika, Eduardo, Karol, Tatiane, Roberta, André, José Wilson, Giovana, Clara, Ana Kelly, Noan, Livia, George) que contribuírem direta e indiretamente com a minha dissertação;

A Andréa Carla, que sempre foi uma fonte de inspiração minha, me incentivou bastante a me inscrever no mestrado mesmo quando não acreditava em mim após estar afastado das bancas da universidade por mais de 20 anos e torceu bastante durante todo o processo;

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente com a execução desse trabalho, o meu muito obrigado.

Encontrei um viajante vindo de uma antiga terra
Que me disse: — Duas imensas e destroncadas pernas de pedra
Erguem-se no deserto. Perto delas, sobre a areia
Meio enterrado, jaz um rosto despedaçado, cuja carranca
Com lábio enrugado e sorriso de frio comando
Dizem que seu escultor soube ler bem suas paixões
Que ainda sobrevivem, estampadas nessas coisas inertes,
A mão que os escarneceu e o coração que os alimentou
E no pedestal aparecem estas palavras:
**"Meu nome é Ozymandias, rei dos reis:
Contemplai as minhas obras, ó poderosos e desesperai-vos!"**
Nada mais resta: em redor a decadência
Daquele destroço colossal, sem limite e vazio
As areias solitárias e planas se espalham para longe.

(Ozymandias – Soneto de Percy Bysshe Shelley – 1818)

RESUMO

Durante os processos de formação e progressão tumoral há o envolvimento da ação de células que criam um microambiente favorável para o desenvolvimento do câncer. Dentre os mecanismos que atuam nesses eventos, encontram-se alterações de ritmo circadiano e invasão perineural. Ambos os eventos foram descritos, separadamente, como atuantes na agressividade tumoral. É importante identificar eventos relacionados à alteração do ritmo circadiano que são associados ao câncer que possam impactar diretamente na invasão deste tecido no sistema nervoso periférico. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a invasão perineural em câncer de cabeça e pescoço, associando a genes relacionados ao sistema nervoso periférico e ao ritmo circadiano. Os dados demonstram que as vias de “ritmo circadiano” e “orientação axônica” apresentaram-se desreguladas em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço com invasão perineural positiva. As análises da expressão diferencial identificaram que os genes associados à resposta das células de Schwann em nervos lesados que são regulados positivamente ativam a via do “ritmo circadiano”. Foi identificada correlação negativa entre a expressão e a metilação dos genes *PER3* e *RORC*, quando analisados separadamente em ambos grupos tumorais. As correlações positivas entre as expressões de *PER2* e *RORC*, bem como de *RORC* com os genes *MPZ*, *S100A8* e *NUF2*, foram identificadas apenas nos grupos de pacientes que não apresentaram invasão perineural. Os genes do ritmo circadiano estão desregulados nos tecidos neoplásicos, estando os oncogenes com a expressão aumentada e os supressores de tumor com a expressão diminuída. O aumento da expressão da proteína mTOR foi identificada nos pacientes que apresentam invasão perineural. Os dados sugerem que a desdiferenciação e proliferação das células de Schwann podem estar associadas à desregulação de genes do ritmo circadiano; consequentemente, as células de Schwann produzem diferentes fatores que participarão de diversos processos de progressão tumoral e invasão dos tecidos adjacentes, incluindo ativação da via mTOR. Esses processos também podem estar envolvidos na invasão tumoral no tecido perineural no câncer de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: Proliferação; Schwann; Progressão tumoral; Metástases.

ABSTRACT

During the processes of tumor formation and progression there is the involvement of the action of cells that create a favorable microenvironment for cancer development. Among the mechanisms involved in these events are circadian rhythm alterations and perineural invasion. Both events have been described, separately, as active in tumor aggressiveness. It is important to identify events related to circadian rhythm alterations that are associated with cancer that may directly impact the invasion of this tissue into the peripheral nervous system. The aim of this study was to evaluate perineural invasion in head and neck cancer, associating it with genes related to the peripheral nervous system and circadian rhythm. The data showed that the circadian rhythm and axon guidance pathways were deregulated in head and neck squamous cell carcinoma with positive perineural invasion. Differential expression analyses identified that genes associated with Schwann cell response in injured nerves that are positively regulated activate the circadian rhythm pathway. Negative correlation was identified between expression and methylation of PER3 and RORC genes when analyzed separately in both tumor groups. Positive correlations between expression of PER2 and RORC, as well as of RORC with MPZ, S100A8 and NUF2 genes were identified only in the groups of patients who did not present perineural invasion. Circadian rhythm genes are dysregulated in neoplastic tissues, with increased expression of oncogenes and decreased expression of tumor suppressors. Increased expression of mTOR protein was identified in patients presenting with perineural invasion. The data suggest that dedifferentiation and proliferation of Schwann cells may be associated with downregulation of circadian rhythm genes; consequently, Schwann cells produce different factors that participate in various processes of tumor progression and invasion of adjacent tissues, including activation of the mTOR pathway. These processes may also be involved in tumor invasion into the perineural tissue in head and neck cancer.

Keywords: Proliferation; Schwann; Tumor progression; Metastasis.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1.	CÂNCER	14
2.2.	CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	15
2.3.	ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA	16
2.4.	DIAGNÓSTICO	17
2.5.	TRATAMENTO	18
2.5.1.	Tratamento da doença inicial	19
2.5.2.	Tratamento da doença localmente avançada ressecável (T3 ou T4A)	19
2.5.3.	Tratamento da doença localmente avançada irressecável	20
2.6.	CÉLULAS DE SCHWANN	20
2.7.	INVASÃO PERINEURAL	21
3.	JUSTIFICATIVA	24
4.	OBJETIVOS	27
4.1.	OBJETIVO GERAL	27
4.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
5.1.	COLETA DE LISTA DE GENES	28
5.2.	RNA-SEQ E DADOS DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS DO ATLAS DO GENOMA DO CÂNCER (TCGA)	28
5.3.	ANÁLISES DE EXPRESSÃO DE CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO	28
6.	RESULTADOS	30
6.1.	GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEGS), ENRIQUECIMENTO DA ONTOLOGIA GÊNICA E CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL	30
6.2.	ANÁLISE DE GENES ENVOLVIDOS NA DESDIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DE SCHWANN	32
6.3.	ANÁLISE DE GENES RELACIONADOS AO RELÓGIO	33
6.4.	ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS, METILAÇÃO GÊNICA E CORRELAÇÃO	33
6.5.	ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA E SOBREVIDA	34
7.	DISCUSSÃO	36
8.	CONCLUSÃO	40
9.	REFERÊNCIAS	41

10.	PRODUTOS	46
10.1.	PATENTE.....	46
10.2.	ARTIGO	48

TABELA DE FIGURAS

Figura 1- Número de Casos de Câncer no Brasil de acordo com o INCA em 2020	14
Figura 2 - Anatomia da Cabeça e Pescoço.	15
Figura 3 - Estadiamento do Câncer de Cabeça e Pescoço.....	19
Figura 4 – Representação Esquemática da Invasão Neural.....	22
Figura 5 - Principais vias moleculares identificadas nas análises do Pathfinder relacionadas à invasão perineural.....	30
Figura 6- – Intersecção dos genes associados à resposta das células de Schwann à lesão do sistema nervoso periférico e a expressão diferencial dos genes do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	31
Figura 7 - Análise da expressão de genes que participam da desdiferenciação das células de Schwann.	32
Figura 8 – Frequência das metilações dos genes <i>SOX10</i> , <i>ROBO2</i> , <i>SLIT2</i> , <i>EGR2</i> , <i>MPZ</i> , <i>SERPINE1</i> , <i>MMP9</i> , <i>NOX4</i> , <i>OIP5</i> , <i>NUF2</i> , <i>RORC</i> , <i>KAT2B</i> , <i>RORA</i> , <i>NPAS2</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>FOXP3</i> , <i>OXTR</i> , <i>TIMELESS</i> , <i>ARNTL</i> , <i>DLK1</i> , <i>PPARGC1A</i> , <i>RASD1</i> , <i>DEFB1</i> , <i>PER2</i> , <i>ID2</i> , <i>CRY2</i> , <i>S100A8</i> , <i>NR1D2</i> , <i>ARRB1</i> , <i>PER1</i> , <i>TGFB2</i> , <i>RORC</i> e <i>KAT2B</i> comparando nos grupos positivos e negativos para invasão perineural.....	33
Figura 9- Análise da metilação dos genes <i>RORC</i> e <i>PER2</i> , demonstrando que ambos estão metilados nas amostras com invasão perineural.....	34
Figura 10 - A expressão da proteína mTOR está aumentada nas amostras positivas para a invasão perineural.....	34
Figura 11- Expressão imunohistoquímica dos genes <i>PER2</i> , <i>CDKN2A</i> e <i>MPZ</i> nas amostras de tecido normal e tecido neoplásico. Fonte: The Human Atlas.....	35

1. INTRODUÇÃO

A invasão neoplásica é um evento que envolve ações de células presentes no microambiente tumoral, que promovem a sua progressão através da biointeração com as células neoplásicas circundantes (SCULLY, BAGAN; 2009). Quando se trata de uma invasão neoplásica num tecido nervoso, as células nervosas constituem o microambiente tumoral inteiro. Células neoplásicas e células nervosas se associam e, em alguns casos, há uma perda completa dos elementos neurais (TANAKA *et al.*, 2011; JOHNSON *et al.*, 2020).

A matriz extracelular desempenha um papel crítico no microambiente tumoral. Durante a formação do tumor, as células neoplásicas se ligam a moléculas presentes na matriz extracelular, o que facilita a comunicação com outras células, como neutrófilos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos e células do sistema nervoso periférico (MONTOVANI *et al.*, 2011; OGATA, 2004). A matriz extracelular é especialmente importante na formação e invasão do tumor, pois as células respondem e se adaptam ao microambiente local. Isso envolve tanto a proliferação desregulada de células tumorais quanto a modificação do ambiente imediato para favorecer a sobrevivência celular, angiogênese e crescimento tumoral. Fatores que podem degradar a matriz extracelular também facilitam a formação e invasão tumoral (MASCOLO *et al.*, 2012; UNLEN *et al.*, 2017).

Além da degradação da matriz, outro aspecto importante na formação e invasão do tumor é o processo denominado transição epitélio-mesenquimal. A transição epitélio-mesenquimal permite que as células epiteliais dos tumores produzam fatores geralmente encontrados na matriz extracelular (LO HC; ZANG, 2018). No contexto de uma progressão tumoral, vários tipos celulares podem contribuir para sua evolução, incluindo as células de Schwann que estão diretamente associadas com a interação das células neoplásicas nos nichos tumorais em que há presença de tecido nervoso periférico (ZHOU *et al.*, 2018). Dependendo da biologia tumoral, as células de Schwann podem participar deste microambiente tumoral.

As células neoplásicas produzem fatores que mimetizam o processo de resposta dos axônios periféricos a lesão nervosa (DEBODE *et al.*, 2016; SILVA, 2019). Dessa forma, as células de Schwann podem se desdiferenciar, migrando para a região próxima as células neoplásicas, e, carreando-as para a região axonal periférica, já nos estágios iniciais da carcinogênese. Tais células também degradam matriz extracelular que, por consequência, formam lúmens revestidos com laminina, que são utilizadas como ductos de migração por células neoplásicas (CLEMENTS, 2017).

O relógio circadiano e a resposta à lesão no sistema nervoso periférico possuem semelhanças conceituais e moleculares, pois ambos são constituídos por processos que apresentam alças de regulação interligadas e apresentam sequências de transcrição, tradução, modificação e degradação de proteínas (BEM-SHLOMO, 2014). Existem interações entre essas vias e, quando há uma desregulação no ritmo circadiano, há uma alteração nos mecanismos de controle da resposta à lesão axonal (BEM-SHLOMO, 2014; MAZZOCCOLLI; PAZINZA; VINCIGUERRA, 2012). O ritmo circadiano parece coordenar a progressão do reparo axonal (TIONG *et al.*, 2020). Alterações da expressão dos genes do relógio podem aumentar a susceptibilidade ao câncer através dos efeitos nos mecanismos biológicos que regulam o dano e reparo ao DNA, o metabolismo energético, crescimento e morte celular em tecidos neoplásicos (BEM-SHLOMO, 2014; LOWREY; TAAHASHI, 2011). Genes que fazem parte do mecanismo de regulação do ciclo celular já foram descritos por apresentarem alteração em sua expressão em pacientes com leucemias associadas à desregulação de genes do relógio.

Estudos em modelos animais com câncer oral, mostraram que os padrões de expressão para os genes do relógio apresentaram sua expressão rítmica alterada no tecido tumoral (NIRVANI, 2018).

Os estudos anteriores sugerem que os genes do relógio desregulam e podem participar do microambiente tumoral juntamente com as células de Schwann, controlando diversos fatores que beneficiam as células do câncer. Durante esse processo, as células de Schwann podem se desdiferenciar e auxiliar no processo de progressão neoplásica (NIRVANI, 2018). Essas células então migram para a região próxima ao tecido tumoral e auxiliam no desenvolvimento da célula neoplásica (TIONG *et al.*, 2020, WEBBER, 2011).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. CÂNCER

Câncer é uma doença complexa, de alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica. É uma doença que atingiu em 2020 no Brasil 626.030 pessoas. Em homens, os maiores percentuais de tipos de câncer ocorrem na próstata, cólon e reto, pulmão e brônquios e cavidade oral, respectivamente. Em mulheres, a prevalência de câncer é mais alta na mama, cólon e reto, corpo uterino, pulmão e brônquios, e tireoide, respectivamente. Assim, fica claro que o câncer que mais atingem os homens é o da próstata e o das mulheres é o de mama (INCA,2020).

Localização primária	Casos	%			Localização primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e Reto	20.540	9,1%		Cólon e Reto	20.470	9,2%	
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.760	7,9%		Colo do útero	16.710	7,5%	
Estômago	13.360	5,9%		Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.440	5,6%	
Cavidade Oral	11.200	5,0%		Glândula Tireoide	11.950	5,4%	
Esôfago	8.690	3,9%		Estômago	7.870	3,5%	
Bexiga	7.590	3,4%		Ovário	6.650	3,0%	
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%		Corpo do útero	6.540	2,9%	
Laringe	6.470	2,9%		Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%	
Leucemias	5.920	2,6%		Sistema Nervoso Central	5.230	2,3%	

* Números arredondados para múltiplos de 10

Figura 1- Número de Casos de Câncer no Brasil de acordo com o INCA em 2020

Câncer de cabeça e pescoço é a sexta neoplasia mais comum do mundo e quando detectada cedo tem uma sobrevida de 75% em 5 anos, mas como uma doença metastática, há um decréscimo na sobrevida para 35% em 5 anos. É um tipo de câncer que causa mais angústia ao paciente pois atinge funções básicas de sobrevivência como engolir e respirar. Tratamentos para o câncer de cabeça e pescoço podem envolver cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Apesar da evolução nos tratamentos de quimioterapias, radioterapias e cirurgias, ainda não houve mudança nas taxas de mortalidade. (CHIN *et al.*, 2005).

A nível mundial, de acordo com a *International Agency for Research on Cancer*, em 2020, o País da Papua-Nova Guiné, estava liderando o ranking mundial das taxas de incidência na população acima de 20 anos, com 55,6 indivíduos com neoplasias da cabeça e pescoço por 100 mil habitantes. Além disso, na América do Sul, o Brasil é líder na quantidade de casos de neoplasia da cavidade oral. Em 2020, ele obteve uma incidência de 9744 casos, representando em torno de 70% da América do Sul. Em contrapartida, o segundo país no mesmo ranking, a Argentina, constatou 1304 casos incidentes, ou seja, 9,2% do total de 14043 incidências ocorridas no continente Sul-Americano em 2020 (WHO, 2022.).

2.2. CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

O termo “câncer de cabeça e pescoço” se refere às neoplasias malignas do trato aero digestivo superior, os carcinomas da boca, faringe e laringe. Cada um dos subsítios tem suas particularidades, sejam elas moleculares, anatômicas ou funcionais (LAUDA et al., 2019). A cavidade oral inclui os lábios, mucosa bucal, língua anterior, assoalho da boca, palato duro, superior e inferior, gengiva e trígono retromolar. A faringe inclui a nasofaringe, orofaringe e hipofaringe. A laringe inclui a laringe supraglótica, laringe glótica (cordas vocais verdadeiras e anterior e posterior comissuras) e laringe subglótica. A cavidade nasal e os seios paranasais incluem os seios maxilar, etmóide, esfenóide e frontal (CHOW, 2020).

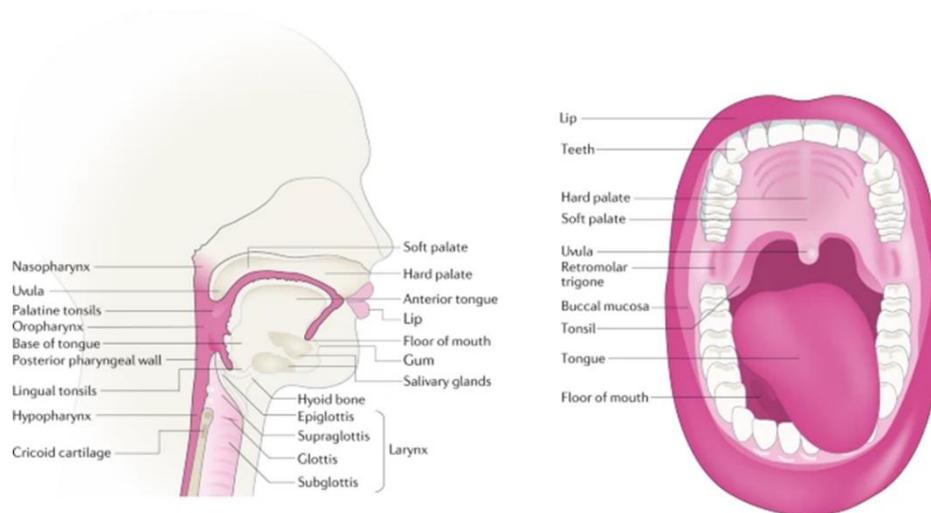


Figura 2 - Anatomia da Cabeça e Pescoço.

O câncer de cabeça e pescoço tem uma maior ocorrência (40%) na cavidade oral (assoalho bucal, língua, base da língua, palato duro e lábios); 15% na faringe (orofaringe, hipofaringe e nasofaringe); 25% na laringe; e o restante ocorre nas glândulas salivares e tireoide (DA SILVA et al. 2020.).

O carcinoma de células escamosas a entidade única mais comum no câncer oral, aparecendo em qualquer local, embora haja certas áreas em que é encontrado com mais frequência, como a língua e o assoalho da boca. Em pacientes com diagnosticados com tumores em um estágio mais avançado, há uma grande chance de invasão em tecidos circunvizinhos como linfonodos e metástases distantes com um alto risco de reaparecimento durante a vida do paciente (NOGUTI *et al.*, 2012).

O carcinoma de células escamosas é o tipo mais frequente de câncer também na cavidade nasal e nos seios paranasais, nessas regiões, seguidos de adenocarcinomas e cânceres

mucoepidermóides, indiferenciados e outros tipos menos frequentes. A maioria dos cânceres de nasofaringe é o carcinoma de nasofaringe. O carcinoma se inicia nas células epiteliais, que revestem a superfície interna e externa do órgão. Existem 3 tipos de carcinomas de nasofaringe: indiferenciado não queratinizado, diferenciado não queratinizado e de células escamosas queratinizado (ONCOGUIA, 2021).

Esses cânceres começam nas células planas, que normalmente formam o revestimento da boca e da garganta. Sendo o estágio inicial do câncer de células escamosas o carcinoma *in situ*. Existem também outros tipos mais raros de câncer nessas regiões, que são os carcinomas verrucosos, de glândulas salivares menores e os linfomas (ONCOGUIA, 2021).

As glândulas salivares normais são constituídas de diferentes tipos de células e os tumores, e os cânceres derivados são classificados de acordo com o grau de diferenciação de 1-3, sendo o grau 1 o mais diferenciado e grau 3 o menos diferenciado. O grau 2 assume a característica intermediária. Os cânceres de laringe ou hipofaringe, em sua maioria, desenvolvem-se a partir das células escamosas do epitélio, ou seja, a camada interna de revestimento dessas duas estruturas. Esse tipo de câncer é denominado carcinoma ou câncer de células escamosas (ONCOGUIA, 2021).

Atualmente é indicada a avaliação da positividade pelo HPV em câncer de orofaringe nos tumores de base de língua e amígdalas, por meio da avaliação da proteína p16 por imunohistoquímica, com *cut-off* de 70% de positividade, difusa, tanto nuclear quanto citoplasmática (LAUDA et al., 2019). O prognóstico é mais favorável para os pacientes com câncer orofaríngeo HPV-positivo, do que pacientes com doenças HPV-negativas, que muitas vezes são prometidas fisiologicamente pelo tabaco crônico e uso de álcool (CHOW, 2020). Os cânceres HPV-positivos são vistos com mais frequência em jovens sem histórico de uso de tabaco ou álcool (ONCOGUIA, 2021).

2.3. ETIOLOGIA E EPIDEMIOLOGIA

A etiologia tem o intuito de investigar as causas associadas ao surgimento de uma enfermidade em um indivíduo, nesse caso os fenômenos associados ao surgimento do câncer de cabeça e pescoço. Sendo assim, destaca-se o consumo de álcool e de tabaco como dois dos principais e mais comuns – associados ao câncer de cabeça e pescoço, em especial quando se aborda o câncer da cavidade oral e o da hipofaringe. Tem-se a sapiência que etilistas que também são tabagistas têm maior potencial de desenvolver esses tipos de cânceres em comparação ao grupo que é só etilista ou só tabagista (NCI, 2017).

Há um maior predomínio em homens com mais de 40 anos que, principalmente, fazem o uso excessivo de bebida alcoólica e cigarro. Em 2020, no Brasil, ocorreram, em homens, 11200 novos casos de câncer na cavidade oral e 6470 casos na laringe. Juntos, esses dois tipos de câncer de cabeça e pescoço representam quase 8% de todas as neoplasias, exceto pele não melanoma (INCA, 2021.). Em relação às mulheres, o câncer da glândula tireoide, por exemplo, apresenta quase a mesma quantidade dos cânceres da cavidade oral que afetaram os homens, em torno de 11950. Por fim, em 2019, o câncer da cavidade oral em homens, ocupava a oitava posição em número de óbitos por neoplasias no Brasil, cerca de 5120 (4,2%) (INCA, 2021.).

Ademais, associa-se fatores associados à atividade ocupacional do indivíduo com o desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço, um exemplo é a serragem que é inalada por madeireiros em sua rotina do trabalho que é intimamente associada ao desenvolvimento de câncer de nasofaringe. Atividades profissionais exercidas na égide industrial, onde há exposição a diversos compostos como: amianto, fibras sintéticas, pó de metal e níquel, por exemplo, estão associados em algum grau com desenvolvimento de câncer da nasofaringe e da caixa vocal (NCI, 2017).

Ainda, a infecção pelo HPV (sigla em inglês para Papilomavírus Humano) está intimamente associada com o desenvolvimento de cânceres de orofaringe que afetam a base da língua e a região das amígdalas. A prevalência desses tipos de cânceres com o HPV aumenta de forma progressiva, enquanto outros agentes causadores desses mesmos diminuem, sendo cerca de 75% dos casos associados ao HPV (NCI, 2017). Temos, como demais agentes etiológicos para o câncer de cabeça e pescoço, a exposição à radiação e a infecção pelo vírus Epstein-Barr sendo esses associados principalmente aos respectivos tipos de cânceres: câncer de glândulas salivares e câncer de nasofaringe (NCI, 2017).

Por fim, no estado de Alagoas, os cânceres de laringe, tireoide e cavidade oral se destacam entre os cânceres de cabeça e pescoço. Totalizando, no ano de 2020, 380 casos. No câncer de cavidade oral os homens são cerca de 80% mais atingidos do que às mulheres, já no de tireóide às mulheres são 5 vezes mais susceptíveis do que os homens e no que é relativo ao câncer de laringe os homens lideram com 100% dos casos, já que no sistema não há dado algum sobre as mulheres (INCA, 2021.).

2.4. DIAGNÓSTICO

A maioria dos casos de Câncer de cabeça e pescoço é diagnosticada em estágios avançados, quando o tratamento médico é menos eficaz e o tratamento cirúrgico compromete os órgãos necessários para a fala e a deglutição (HASHIM *et al.*, 2019). Para indivíduos em países

com acesso limitado a centros de saúde terciários, as taxas de sobrevivência são de 30% a 40% (NANDAKUMAR, 2016; PRUEGSANUSAK *et al.*, 2012) em comparação com aproximadamente dois terços de sobrevivência nos Estados Unidos (HASHIM *et al.*, 2019).

A avaliação inicial de um paciente com suspeita de câncer de cabeça e pescoço pode ser bem direta. Uma história completa deve ser extraída, com foco nos principais fatores de risco, como uso de álcool, tabaco, dieta e higiene oral. Deve ser realizada uma inspeção minuciosa para detectar lesões com potencial para evolução maligna (CAMPANA *et al.*, 2013).

O diagnóstico definitivo de carcinoma invasivo é dado através da biópsia cirúrgica, que representa o método mais confiável de diagnóstico, pois fornece ao patologista toda a arquitetura do tecido necessária (CAMPANA *et al.*, 2013). Tendo o diagnóstico de carcinoma invasivo se faz necessária uma avaliação completa para determinar a extensão do tumor. Uma forma de se aprofundar a procura é através da fluorescência que pode ajudar na detecção de mudanças pré-malignas e determinação da extensão da mucosa patológica (UPILE *et al.*, 2009).

Com a obtenção do diagnóstico definitivo, exames de imagem se tornam essenciais para o estadiamento do tumor e avaliação de metástases. Tomografia computadorizada (TC) com administração de contraste intravenoso oferece uma avaliação inicial do envolvimento de tecidos moles, ossos e mucosa (CAMPANA *et al.*, 2013). Caso haja dúvida em relação ao envolvimento profundo de tecidos moles, nervos ou músculo, o estudo com ressonância nuclear magnética (RNM) se faz necessário (GENDEN *et al.*, 2010).

Considerando a baixa sobrevida de câncer de cabeça e pescoço em estágio avançado, a redução de comportamentos de risco e a detecção precoce de câncer de cabeça e pescoço são fundamentais para reduzir a incidência, o custo e a mortalidade. Assim, a prevenção deste câncer deve ter como objetivo melhorar dois domínios fundamentais do atendimento ao paciente: redução do comportamento de risco para diminuir a incidência de câncer de cabeça e pescoço (prevenção primária) e acurácia e precisão da detecção diagnóstica precoce (prevenção secundária).

2.5. TRATAMENTO

Na abordagem do paciente com carcinoma de cabeça e pescoço de células escamosas, é fundamental levar em consideração: fatores relacionados ao paciente; fatores relacionados ao tumor e fatores relacionados à instituição (CHAVES *et al.*, 2018). Considerando os carcinomas de células escamosas da boca, orofaringe, hipofaringe, laringe e nasofaringe podem-se avaliar o tratamento conforme citado abaixo.

O câncer de cabeça e pescoço é classificado em 4 estádios conforme imagem abaixo:

ESTÁDIO	DESCRIÇÃO
Estádio I	Tumor ≤ 2 cm confinado à glândula tireoide.
Estádio II	Tumor > 2 cm confinado à glândula tireoide.
Estádio III	Tumor que invade órgãos vizinhos ou linfonodos de região cervical.
Estádio IV	Tumor comprometendo órgãos mais distantes, como pulmões e ossos.

Figura 3 - Estadiamento do Câncer de Cabeça e Pescoço

2.5.1. Tratamento da doença inicial

Nos cânceres cujo sítio é a cavidade oral de estadiamento T1 e T2 é recomendado o tratamento cirúrgico, bem como nos de orofaringe, apesar de que quanto ao último, tanto a cirurgia quanto a radioterapia (RT) oferecem condições semelhantes para o controle regional. Nos tumores mais avançados (T3 e T4) de ambos os sítios, há preocupação a respeito da indicação cirúrgica em função das alterações anatômicas e funcionais impostas pela cirurgia. No câncer de laringe também está indicada a cirurgia conservadora ou a radioterapia; já no de hipofaringe, a abordagem cirúrgica está indicada para tumores extensos e com invasão laríngea concomitante ao acometimento da hipofaringe (seio piriforme ipsilateral à lesão laríngea), sendo a faringolaringectomia, o tratamento de escolha (CHAVES et al., 2018).

Os critérios para indicar radioterapia e ou quimioterapia adjuvante à cirurgia são: associa-se radioterapia adjuvante nos casos com infiltração perineural, embolização vascular ou metástases cervicais sem comprometimento extracapsular, ou quimiorradioterapia adjuvante nos casos em que haja margens positivas ou extravasamento extracapsular da doença nodal (BERNIER et al., 2004; BERNIER et al., 2005).

2.5.2. Tratamento da doença localmente avançada ressecável (T3 ou T4A)

No câncer de cavidade oral está indicado cirurgia radical com esvaziamento cervical uni ou bilateral seguida de a radioterapia ou quimiorradioterapia adjuvante, já no de orofaringe, a cirurgia ou quimiorradioterapia concomitante podem ser realizados. Nos tumores T3 da laringe é importante a avaliação da possibilidade da preservação do órgão, já nos tumores T4 é indicada laringectomia total seguida de a radioterapia ou radioquimioterapia adjuvante; os tumores de hipofaringe tem as mesmas indicações, sendo que nos tumores T4 a faringolaringectomia deve ser feita com esvaziamento cervical (CHAVES et al., 2018).

Deve-se associar a radioterapia adjuvante nos casos com infiltração perineural, embolização vascular ou metástases cervicais sem comprometimento extracapsular, ou

quimiorradioterapia adjuvante nos casos em que haja margens positivas ou extravasamento extracapsular da doença nodal (BERNIER et al., 2004; BERNIER et al., 2005). Nos casos que é feita abordagem do pescoço em pacientes que se apresentam com doença cervical que foram submetidos a tratamento não cirúrgico, o tratamento-padrão seria o esvaziamento cervical programado, porém estudos atuais demonstram que pacientes não precisam ser submetidos a esvaziamento cervical programado após quimio e radioterapia se PET CT negativo (exame realizado na semana 12 após término da radioterapia) (MEHANNA et al., 2016).

2.5.3. Tratamento da doença localmente avançada irressecável

Os tumores irressecáveis de laringe, cavidade oral, hipofaringe e orofaringe podem ser abordados por quimioterapia concomitante à radioterapia com cisplatina 100 mg/m² (tratamento padrão); para pacientes com contraindicação ao uso da cisplatina: pode ser indicado o uso de a radioterapia associada à cetuximabe (CHAVES et al., 2018).

2.5.4. Tratamento da doença recidivada e/ou metastática

Se o paciente apresenta recidiva local ou regional, o tratamento de escolha, se factível, é a cirurgia de resgate; se irressecável, a opção terapêutica deve ser personalizada, sendo possível: reirradiação para casos selecionados, quimioterapia paliativa ou cuidados paliativos. Nos casos que é indicado tratamento sistêmico, os principais objetivos são controlar os sintomas, melhorar a qualidade de vida e a sobrevida livre de doença (CHAVES et al., 2018).

2.6. CÉLULAS DE SCHWANN

As células de Schwann apresentam uma diversidade de funções, que inclui sobrevivência neural durante o desenvolvimento, remodelação e orientação neural após uma lesão traumática. Essa multifuncionalidade pode estar associada a capacidade de diferenciação em diferentes fenótipos (DEBORDE *et al.*, 2016). São precursores de diferentes tipos celulares, como fibroblastos, melanócitos, neurônios, gânglios parassimpáticos. Por esse motivo, são extremamente importantes para regeneração e desenvolvimento do sistema nervoso central (MARTYN et al., 2019).

Sendo possível que esse comportamento contribua para a invasão e para o desenvolvimento do câncer. Já foram observadas células de Schwann em áreas tumorais antes do início da invasão e se acredita que tais células sejam capazes de guiar células cancerígenas até neurites por meio de saliências (DEBORDE *et al.*, 2016). Além disso, a morte das células de Schwann

após a radioterapia foi associada a deficiência na invasão perineural, o que sugere a importância direta dessas células no desenvolvimento tumoral (MARTYN *et al.*, 2019).

A participação das células de Schwann no reparo de lesões nervosas e condução da orientação do crescimento axonal mostra suas diferenças funcionais com os oligodendrócitos, no sistema nervoso. As células de Schwann são popularmente descritas como unidades celulares da neuroglia, presentes no sistema nervoso periférico e amplamente conhecidas pela capacidade de formar mielina, uma camada lipoproteica que promove o isolamento elétrico do axônio e, por consequência, o aumento da velocidade no impulso nervoso conhecido como o fenômeno de condução saltatória (RAASAKKA *et al.*, 2019; EL SOURY *et al.*, 2018). Existem diversos subtipos derivados da crista neural, incluindo células satélites dos gânglios da raiz dorsal e gânglios autonômicos, as células de Schwann perisinápticas da junção neuromuscular e as células de Schwann não formadoras de mielina que envolvem as fibras mielinizadas do sistema nervoso periférico (TRICAUD, 2019; FLEDRICH *et al.*, 2018). Tais subtipos derivados da crista neural são diferenciados através da expressão do fator de transcrição Sox-10, o principal marcador de células da crista neural (SAKAUE; ENGLAND, 2015; ROSS; PAWLINA, 2016). A bainha de mielina é, possivelmente, uma adaptação evolutiva dos seres vertebrados que permitiu um desenvolvimento mais complexo dos sistemas nervosos (JESSEN; MIRSKY; LLOYD, 2015). Durante a produção do complexo lipoproteico de mielina, fenômeno conhecido como mielinização, as células de Schwann envolvem um segmento do axônio, inicialmente num sulco periférico da membrana; posteriormente, conforme progressão no envolvimento do segmento axonal, ocorre a polarização em dois domínios membranosos: abaxônico (domínio exposto ao endoneuro) e adaxônico (domínio exposto ao axônio); um terceiro domínio membranoso é criado após o completo envolvimento do segmento axonal: o mesaxônio, uma dupla membrana que abrange e liga as membranas adaxônica e abaxônica

2.7. INVASÃO PERINEURAL

Invasão Perineural é a presença de células neoplásicas junto a nervos e espaços epineurais, perineurais e endoneurais na bainha neuronal. Tem se visto em inúmeros tipos de câncer incluindo o câncer de cabeça e pescoço e está relacional com recorrência do câncer e ao prognóstico ruim (ZHANG, J. *et al.*, 2020). As características relacionadas a invasão perineural continua incertas de acordo com a literatura, variando entre 5.2 a 90% em estudos anteriores. (ZHANG, Z. *et al.*, 2019).

Há quatro formas básicas de um tumor se disseminar: através da invasão direta do tecido circundante, da via linfática, da via hematogênica ou da disseminação pelos nervos. Essa última,

a invasão perineural (PNI), ainda é pouco compreendida, apesar da sua provável associação com os piores desfechos clínicos dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (ZHANG *et al.*, 2019). A invasão perineural caracteriza-se por ser um achado histológico de infiltração de células tumorais, o que é diferente da disseminação tumoral perineural (PNTS). PNTS trata-se do envolvimento macroscópico ao longo do nervo, podendo ser observado radiologicamente (BAKST *et al.*, 2019).

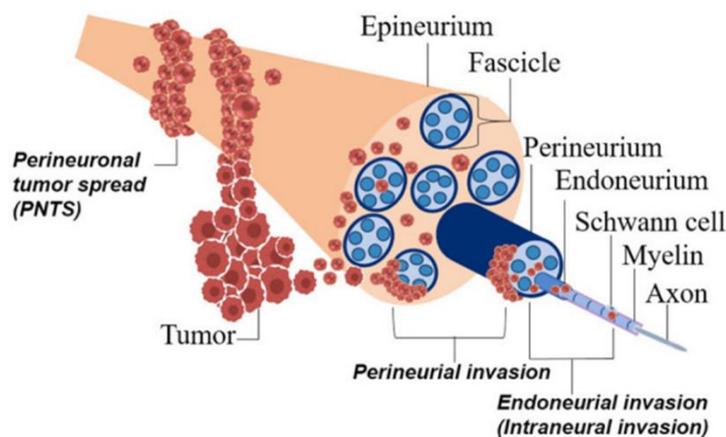


Figura 4 – Representação Esquemática da Invasão Neural.

Há um certo tempo, pensava-se que o PNI era resultado de uma extensão da metástase linfática. Atualmente, sabe-se que, na verdade, é um processo molecular que está relacionado com a interação entre o câncer e o nervo. É possível que as células de suporte dos nervos periféricos interajam com o tumor e contribuam para invasão ao longo dos nervos (BAKST *et al.*, 2019). Evidências sugerem a existência de interações parácrinas entre os neurônios e o câncer, que proporcionam um ambiente propício para o crescimento tumoral (MARCHESSI *et al.*, 2010).

Nesse processo, destaca-se a importância de quimiocinas como a neurotactina (CX3CL1), que são secretadas pelos neurônios e se ligam ao receptor CX3CR1 e as glicoproteínas ligadas à membrana (SIGLEC-4a) presentes em células tumorais. Tais moléculas permitem a aderência entre as células tumorais e neurais e a infiltração no espaço perineural. Ao mesmo tempo, neurotopinas são secretadas pelos neurônios e pelas células tumorais, permitindo a sobrevivência e o crescimento de células cancerígenas (MARCHESSI *et al.*, 2010).

A avaliação histológica apresenta diferentes padrões. O tecido que compõe a bainha do nervo tem 3 camadas (de dentro para fora): o endoneuro (responsável por envolver fibras nervosas individuais), o perineuro (formado por células endoteliais que circundam os fascículos nervosos individuais) e o epineuro (forma nervos maiores a partir da união de fascículos nervosos). Assim, a invasão pode ser ao redor ou através dos nervos periféricos. Quando há o

envolvimento do endoneuro, costuma-se usar o termo invasão intraneural (BAKST *et al.*, 2019).

Um estudo feito a partir de dados coletados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) em março de 2017, mostrou que, dentre os 319 pacientes analisados, PNI estava presente em 144 pacientes (cerca de 45% dos casos). A sobrevida global foi inversamente associada ao PNI, sendo a invasão perineural significativa para aqueles pacientes em estágios patológicos mais avançados (III e IV) e não significativa para os estágios iniciais. Fatores como sexo, idade, história de etilismo e tabagismo não apresentaram risco para o desenvolvimento de PNI. Por outro lado, a presença de invasão linfovascular, pacientes HPV-positivos, pacientes com categoria T ou N tiveram maior risco de PNI. O câncer oral de língua foi, ainda, mais suscetível ao desenvolvimento de PNI do que o câncer em áreas como base da língua e amígdalas (ZHANG *et al.*, 2019).

3. JUSTIFICATIVA

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP), também denominado carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular, é um grave problema de saúde pública em diversos países do mundo, sendo responsável por mais de 90% de todas as neoplasias orais malignas, especialmente o carcinoma epidermóide de boca (CEB). Acomete, com maior frequência, indivíduos do gênero masculino, com idade superior a 60 anos, associado a hábitos tabagista e/ou etilista. No Brasil há uma tendência para um aumento nas taxas de incidência e mortalidade por câncer de cabeça e pescoço, com um impacto desfavorável na sobrevivência e qualidade de vida dos indivíduos acometidos pela doença. As estimativas, para o Brasil, no ano de 2022, são de 11.200 casos novos de câncer da cavidade oral em homens, e 3.500 em mulheres. Essas taxas correspondem a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres.

Metástases representam um papel crítico para o prognóstico e sobrevivência de indivíduos acometidos pelo CEB. No processo de metastatização dessa neoplasia, superexpressão de genes relacionados à degradação da membrana basal e perda da adesão celular podem contribuir para a invasividade das células neoplásicas. O envolvimento dos genes *Clock* no processo de diferenciação das células neoplásicas tem relevante importância no processo de invasão e metástases. A implicação da expressão alterada dos genes *Clock* no prognóstico de indivíduos com câncer de cabeça e pescoço ainda é controversa. A relação da expressão aumentada dessas proteínas, juntamente com alterações de genes do ritmo circadiano, tem sido associada com maior risco de metástases linfonodais, o que pode conferir pior prognóstico.

O termo “ritmo circadiano” (do Latim *circa diem* que significa “cerca de um dia”) foi criado por Halberg para descrever oscilações endógenas em organismos, que foram assim classificadas por conter um período aproximado ao da rotação diária do planeta Terra. Esse processo de rotação da Terra ao redor de seu próprio eixo gera ciclos de claro e escuro, e afeta a fisiologia da maioria dos organismos vivos. Uma das características dos relógios circadianos é a capacidade de serem sincronizados por estímulos externos, mantendo, entretanto, as oscilações mesmo na ausência desses estímulos, ou seja, são autossustentáveis.

O relógio circadiano e o ciclo celular possuem semelhanças conceituais e moleculares, pois ambos são constituídos por processos que apresentam alças de regulação interligadas e apresentam sequências de transcrição, tradução, modificação e degradação de proteínas. Existem interações entre esses dois ciclos e, quando há uma desregulação no ritmo circadiano, há uma alteração no ciclo celular. Vários estudos *in vivo* apoiam o conceito de que o ritmo

circadiano coordena a progressão do ciclo celular. Estudos experimentais e clínicos sugerem uma coordenação circadiana das células que progridem através do ciclo celular. Esse fato pode ser observado a partir de algumas características importantes, como mutações em genes circadianos que estão associadas a taxas alteradas da progressão do câncer, níveis de expressão de genes do relógio e proteínas que estão alteradas em células tumorais.

Alterações da expressão dos genes do relógio podem aumentar a susceptibilidade ao câncer através dos efeitos nos mecanismos biológicos que regulam o dano e reparo ao DNA, o metabolismo energético, crescimento e morte celular em tecidos neoplásicos. Genes que fazem parte do mecanismo de regulação do ciclo celular, como Myc, p53, Cyclin D1 e Wee1, já foram descritos por apresentarem alteração em sua expressão em pacientes com leucemias associadas à desregulação de genes do relógio. Estudos em modelos animais com câncer oral, mostraram que os padrões de expressão para os genes do relógio Per1, Per2, Rev-Erb α , Bmal1 e Cry1, bem como os genes Wee1, Dbp e p21, apresentaram sua expressão rítmica alterada no tecido tumoral.

Essas alterações podem acelerar o desenvolvimento de tumores. Modelos animais de carcinoma ou sarcoma mostraram um aumento do crescimento tumoral e diminuição do tempo de sobrevivência quando expostos a ciclos com fotoperíodos alternados (claro/escuro – 14:10 h ou 10:14 h) em comparação com animais que permaneceram com o ciclo constante de 12:12 horas. O que indica que a alternância entre diferentes regimes de iluminação, que sabidamente altera o ritmo de atividade e repouso, agravando o prognóstico dos animais com essas lesões. As taxas de sobrevivência para uma variedade de tumores malignos são relativamente menores quando há invasão perineural, fenômeno que influencia diretamente na qualidade de vida do paciente, promovendo paralisia, dores entre outros fatores determinantes na morbidade. Sabe-se que a invasão perineural está associada a múltiplos tipos de processos neoplásicos, sendo um importante sinal de metástase e invasão tumoral. Apesar da clara compreensão do conceito de invasão perineural, as vias moleculares envolvidas com o fenômeno e o mecanismo da expressão dos fenótipos móveis e invasivos ainda estão sendo investigados, sendo uma etapa essencial para idealização de estratégias terapêuticas mais eficazes.

A invasão neoplásica é um evento que envolve ação de células presentes no microambiente tumoral, que promovem a progressão tumoral através da biointeração com as células neoplásicas circundantes. Quando se trata de uma invasão neoplásica num tecido nervoso, as células nervosas constituem o microambiente tumoral inteiro. Células neoplásicas e células nervosas se associam e, em alguns casos, há uma perda completa dos elementos neurais. No contexto de uma progressão tumoral, apesar de vários tipos celulares nervosos poderem contribuir

para sua evolução, as células de Schwann estão diretamente associadas com a interação das células neoplásicas nos nichos tumorais em que há presença de tecido nervoso periférico.

A plasticidade das células de Schwann exerce uma forte influência no desenvolvimento de diversas doenças humanas, por exemplo hanseníase e neurofibromatose. As múltiplas funções das células de Schwann são atribuídas pela sua capacidade de desdiferenciação e rediferenciação, a exemplo da atuação durante o reparo da lesão nervosa periférica. As células de Schwann também degradam matriz extracelular que, por consequência, formam lúmens revestidos com laminina, que são utilizadas como ductos de migração por células neoplásicas.

As células de Schwann atuam em vários processos durante a cancerização. As células neoplásicas parecem produzir fatores que mimetizam o processo de resposta dos axônios periféricos a lesão, e essa resposta tem sido associada a alteração do ritmo circadiano. Dessa forma, as células de Schwann podem se desdiferenciar, migrando para a região próxima as células neoplásicas e, estas sendo carregadas para a região perineural, já nos estágios iniciais da carcinogênese. Dados ainda não publicados do nosso estudo mostrou que a melatonina tem um papel importante em processos de morte e motilidade celular, por inibir a migração, diminuir proliferação e induzir a apoptose em células neoplásicas da linhagem bucal (SCC9). Além disso, as células tratadas com melatonina induziram a produção de mRNA de genes do ritmo circadiano, tais como *Per1*, *Per2* e *Per3*, considerados genes supressores de tumor. Como supracitado, um estudo em análise do nosso laboratório identificou que os CEBs que possuem invasão perineural diminuem a expressão dos genes do ritmo e induzem a diminuição da expressão das proteínas SLIT2 e ROBO2, responsáveis pela migração das células de Schwann, indicando que há uma correlação entre alteração dos genes do ritmo circadiano e a desdiferenciação das células de Schwann. Nesse aspecto, o presente estudo é o primeiro a associar ritmo circadiano e invasão perineural, podendo impactar os estudos posteriores acerca deste tipo de tumor.

4. OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

- Associar ritmo circadiano e invasão perineural em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) utilizando ferramentas de Bioinformática.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os genes diferencialmente expressos no CECP;
- Analisar as vias moleculares associadas aos genes diferencialmente expressos;
- Associar os genes diferencialmente expressos à lista de genes do ritmo circadiano;
- Associar os genes diferencialmente expressos à lista de genes associados às células de Schwann na resposta à lesão no sistema nervoso periférico;
- Correlacionar os achados gênicos à mutação, metilação e sobrevida nos pacientes com CEP.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. COLETA DE LISTA DE GENES

A coleta da lista de genes foi realizada utilizando o *Entrez Gene* do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/) e GeneCards (<https://www.genecards.org/>), usando os identificadores para os genes associados ao ritmo circadiano e resposta das células de Schwann em nervos lesados, separadamente. A lista de genes e a análise de genes expressos diferencialmente (DEGs) foram combinados e identificados com um *Interactivenn* (<http://www.interactivenn.net/>).

5.2. RNA-SEQ E DADOS DE INFORMAÇÕES CLÍNICAS DO ATLAS DO GENOMA DO CÂNCER (TCGA)

O TCGAbiolinks que é um software pertencente ao repositório Bioconductor, para a linguagem R (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/TCGAbiolinks.html>) foi utilizado para realizar o download dos dados genômicos e clínicos de tecidos tumorais normais e tecidos neoplásicos presentes no banco de dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). O tipo de câncer selecionado foi o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSC). Os valores significativos utilizados como critério foram considerados como valor de p ajustado $< 0,05$ e logaritmos ≥ 1 (19,20).

As análises da *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) estavam disponíveis no banco de dados Pathfinder (pacote do software R) e DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), recursos de dados composto por uma base de conhecimento de biologia integrada e ferramentas de análise para extrair informações biológicas significativas de grandes quantidades de genes e coleções de proteínas. O valor de $p < 0,05$ foi definido como critério de corte (21).

5.3. ANÁLISES DE EXPRESSÃO DE CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Vários outros recursos da web foram usados como fonte de informações, enquanto alguns outros foram usados como ferramentas de análise para estudos de expressão do câncer de cabeça e pescoço. As análises de metilação foram realizadas usando o conjunto de dados MEXPRESS (<https://mexpress.be/?ref=labworm>), consistindo em dados de metilação do DNA (Illumina Infinium Human Methylation 450 K Bead array, Illumina, EUA) e o valor β , foi considerado significativamente hipermetilado somente se o valor foi encontrado em mais de 5% dos tumores. As análises da alteração do número de cópias e sobrevida associada foram realizadas no portal *cBio Cancer Genomics* (<http://cbioportal.org>). A análise de sobrevida dos dados

do TCGA foi confirmada utilizando o banco de dados do *Prediction of clinical outcomes from genomics* (PRECOG). Os gráficos de Kaplan-Meier foram desenhados usando o PRECOG para explorar a associação entre o resultado clínico e a expressão gênica e para visualizar as diferenças no tempo de sobrevida dos pacientes.

6. RESULTADOS

6.1. GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS (DEGS), ENRIQUECIMENTO DA ONTOLOGIA GÊNICA E CLASSIFICAÇÃO FUNCIONAL

Inicialmente, os dados de expressão gênica pertencentes a espécimes de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço foram obtidos do banco de dados do TCGA; esses dados foram pré-processados usando métodos padrão. Realizamos uma análise de genes diferencialmente expressos (DEG) em amostras negativas e positivas de invasão perineural, ambas comparadas ao tecido normal. Em seguida, foi realizada a análise de enriquecimento via sub-redes ativas, identificando vias de sinalização em redes de interação proteína-proteína usando o pacote Pathfinder. Ciclo celular, replicação do DNA, via da anemia de Fanconi, via de sinalização Ras, via de sinalização ErbB, via de sinalização MAPK, senescência celular, via de sinalização do cálcio, adesão focal, ritmo circadiano e vias de orientação axônica foram observadas em amostras positivas de invasão perineural. Ciclo celular, Adesão focal, Interação ECM-receptor, Proteoglicanos no câncer, Invasão bacteriana de células epiteliais, Regulação do citoesqueleto de actina, Via da anemia de Fanconi, Senescência celular, Câncer de pulmão de pequenas células, Maturação de oócitos mediada por progesterona, Carcinogênese viral, Via de sinalização Rap1, Diferenciação de osteoclastos, meiose de oócitos, orientação de axônios e ritmo circadiano foram identificadas em amostras teciduais negativas para a invasão perineural (Figura 1).

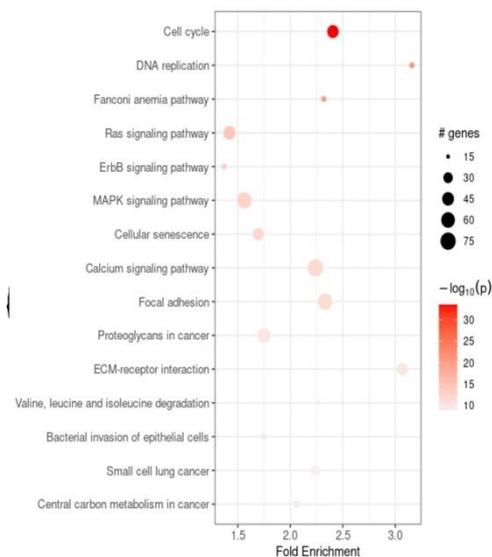


Figura 5 - Principais vias moleculares identificadas nas análises do Pathfinder relacionadas à invasão perineural

Uma vez que o foco do estudo foi avaliar as DEGs em amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de invasão perineural negativa e positiva, realizamos uma coleta de lista de genes usando o *Entrez Gene* do NCBI e *GeneCards*, que foram usados como identificadores para os genes associados à “resposta das células de Schwann em nervos lesados”. Analisando os genes que exclusivamente estavam associados à invasão perineural, foram identificados que os genes *NTRK1*, *NDRG1*, *CNTNAP1*, *NRG1*, *EGFR*, *GJA1*, *IFNG*, *TH*, *NINJ2*, *ITGB4*, *TUBB3*, *CDH2*, *CDKN2A*, *PRNP*, *PDGFRB*, *HTRA1*, *SNAP25*, *SPP1*, *CXCL10*, *POU3F1*, *MYO5A*, *SEMA3A*, *TYMP*, *CCL5*, *RTN4R*, *IL2RA*, *CNTNAP2*, *SIGMAR1*, *PRF1*, *KRT14*, *MSN*, *PTPRZ1*, *ITPR3*, *MKI67*, *IRS1*, *TUBB*, *BRIP1*, *HOXA1*, *SERPINE2*, *F2R*, *TGFA*, *TFRC* e *KRT5* tiveram a expressão aumentada em amostras teciduais positivos para a invasão perineural; enquanto *MPZ*, *GJB1*, *IL6*, *EGR2*, *S100B*, *NTF3*, *PLP1*, *IGF1*, *FGF2*, *CCL2*, *ACHE*, *AQP4*, *EGF*, *EDNRB*, *MYOC*, *EGR1*, *FOS*, *BCL2*, *ATP1A3*, *RAPSN*, *NOS1*, *NTRK3*, *DMD*, *MB*, *S100A1*, *CD36*, *CD34*, *MITF*, *AQP1*, *NR4A2*, *SELE*, *ADCYAP1*, *ERBB4*, *TRIM2*, *FGF1*, *MEF2C*, *NTN1*, *FGFR2*, *FABP7*, *TGFB2*, *CXCL12*, *TYRP1*, *ATP1A2*, *GFRA1*, *ADCY6*, *INSR*, *PLA2G2A*, *CADM1*, *GLUL*, *SPTBN4*, *LIFR*, *ATF3*, *CADM3*, *HBEGF*, *PLCB1*, *CAMK2B*, *TFF3*, *IL6ST*, *NFIC*, *CAV3*, *PGR*, *SLIT2*, *TXLNB* e *CTSF* foram regulados negativamente. Da mesma forma, realizamos análise de nos tecidos neoplásicos negativos para a invasão perineural e observamos que apenas o gene *TRPA1* estava aumentado positivamente. Nenhum gene foi identificado com a expressão diminuída nas amostras de tecido neoplásico negativo para a invasão perineural (Figura 2).

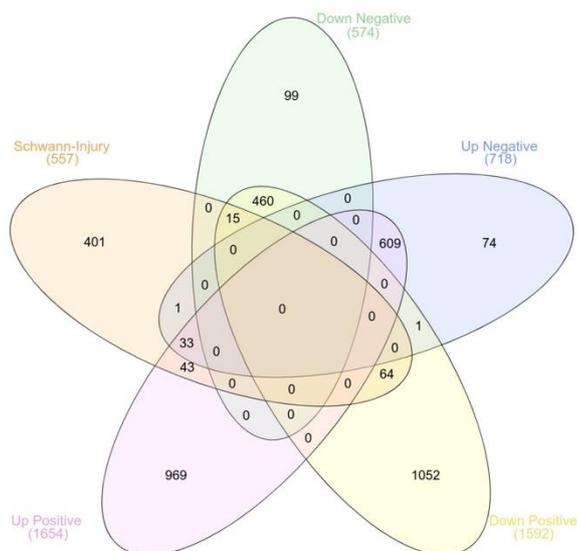


Figura 6- – Intersecção dos genes associados à resposta das células de Schwann à lesão do sistema nervoso periférico e a expressão diferencial dos genes do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

A análise do bando de dados do David foi utilizada a fim de entender quais as vias biológicas estão associadas aos genes da lista que foram combinados com as DEGs. Junção de adesão, via de sinalização PI3K-Akt, Glioma, resistência ao inibidor de tirosina quinase *EGFR*, Vias no câncer, Regulação do citoesqueleto de actina, via de sinalização de cálcio, via de sinalização de estrogênio e doença associado ao Príon foram associadas as combinações para as DEGs com expressão aumentada. Já as vias de inativação da síntese do paratormônio, via de sinalização *MAPK*, sinalização do cálcio, sinalização do *AGE-RAGE* em complicações diabéticas, resistência ao inibidor da tirosina quinase *EGFR*, secreção de insulina, via de sinalização Rap1 e ritmo circadiano foram associadas à combinação da lista de genes e as DEGs com expressões diminuídas nos tecidos positivos para a invasão.

6.2. ANÁLISE DE GENES ENVOLVIDOS NA DESDIFERENCIAÇÃO DE CÉLULAS DE SCHWANN

As células de Schwann produzem proteínas de manutenção da diferenciação celular (*SOX10*, *EGR2*, *MBP*, *ROBO1*, *ROBO2*, *SLIT2* e *MPZ*) que, após lesão do sistema nervoso periférico, diminuem sua expressão, provocando a desdiferenciação celular. Imediatamente após a lesão, o corpo celular inicia uma série de respostas metabólicas, reorganização citoplasmática e alterações específicas na expressão gênica (aumentado a expressão dos genes *SOX10*, *GAP43*, *NCAM1*, *NGFR* e *GFAP*) conhecida como reação neuronal. Analisando especificamente a expressão dos genes supracitados, foi identificado que os genes *SOX10* e *ROBO2* estão com a expressão diminuídas em ambos os grupos tanto negativos e positivos para a invasão perineural, enquanto *SLIT2*, *EGR2* e *MPZ* foram identificados com a expressão diminuída apenas em tumores positivos para a invasão perineural (Figura 3).

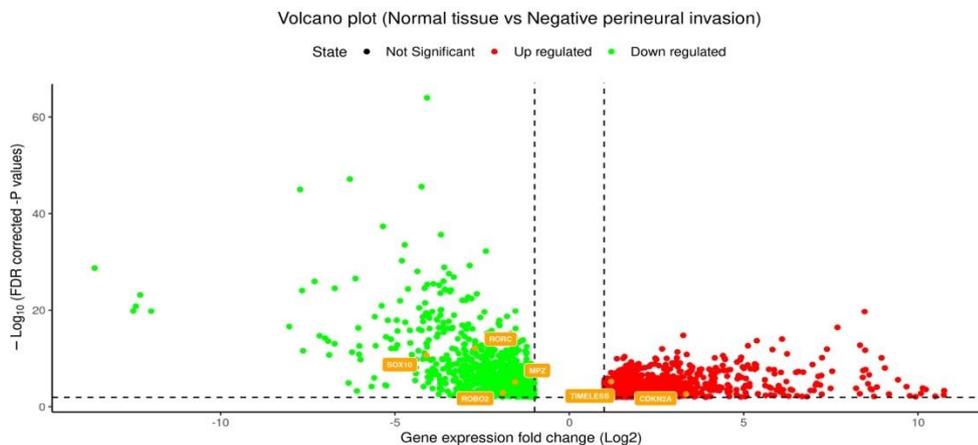


Figura 7 - Análise da expressão de genes que participam da desdiferenciação das células de Schwann.

6.3. ANÁLISE DE GENES RELACIONADOS AO RELÓGIO

Tendo em vista que a via do ritmo circadiano foi identificada em ambas as análises do Pathfinder e David e a fim de entender o mecanismo pelo qual a via supracitada auxilia no desenvolvimento neoplásico, foram identificados a lista de genes específica para o ritmo circadiano. Em amostras negativas de invasão perineural, observamos aumento da expressão dos genes *SERPINE1*, *MMP9*, *NOX4*, *OIP5* e *NUF2*, e diminuição dos níveis de *RORC*, *KAT2B*, *RORA* e *NPAS2*. Da mesma forma, a invasão perineural positiva mostrou regulação positiva de *CDKN2A*, *FOXP3*, *OXTR*, *TIMELESS* e *ARNTL*, e regulação negativa de *DLK1*, *PPARGC1A*, *RASD1*, *DEFB1*, *PER2*, *ID2*, *CRY2*, *S100A8*, *NR1D2*, *ARRB1*, *PER1*, *TGFB2*, *RORC* e *KAT2B*

6.4. ANÁLISE DA ALTERAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS, METILAÇÃO GÊNICA E CORRELAÇÃO

Os dados de alteração do número de cópias, comparando ambos os grupos de tecido neoplásico, não identificou nenhuma associação significativa considerando todos os genes disponíveis no banco de dados (Figura 4).

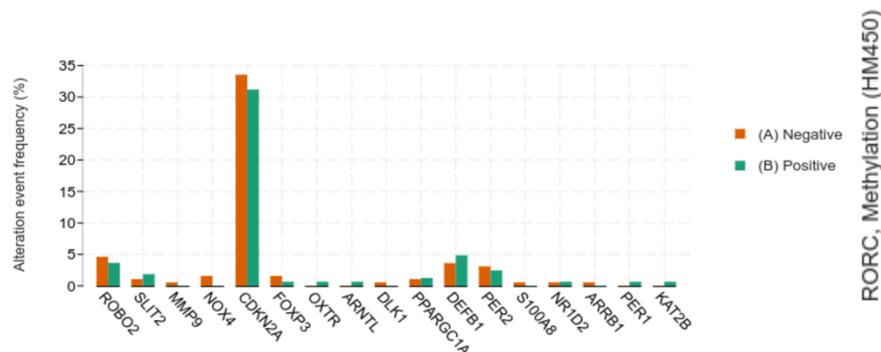


Figura 8 – Frequência das metilações dos genes *SOX10*, *ROBO2*, *SLIT2*, *EGR2*, *MPZ*, *SERPINE1*, *MMP9*, *NOX4*, *OIP5*, *NUF2*, *RORC*, *KAT2B*, *RORA*, *NPAS2*, *CDKN2A*, *FOXP3*, *OXTR*, *TIMELESS*, *ARNTL*, *DLK1*, *PPARGC1A*, *RASD1*, *DEFB1*, *PER2*, *ID2*, *CRY2*, *S100A8*, *NR1D2*, *ARRB1*, *PER1*, *TGFB2*, *RORC* e *KAT2B* comparando nos grupos positivos e negativos para invasão perineural.

A análise de metilação comparando os grupos tumorais demonstrou que apenas os genes *PER2* e *RORC* apresentaram hipermetilação nas amostras positivas para invasão perineural quando comparado ao grupo negativo. Foi identificado correlação negativa entre a expressão e a metilação dos respectivos genes, quando analisados separadamente em ambos grupos tumorais (Figura 5).

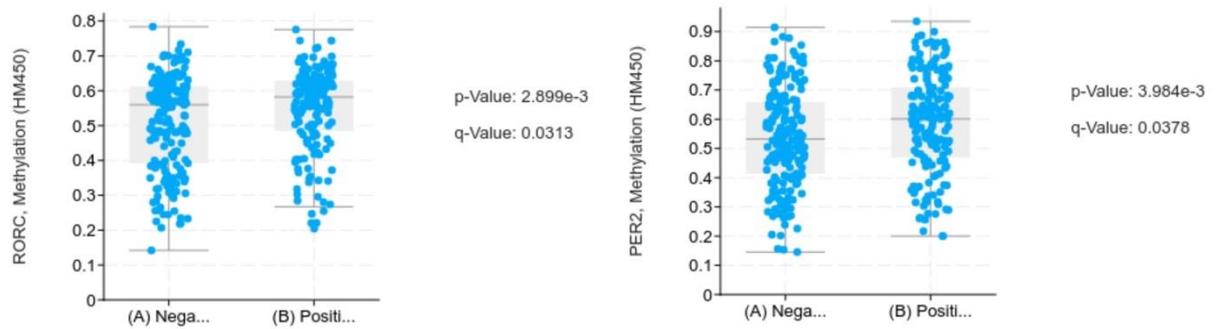


Figura 9- Análise da metilação dos genes RORC e PER2, demonstrando que ambos estão metilados nas amostras com invasão perineural.

As correlações positivas entre as expressões de *PER2* e *RORC*, bem como de *RORC* com os genes *MPZ*, *S100A8* e *NUF2*, foram identificadas apenas nos grupos de pacientes que não apresentaram invasão perineural. Com relação a análise de expressão proteica, apenas a proteína mTOR apresentou associação, demonstrando aumento da expressão nos pacientes que apresentam invasão (Figura 6).

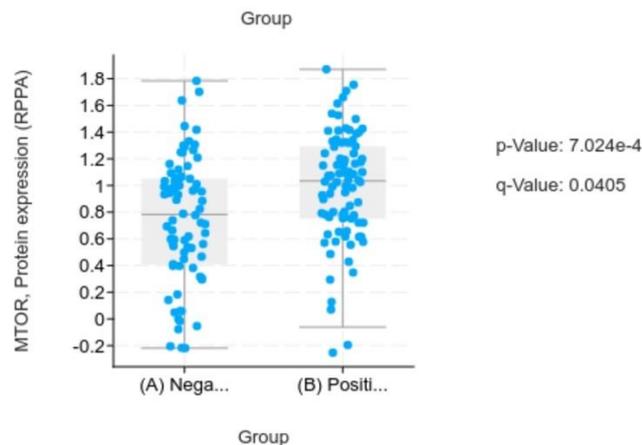


Figura 10 - A expressão da proteína mTOR está aumentada nas amostras positivas para a invasão perineural

6.5. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA E SOBREVIDA

A visualização da expressão proteica foi realizada pela plataforma *The Human Protein Atlas*, demonstrando que o tecido normal expressa os genes *PER2* e *CDKN2A* em maior intensidade quando comparado ao tecido neoplásico (Figura 7). Para as análises de sobrevida, inicialmente foi utilizado a plataforma PRECOG identificando cada gene de forma individual.

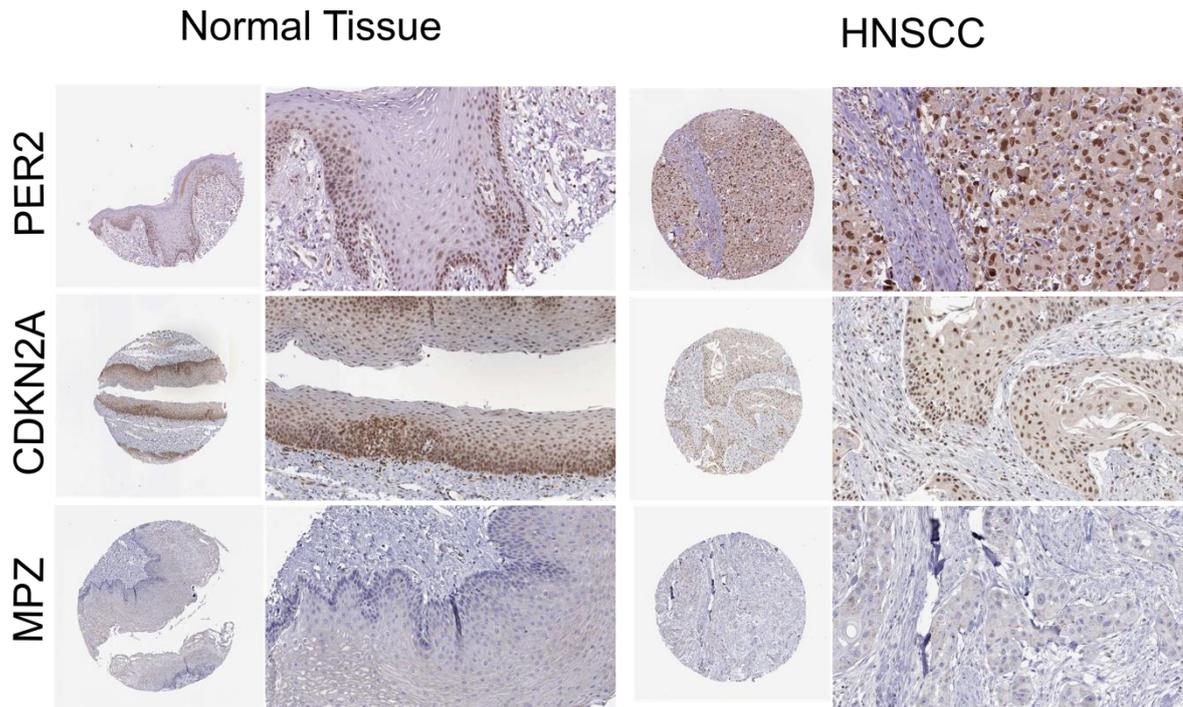


Figura 11- Expressão imunohistoquímica dos genes PER2, CDKN2A e MPZ nas amostras de tecido normal e tecido neoplásico. Fonte: *The Human Atlas*

A expressão diminuída dos genes *KAT2B*, *FOXP3*, *NR1D2* e *ARRB1* e a expressão aumentada do gene *SERPINE1* foram associados a um menor tempo de sobrevida. Uma vez que a plataforma PRECOG não possibilita a análise estratificando por dados clínicos, realizamos análises multivariadas considerando, separadamente, ambos os grupos de tecidos tumorais, negativo e positivo para invasão perineural. A expressão aumentada do gene *CDKN2A* foi associada ao menor tempo de sobrevida dos pacientes com invasão perineural.

7. DISCUSSÃO

O desenvolvimento de um processo neoplásico é constituído por alterações teciduais não apenas nas células primárias, mas também no tecido entorno, constituindo o que conhecemos como microambiente tumoral. Dependendo das características do tumor primário, do estroma e da capacidade intrínseca das células tumorais metastáticas de se adaptarem a um novo local, as células neoplásicas utilizam mecanismos distintos para proliferação, sobrevivência e disseminação. A fim de deixar o tumor primário e se disseminar para órgãos distantes, as células metastáticas perdem a capacidade de aderir às células adjacentes, aumentando sua capacidade migratória e invasiva. Diferentes mecanismos são utilizados nesse processo, sendo que no câncer de cabeça e pescoço, destaca-se a invasão perineural (DEBONDE *et al*, 2017). Diferentes vias moleculares comparando ausência e presença de invasão perineural foram observadas nas análises realizadas, destacando as vias associadas ao guia axonal e ritmo circadiano (TIONG *et al*, 2020).

Apesar de os eventos biológicos associados à invasão perineural não estarem esclarecidos, há o envolvimento de diferentes mecanismos, destacando a participação das células de Schwann. Durante o processo de invasão perineural, as células de Schwann são induzidas a entrarem em processo de desdiferenciação celular por fatores produzidos pelas células do câncer. Em seguida, migram até regiões próximas ao tumor, realizando a interação célula – célula (DEBONDE *et al*, 2017). As células de Schwann, então, carregam as células neoplásicas até a região axonal do sistema nervoso periférico. Alguns genes são descritos como participantes desse fenômeno, destacando os genes *GAP43*, *NCAM1*, *NGFR* e *GFAP* que têm a expressão aumentada durante o processo de desdiferenciação das células de Schwann (ZHANG *et al*, 2017).

No presente estudo, nenhum dos genes supracitados foram associados à expressão gênica nos diferentes grupos tumorais. No entanto, analisando a expressão dos genes que mantêm a diferenciação das células de Schwann, foi identificado que os genes *SOX10* e *ROBO2* estão com a expressão diminuídas em ambos os grupos (negativos e positivos para a invasão perineural), enquanto *SLIT2*, *EGR2* e *MPZ* foram identificados com a expressão diminuída apenas em tumores positivos para a invasão perineural. O aumento da expressão dos genes *SLIT2*, *EGR2* e *MPZ* podem impedir o desenvolvimento da invasão perineural através da manutenção da diferenciação das células de Schwann no sistema nervoso periférico próximo a região tumoral.

O aumento da expressão dos genes *SLIT2* e *ROBO2* participam do processo de regeneração axonal, induzindo a proliferação das células de Schwann desdiferenciadas e,

posteriormente, auxiliando na formação de componentes que são conhecidos como cordões celulares de Bungner, ou simplesmente bandas de Bungner, que servem como orientação norteadora que direciona a invasão do novo broto axônico em processo regenerativo (WANG et al, 2008). Durante o processo de carcinogênese, ocorre a inativação dos genes *SLIT2* e *ROBO2*, sendo, portanto, considerados como genes supressores de tumor. No presente estudo, foi observado que apenas o gene *SLIT2* está diminuído em amostras de câncer positivos para invasão perineural.

Tendo em vista foram identificadas alterações moleculares associadas a eventos do ritmo circadiano, associamos os DEGs à lista de genes relacionados aos genes *CLOCK*. Os genes *DLK1*, *PPARGC1A*, *RASD1*, *DEFB1*, *PER2*, *ID2*, *CRY2*, *S100A8*, *NR1D2*, *ARRB1*, *PER1* e *TGFB2* apresentaram-se diminuídos exclusivamente nas amostras com invasão perineural; enquanto os genes *CDKN2A*, *FOXP3*, *OXTR*, *TIMELESS* e *ARNTL* apresentaram-se aumentados. Interessantemente, os genes identificados como diminuídos são considerados supressores tumorais, enquanto os aumentados são oncogenes, em diferentes tipos de tecidos tumorais.

Nenhum estudo tem demonstrado associação entre a invasão peritumoral e alterações nos genes do ritmo circadiano. No entanto, tem sido demonstrado que a desregulação dos genes do ritmo está associada a dificuldades na reparação do tecido nervoso periférico. Ainda, a melatonina, importante mediador do ritmo circadiano, está envolvida na desdiferenciação e aumento da proliferação das células de Schwann (CHEN et al, 2021). Na análise do presente estudo foi observado que os genes *RORC*, *PER2* e *CDKN2A* estão desregulados nos tecidos com a invasão perineural. Enquanto *RORC* e *PER2* apresentam-se diminuídos, o *CDKN2A* está aumentado. *RORC* e *PER2* foram identificados como hipermetilados, enquanto o aumento da expressão de *CDKN2A* foi associado a um menor tempo de sobrevida.

O ritmo circadiano é conhecido biologicamente por comandar e participar de vários processos moleculares, expressando genes específicos como *PER1*, *PER2*, *CRY*, *BMAL1* e *CLOCK*, os genes do relógio biológico podem influenciar diretamente em vários eventos moleculares, dentre eles destaca-se o ciclo celular, evento de maior importância para a célula por garantir a sua proliferação (SOTÁK et al, 2013). Os genes do relógio atuam principalmente nos chamados “checkpoints” ou pontos de verificação, que garantem à célula a progressão no ciclo no momento adequado e minimizam erros genéticos (KOWALSKA et al, 2013).

Um dos pontos de verificação mais estudados é a passagem da fase G1 para a fase S onde são encontradas as proteínas P14 e/ou P16, codificadas pelo mesmo gene *CDKN2A*, essas proteínas são capazes de interromper o ciclo celular ao detectar qualquer tipo de erro e devido

essa característica são consideradas supressores tumorais (STOTT et al, 1988), além disso, a proteína p14 pode atuar estabilizando indiretamente a proteína p53 por conseguir interagir com a proteína MDM2 responsável por degradar a p53 (ZHANG et al, 1999). Como citado anteriormente, os genes do relógio biológico atuam em checkpoints específicos, já foi observado que o gene PER1 consegue exercer influência direta sobre o gene CDKN2A controlando sua ritmicidade. Em eventos neoplásicos, observa-se uma baixa expressão de PER1 e consequentemente de CDKN2A (KOWALSKA et al, 2013), sem esse ponto de checagem funcionando a célula consegue proliferar descontroladamente e garantir um maior sucesso na progressão tumoral. As mutações nos genes *TP53* e *CDKN2A* são as mais observadas em pacientes que apresentam invasão perineural afetando pelo menos 50% e 30% respectivamente dos pacientes, sendo consideradas as principais nesse evento molecular (MOREIRA et al, 2021).

A regulação negativa do gene *PER2* pode ser evidenciada pelo aumento da expressão da via de sinalização PI3K-Akt em células A549/DDP de câncer de pulmão. A restrição da expressão de PTEN, um regulador negativo da sinalização PI3K/AKT, e a interação com as subunidades P110, responsáveis pela condução intracelular de sinais extracelulares, por *PER2*, podem estar relacionadas ao aumento da expressão desta via. A regulação negativa do gene *PER2* pode estar relacionada a redução da apoptose e maior proliferação celular (CHEN et al, 2017). Foi relatado que a diminuição da expressão de *PER2* está relacionada com a diminuição da expressão da caspase-8, colaborando para a redução da apoptose e favorecendo a carcinogênese. Além disso, sua expressão foi correlacionada positivamente com P14ARF, onde este, contendo MDM2, aumentaria o nível intracelular de P53 funcional, à medida que diminuiria sua ubiquitinação e degradação

Temos visto que *PER2* tem sido associado a regulação da síntese proteica e proliferação celular. Além disso, WU et al, sugeriu que *PER2* regula negativamente a síntese proteica pela inibição de mTORC1. A sinalização mTOR está associada a síntese protéica, metabolismo de lipídios e glicose, autofagia e controle translacional. Em resumo, mTORC1 fosforila 4E-BPs o que permite a dissociação de eIF4E, desta forma a tradução de mRNA dependente de cap é iniciada (CAO et al, 2018). O mTOR é importante para a sincronização do relógio biológico, pois o aumento da fosforilação da 4E-BPs em pela luz em Thr37/46 no SCN é dependente de mTORC1. No entanto, é bem conhecido que a sinalização mTORC1 é fundamental para a progressão do ciclo celular, proliferação celular e metabolismo (LIU, et al 2009).

Por meio de *splicing* alternativo e uso de promotor, cada gene *ROR* produz várias isoformas que são expressas de uma maneira altamente específica do tecido. Os *RORs* têm sido implicados na regulação do desenvolvimento embrionário e em vários processos metabólicos e

imunológicos. A perda da expressão de *RORC* altera significativamente o padrão do relógio biológico, alterando o pico de expressão de vários genes do relógio. Ainda, perda da expressão de *RORC* reduz significativamente a expressão dos genes *CRY1*, *REV-ERB*, *E4BP4*, *PER2* e *BMAL1* (TAKEDA et al, 2021). No presente estudo, foi identificada correlação significativa entre a expressão de *RORC* e *PER2* sugerindo coparticipação no desenvolvimento neoplásico.

Em nosso estudo podemos visualizar um aumento da expressão de mTOR em pacientes que apresentaram invasão perineural. Outros estudos também têm associado o mTOR a capacidade de invasão tumorigênica. Petel et al. (2010) mostraram que a inibição do mTOR com rapamicina e everolimus diminui a linfangiogênese no tumor primário e impede a disseminação de células cancerosas de cabeça e pescoço para os linfonodos cervicais. O que pode ser ressaltado pelo aumento da expressão da via PI3K-Akt, mostrado neste estudo, pois estaria associada às propriedades invasivas do tumor.

8. CONCLUSÃO

Em conclusão os dados demonstram que as vias de “ritmo circadiano” e “orientação axônica” apresentaram-se desreguladas em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço com invasão perineural positiva. As análises da expressão diferencial identificaram que os genes associados à resposta das células de Schwann em nervos lesados que são regulados positivamente ativam a via do “ritmo circadiano”.

Foi identificado correlação negativa entre a expressão e a metilação dos genes *PER3* e *RORC*, quando analisados separadamente em ambos grupos tumorais. As correlações positivas entre as expressões de *PER2* e *RORC*, bem como de *RORC* com os genes *MPZ*, *S100A8* e *NUF2*, foram identificadas apenas nos grupos de pacientes que não apresentaram invasão perineural. Os genes do ritmo circadiano estão desregulados nos tecidos neoplásicos, estando os oncogenes com a expressão aumentada e os supressores de tumor com a expressão diminuída. O aumento da expressão da proteína mTOR foi identificada nos pacientes que apresentaram invasão perineural.

Os dados sugerem que a desdiferenciação e proliferação das células de Schwann podem estar associadas à desregulação de genes do ritmo circadiano; conseqüentemente, as células de Schwann produzem diferentes fatores que participarão de diversos processos de progressão tumoral e invasão dos tecidos adjacentes, incluindo ativação da via mTOR. Esses processos também podem estar envolvidos na invasão tumoral no tecido perineural no câncer de cabeça e pescoço.

9. REFERÊNCIAS

BAKST, RICHARD L.; GLASTONBURY, CHRISTINE M.; PARVATHANENI, UPENDRA; KATABI, NORA; HU, KENNETH S.; YOM, SUE S. Perineural Invasion and Perineural Tumor Spread in Head and Neck Cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, v. 103, p. 1109–1124, 2019.

BEHRAM, K. Y.; SARIKCIOGLU, L. Melatonin and its therapeutic actions on peripheral nerve regeneration. *Folia Morphol (Warsz)*, v. 74, p. 283–289, 2015.

BERNIER, J.; DOMENGE, C.; OZSAHIN, M.; MATUSZEWSKA, K.; LEFÈBVRE, J.; GREINER R, ET AL. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. *N Eng J Med*, p.1945-1952, 2004.

BERNIER. J.; COOPER. J.; PAJAK. T.; VAN GLABBEKE, M. BOURHIS, J.; FORASTIERE, A. Defining risk levels in locally advanced head and neck cancers: a comparative analysis of concurrent postoperative radiation plus chemotherapy trials of the EORTC (#22931) and RTOG (# 9501). *Head Neck*, p.843-850, 2005.

BEN-SHLOMO, R.; CHRONODISRUPTION, cell cycle checkpoints and DNA repair. *Indian J Exp Biol*, v. 52, p. 399–403, 2014.

BINMADI, N. O.; BASILE, J. R. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: A discussion of significance and review of the literature. *Elsevier Ltd*, v. 47, 2011.

CAO, R. mTOR Signaling, Translational Control, and the Circadian Clock. *Front Genet*, p.360:367, 2018.

CARR, L.; PARKINSON, D. B.; DUN, X. P. Expression patterns of Slit and Robo family members in adult mouse spinal cord and peripheral nervous system. *PLoS One*, 2017.

CAMPANA, I. G.; GOIATO, M. C. Tumores de cabeça e pescoço: epidemiologia, fatores de risco, diagnóstico e tratamento. *Revista Odontológica de Araçatuba*, v. 34, n. 1, p. 20-31, 2013.

CHAVES, A.L.F.; SANTOS, M.; QUINTANILHA, M.A. et al. Câncer de cabeça e pescoço. Diretrizes oncológicas. Disponível em: <https://diretrizesoncológicas.com.br/wp-content/uploads/2018/10/Diretrizes-oncol%C3%B3gicas-2_Parte4.pdf>. Acesso em 20/12/2021.

CHEN, B.; TAN, Y.; LIANG, Y.; CHEN, L.; WU, S.; XU, W. Per2 participates in AKT-Mediated drug resistance in A549/DDP lung adenocarcinoma cells. *Oncol Lett*, v.13, p.423–428, 2017.

CHEN, K.; ZHU, P.; CHEN, W.; LUO, K.; SHI, X. J.; ZHAI, W. Melatonin inhibits proliferation, migration, and invasion by inducing ROS-mediated apoptosis via suppression of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in gallbladder cancer cells. *Ageing (Albany NY)*, v.13, p.225-229, 2021.

CHIN, D. *et al.* Novel markers for poor prognosis in head and neck cancer. **International Journal of Cancer**, 2005. v. 113, n. 5, p. 789–797.

CHOW, LAURA Q. M. Head and Neck Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 1, p. 60–72, 2020.

CLEMENTS, M. P.; BYRNE, E.; CAMARILLO, G. L. F.; CATTIN, A. L.; ZAKKA, L. ASHRAF, A. The Wound Microenvironment Reprograms Schwann Cells to Invasive Mesenchymal-like Cells to Drive Peripheral Nerve Regeneration. **Neuron** 2017.

COLAPRICO, A; SILVA, T. C.; OLSEN, C.; GAROFANO, L.; CAVA, C.; GAROLINI, D.; Abiolinks: An R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. **Nucleic Acids Res**, p. 44-71, 2016.

DA SILVA, F. A.; ROUSSENQ, S. C.; GONÇALVES DE SOUZA TAVARES, M.; PEZZI FRANCO DE SOUZA, C.; BARRETO MOZZINI, C.; BENETTI, M.; DIAS, M. Perfil Epidemiológico dos Pacientes com Câncer de Cabeça e Pescoço em um Centro Oncológico no Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 66, n. 1, p. 84-95, 2020.

DEBORDE, S.; OMELCHENKO, T.; LYUBCHIK, A.; ZHOU, Y.; HE, S.; MCNAMARA W. F.; Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion. **J Clin Invest** 2016.

DEBORDE, S.; WONG, R. J. How Schwann cells facilitate cancer progression in nerves. **Cell Mol Life Sci**, 2017.

DEMIR, I. E.; BOLDIS, A.; PFITZINGER, P. L.; TELLER, S.; BRUNNER, E.; KLOSE, N. Investigation of schwann cells at neoplastic cell sites before the onset of cancer invasion. **J Natl Cancer Inst**, v. 106, 2014.

GATENBY, R. A.; GILLIES RJ. A microenvironmental model of carcinogenesis. **Nat Rev Cancer**, v. 8, p. 56–61 2008.

GATENBY, R. A.; GILLIES, R. J. Hypoxia and metabolism - Opinion - A microenvironmental model of carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 1, p. 56–61, 2008.

GENDEN, E. M. *et al.* Contemporary management of cancer of the oral cavity. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 267, p.1001–1017, 2010.

GOHRIG, A.; DETJEN, K. M.; HILFENHAUS, G.; KORNER, J. L.; WELZEL. M. ARSENI, R. Axon guidance factor SLIT2 inhibits neural invasion and metastasis in pancreatic cancer. **Cancer Res**, v.74, p.1529–1540, 2014.

JESSEN, K. R.; MORGAN, L.; STEWART, H. J.; MIRSKY, R. Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. **Development**, v. 109, p.91-10, 1990.

HASHIM, D. et al. Head and neck cancer prevention: from primary prevention to impact of clinicians on reducing burden. *Annals of oncology : official Journal of the European Society for Medical Oncology*, v. 30, n. 5, p. 744–756, 2019.

LAUDA, Aline; CHAVES, Freitas; SANTOS, Marcos; AZZI, Marina; CARLOS, Quintanilha; SANTA, Eduardo; BARREIRA, Ritta. **CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO**. [s.l: s.n.]. ISBN: 9788563441010.

JOHNSON D. E, BURTNES B., LEEMANS C. R, Lui V. W. Y, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. **Nat Rev Dis Prim**, v. 6, p.1–22.

KANEHISA, M; SATO, Y; KAWASHIMA, M; FURUMICHI, M; TANABE, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. **Nucleic Acids Res**, v. 44, p. 57–62, 2016.

KOWALSKA E, RIPPERGER JA, HOEGGER DC, BRUEGGER P, BUCH T, BIRCHLER T. NONO couples the circadian clock to the cell cycle. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.110, p.1592–1599, 2013.

LIU, P.; CHENG, H.; ROBERTS, T. M.; ZHAO, J. J. Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer. **Nat Rev Drug Discov**, v.8, p. 627–644, 2009.

LO, H. C.; ZHANG, X. H. F. EMT in Metastasis: Finding the Right Balance. **Dev Cell** 2018.

LOWREY, P. L; TAKAHASHI, J. S. Genetics of circadian rhythms in mammalian model organisms. **Adv Genet**, v. 74, p.175–230, 2011.

MARCHESI, Federica; PIEMONTE, Lorenzo; MANTOVANI, Alberto; ALLAVENA, Paola. Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 21, n. 1, p. 77–82, 2010

MASCOLO, M.; SIANO, M.; ILARDI, G.; RUSSO, D.; MEROLLA, F.; DE ROSA, G. Epigenetic dysregulation in oral cancer. **Int J Mol Sci**, v.13, p.2331-2353, 2012.

MANTOVANI A, CASSATELLA MA, COSTANTINI C, JAILLON S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol**, v. 11, p. 509-531, 2011.

MAZZOCOLI, G.; PAZIENZA, V.; VINCIGUERRA, M. Clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms. **Chronobiol Int** 2012.

MEHANNA, H.; WONG, W.; MCCONKEY, C et al. PET-CT Surveillance versus Neck Dissection in Advanced Head and Neck Cancer. **N Eng J Med**, p. 1444-54, 2016.

Ministério da Saúde, INCA, Estimativa de Câncer no Brasil, 2020.

Ministério da Saúde, INCA, Estimativa de Câncer no Brasil, 2021.

MOREIRA A, POULET A, MASLIAH-PLANCHON J, LECERF C, VACHER S, LARBI CHÉRIF L. Prognostic value of tumor mutational burden in patients with oral cavity squamous cell carcinoma treated with upfront surgery. **ESMO Open**, v.6, 2021.

NANDAKUMAR, A. Survival in Head and Neck Cancers - Results of A Multi-Institution Study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, n. 4, p. 1745–1754, 1 jun. 2016.
NOGUTI, J. *et al.* Metastasis from oral cancer: An overview. **Cancer Genomics and Proteomics**, 2012. v. 9, n. 5, p. 329–336.

NIRVANI, M.; KHUU, C.; UTHEIM, T. P.; SAND. L. P.; SEHIC, A. Circadian clock and oral cancer. **Mol Clin Oncol**, 2018.

OGATA, T. Opposing Extracellular Signal-Regulated Kinase and Akt Pathways Control Schwann Cell Myelination. **J Neurosci**, 2004.

ONCOGUIA. C NCER DE CABEÇA E PESCOÇO. 2021. Disponível em: <http://www.onco-guia.org.br/cancer-home/cancer-de-cabeça-e-pescoco/3/122/>. Acesso em: 24 dez. 2021.

POSWAR, F. D. O.; FRAGA, C. A. D. C.; GOMES, E. S. B.; FARIAS, L. C.; SOUZA, L. W. F., SANTOS, S. H. S. Protein expression of MMP-2 and MT1-MMP in actinic keratosis, squamous cell carcinoma of the skin, and basal cell carcinoma. **Int J Surg Pathol**, v.23, 2015.

SCULLY C, BAGAN J. Oral squamous cell carcinoma overview. **Oral Oncol**, v. 45, p. 301-308, 2009.

SILVA, T.C., COLAPRICO, A.; OLSEN; C.; MALTA, T. M.; BONTEMPI, G.; CECCARELLI, M. TCGAbiolinks GUI: A graphical user interface to analyze cancer molecular and clinical data. **Research**, v.7; p. 437-439, 2018.

SILVA, V. M.; GOMES, J. A.; TENÓRIO, L. P. G.; DE OMENA NETA, G. C.; DA COSTA P. K.; DUARTE, A. K. F. Schwann cell reprogramming and lung cancer progression: A meta-analysis of transcriptome data. **Oncotarget**, 2019.

SOTÁK, M.; POLIDAROVÁ, L.; ERGANG, P.; SUMOVÁ, A.; PÁCHA, J. An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors. **Int J Cancer**, v. 132, p.1032–1041, 2013.

STOTT, F. J.; BATES, S.; JAMES, M. C.; MCCONNELL BB, STARBORG M, BROOKES S, ET AL. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. **EMBO J**, v. 17, 5001–5014, 1998.

SU; S.; LIAO, J.; LIU, J.; HUANG, D.; HE, C.; CHEN, F. Blocking the recruitment of naive CD4+ T cells reverses immunosuppression in breast cancer. **Cell Res** 2017.

TANAKA T, TANAKA M, TANAKA T. Oral Carcinogenesis and Oral Cancer Chemoprevention: A Review. **Patholog Res Int.** p. 1-10, 2011.

TAKEDA, Y.; JOTHI, R.; BIRAULT, V.; JETTEN, A. M. RORc directly regulates the circadian expression of clock genes and downstream targets *in vivo* **Nucleic Acids Research** v. 40, Pages 8519–8535, 2012.

TIONG, Y. L; NG, KY; KOH R. Y.; PONNUDURAI G.; CHYE, S. M. Melatonin promotes Schwann cell dedifferentiation and proliferation through the Ras/Raf/ERK and MAPK pathways, and glial cell-derived neurotrophic factor expression. **Exp Ther Med**, v. 20, p. 1–12, 2020.

UHLEN, M.; ZHANG, C.; LEE, S.; SJÖSTEDT, E.; FAGERBERG, L; BIDKHORI, G. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. **Science**, v. 80, p. 357, 2017.

UPILE, T. et al. Head and neck optical diagnostics: vision of the future of surgery. **Head & Neck Oncology**, v. 1, n. 1, p. 25, 13 dez. 2009.

WANG, L. J.; ZHAO, Y.; HAN, B.; MA, Y. G.; ZHANG, J.; YANG, D. M. Targeting Slit-Roundabout signaling inhibits tumor angiogenesis in chemical-induced squamous cell carcinogenesis. **Cancer Sci**, v. 29:510–517.

WEBBER, C. A.; CHRISTIE, K. J.; CHENG, C.; MARTINEZ, J. A.; SINGH, B.; SINGH, V. Schwann cells direct peripheral nerve regeneration through the Netrin-1 receptors, DCC and Unc5H2. **Glia**, v. 59, p. 1503-1517, 2011.

ZHANG Y, XIONG Y. Mutations in Human ARF Exon 2 Disrupt Its Nucleolar Localization and Impair Its Ability to Block Nuclear Export of MDM2 and p53. **Mol Cell**, v. 3, p. 579–591, 1999.

ZHANG, X.; PATTERSON, T. A.; PAULE, M. G.; WANG, C.; SLIKKER, W. Schwann cells. **Neural Cell Biol.**, p. 347, 2017.

ZHOU, Y.; SHURIN, G. V.; ZHONG, H.; BUNIMOVICH, Y. L.; HAN, B.; SHURIN, M. R. Schwann cells augment cell spreading and metastasis of lung cancer. **Cancer Res**, v. 78, p. 5927–5939. 2018.

10. PRODUTOS

10.1. PATENTE



24/12/2020 870200161333
10:00

29409161927414619

Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2020 026678 0

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24464109000148

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. Lourival Melo Mota, s/n, Tabuleiro do Martins

Cidade: Maceió

Estado: AL

CEP: 57072-970

País: Brasil

Telefone: 82-3214-1064

Fax: 82-3214-1035

Email: nit@propep.ufal.br

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Peticionamento Eletrônico em 24/12/2020 às 10:00, Petição 870200161333

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): PAINEL GENÉTICO NO PROGNÓSTICO E PREDIÇÃO DE NEOPLASIA ORAL

Resumo: A presente invenção descreve um painel para prognóstico de Câncer Oral que prevê o diagnóstico, prognóstico e predição de neoplasias oral através da detecção do um aumento ou diminuição da expressão gênica de um ou mais dos biomarcadores, relacionados a recorrência, progressão ou metástase da doença. O painel utiliza o perfil de expressão obtidos pelas análises de RNAseq, enfatizando a sobrevida, o estadiamento, o subtipo e a recidiva nos diferentes subtipos. Para as análises foram selecionados dados de RNAseq do TCGA, estratificados por local da lesão e por estadiamento. Posteriormente, usando o software TCGAbiolinks no software R, foram feitas análises de expressão diferencial. Os genes obtidos foram submetidos à análise no KMPLLOT, sendo selecionados aqueles que impactavam negativamente a sobrevida. Para visualizar das vias de associação dos genes selecionados, executou-se o Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis (DAVID). Outros métodos foram usados para confirmar os dados, identificar as vias metabólicas e a associação do gene com a recidiva tumoral.

Figura a publicar: 1

**PETICIONAMENTO
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 24/12/2020 às 10:00, Petição 870200161333

10.2. ARTIGO

Invasão perineural no carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço: Impacto de genes relacionados ao ritmo circadiano

Rodger Marcel Lima Rocha¹, Genilda Castro de Omena Neta¹, Alexandre Wendell Araujo Moura¹, Ana Kelly Fernandes Duarte¹, Hellem Cristina dos Santos Lima¹, Wallison Justino da Silva¹, Carlos Alberto de Carvalho Fraga^{1*}

¹ Federal University of Alagoas, Campus Arapiraca. Av. Manoel Severino Barbosa, Bom Sucesso, Arapiraca, AL 57309-005, Brazil.

*Corresponding author: Carlos Alberto de Carvalho Fraga. Federal University of Alagoas, Campus Arapiraca, Av. Manoel Severino Barbosa, Bom Sucesso, Arapiraca, AL 57309-005, Brazil Tel. +55 82 991931405; E-mail: carlos.fraga@arapiraca.ufal.br

Resumo

Durante os processos de formação e progressão tumoral há o envolvimento da ação de células que criam um microambiente favorável para o desenvolvimento do câncer. Dentre os mecanismos que atuam nesses eventos, encontra-se alterações de ritmo circadiano e invasão perineural. Ambos os eventos foram descritos, separadamente, como atuantes na agressividade tumoral. É importante identificar eventos relacionados à alteração do ritmo circadiano que são associados ao câncer que possam impactar diretamente na invasão deste tecido no sistema nervoso periférico. Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a invasão perineural em câncer de cabeça e pescoço, associando a genes relacionados ao sistema nervoso periférico e ao ritmo circadiano. Os dados demonstram que as vias de “ritmo circadiano” e “orientação axônica” apresentaram-se desreguladas em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço com invasão perineural positiva. As análises da expressão diferencial identificaram que os genes associados à resposta das células de Schwann em nervos lesados que são regulados positivamente ativam a via do “ritmo circadiano”. Foi identificada correlação negativa entre a expressão e a metilação

dos dos genes *PER3* e *RORC*, quando analisados separadamente em ambos os grupos tumorais. As correlações positivas entre as expressões de *PER2* e *RORC*, bem como de *RORC* com os genes *MPZ*, *SI00A8* e *NUF2*, foram identificadas apenas nos grupos de pacientes que não apresentaram invasão perineural. Os genes do ritmo circadiano estão desregulados nos tecidos neoplásicos, estando os oncogenes com a expressão aumentada e os supressores de tumor com a expressão diminuída. O aumento da expressão da proteína mTOR foi identificada nos pacientes que apresentam invasão perineural. Os dados sugerem que a desdiferenciação e proliferação das células de Schwann podem estarem associadas à desregulação de genes do ritmo circadiano; consequentemente, as células de Schwann produzem diferentes fatores que participarão de diversos processos de progressão tumoral e invasão dos tecidos adjacentes, incluindo ativação da via mTOR. Esses processos também podem estar envolvidos na invasão tumoral no tecido perineural no câncer de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: proliferação; Schwann; progressão tumoral; metástases

Introdução

A invasão neoplásica é um evento que envolve ação de células presentes no microambiente tumoral, que promovem a progressão tumoral através da biointeração com as células neoplásicas circundantes (1). Quando se trata de uma invasão neoplásica num tecido nervoso, as células nervosas constituem o microambiente tumoral inteiro. Células neoplásicas e células nervosas se associam e, em alguns casos, há uma perda completa dos elementos neurais (2,3). A matriz extracelular desempenha um papel crítico no microambiente tumoral. Durante a formação do tumor, as células neoplásicas se ligam a moléculas presentes na matriz extracelular, o que facilita a comunicação com outras células, como neutrófilos, fibroblastos, macrófagos, linfócitos e células do sistema nervoso periférico (4,5). A matriz extracelular é especialmente importante na formação e invasão do tumor, pois as células respondem e se adaptam ao microambiente local. Isso envolve tanto a proliferação desregulada de células tumorais quanto a modificação do ambiente imediato para favorecer a sobrevivência celular, angiogênese e crescimento tumoral. Fatores que podem degradar a matriz extracelular também facilitam a formação e invasão tumoral (6,7).

Além da degradação da matriz, outro aspecto importante na formação e invasão do tumor é o processo denominado transição epitélio-mesenquimal. A transição epitelial-mesenquimal permite que as células epiteliais dos tumores produzam fatores geralmente encontrados na matriz extracelular (8). No contexto de uma progressão tumoral, vários tipos celulares podem contribuir para sua evolução, incluindo as células de Schwann que estão diretamente associadas com a interação das células neoplásicas nos nichos tumorais em que há presença de tecido nervoso periférico (9).

Dependendo da biologia tumoral, as células de Schwann podem participar deste microambiente tumoral. As células neoplásicas produzem fatores que mimetizam o processo de resposta dos axônios periféricos a lesão nervosa (10,11). Dessa forma, as células de Schwann podem se desdiferenciar, migrando para a região próxima as células neoplásicas, e, carreando-as para a região axonal periférica, já nos estágios iniciais da carcinogênese. As células de Schwann também degradam matriz extracelular que, por consequência, formam lúmens revestidos com laminina, que são utilizadas como ductos de migração por células neoplásicas (12).

O relógio circadiano e a resposta à lesão no sistema nervoso periférico possuem semelhanças conceituais e moleculares, pois ambos são constituídos por processos que apresentam alças de regulação interligadas e apresentam sequências de transcrição, tradução, modificação e degradação de proteínas (13). Existem interações entre essas vias e, quando há uma

desregulação no ritmo circadiano, há uma alteração nos mecanismos de controle da resposta à lesão axonal (13,14). O ritmo circadiano parece coordenar a progressão do reparo axonal (15). Alterações da expressão dos genes do relógio podem aumentar a susceptibilidade ao câncer através dos efeitos nos mecanismos biológicos que regulam o dano e reparo ao DNA, o metabolismo energético, crescimento e morte celular em tecidos neoplásicos (13,16). Genes que fazem parte do mecanismo de regulação do ciclo celular já foram descritos por apresentarem alteração em sua expressão em pacientes com leucemias associadas à desregulação de genes do relógio. Estudos em modelos animais com câncer oral, mostraram que os padrões de expressão para os genes do relógio apresentaram sua expressão rítmica alterada no tecido tumoral (17).

Os estudos anteriores sugerem que os genes do relógio desregulam e podem participar do microambiente tumoral juntamente com as células de Schwann, controlando diversos fatores que beneficiam as células do câncer. Durante esse processo, as células de Schwann podem se desdiferenciar e auxiliar no processo de progressão neoplásica (17). Essas células então migram para a região próxima ao tecido tumoral e auxiliam no desenvolvimento da célula neoplásica (15,18). Nesse contexto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a invasão perineural em câncer de cabeça e pescoço, associando a genes relacionados ao sistema nervoso periférico e ao ritmo circadiano.

Métodos

Coleta de lista de genes

A coleta da lista de genes foi realizada utilizando o *Entrez Gene* do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/) e GeneCards (<https://www.genecards.org/>), usando os identificadores para os genes associados ao ritmo circadiano e resposta das células de Schwann em nervos lesados, separadamente. A lista de genes e a análise de genes expressos diferencialmente (DEGs) foram combinados e identificados com um *Interactivenn* (<http://www.interactivenn.net/>).

RNA-seq e dados de informações clínicas do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA)

O pacote TCGAAbiolinks, um pacote do software R/ Bioconductor (<http://bioconductor.org/packages/release/bioc/html/TCGAAbiolinks.html>) foi utilizado para realizar o download dos dados genômicos e clínicos de tecidos tumorais normais e tecidos neoplásicos presentes no banco de dados do *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). O tipo de câncer selecionado foi o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (HNSC). Os valores significativos utilizados como critério foram considerados como valor de p ajustado $< 0,05$ e logaritmos ≥ 1 (19,20). As análises da *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) estavam disponíveis no banco de dados Pathfinder (pacote do software R) e DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/>), recursos de dados composto por uma base de conhecimento de biologia integrada e ferramentas de análise para extrair informações biológicas significativas de grandes quantidades de genes e coleções de proteínas. O valor de $p < 0,05$ foi definido como critério de corte (21).

Análises de expressão de câncer de cabeça e pescoço

Vários outros recursos da web foram usados como fonte de informações, enquanto alguns outros foram usados como ferramentas de análise para estudos de expressão do câncer de cabeça e pescoço. As análises de metilação foram realizadas usando o conjunto de dados MEXPRESS (<https://mexpress.be/?ref=labworm>), consistindo em dados de metilação do DNA (Illumina Infinium Human Methylation 450 K Bead array, Illumina, EUA) e o valor β , foi considerado significativamente hipermetilado somente se o valor foi encontrado em mais de 5% dos tumores. As análises da alteração do número de cópias e sobrevida associada foram realizadas no portal *cBio Cancer Genomics* (<http://cbioportal.org>). A análise de sobrevida dos dados do TCGA foi confirmada utilizando o banco de dados do *Prediction of clinical outcomes from*

genomics (PRECOG). Os gráficos de Kaplan-Meier foram desenhados usando o PRECOG para explorar a associação entre o resultado clínico e a expressão gênica e para visualizar as diferenças no tempo de sobrevida dos pacientes.

Resultados

Genes diferencialmente expressos (DEGs), enriquecimento da ontologia gênica e classificação funcional

Inicialmente, os dados de expressão gênica pertencentes a espécimes de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço foram obtidos do banco de dados do TCGA; esses dados foram pré-processados usando métodos padrão. Realizamos uma análise de genes diferencialmente expressos (DEG) em amostras negativas e positivas de invasão perineural, ambas comparadas ao tecido normal. Em seguida, foi realizada a análise de enriquecimento via sub-redes ativas, identificando vias de sinalização em redes de interação proteína-proteína usando o pacote Pathfinder. Ciclo celular, replicação do DNA, via da anemia de Fanconi, via de sinalização Ras, via de sinalização ErbB, via de sinalização MAPK, senescência celular, via de sinalização do cálcio, adesão focal, ritmo circadiano e vias de orientação axônica foram observadas em amostras positivas de invasão perineural. Ciclo celular, Adesão focal, Interação ECM-receptor, Proteoglicanos no câncer, Invasão bacteriana de células epiteliais, Regulação do citoesqueleto de actina, Via da anemia de Fanconi, Senescência celular, Câncer de pulmão de pequenas células, Maturação de oócitos mediada por progesterona, Carcinogênese viral, Via de sinalização Rap1, Diferenciação de osteoclastos, meiose de oócitos, orientação de axônios e ritmo circadiano foram identificadas em amostras teciduais negativas para a invasão perineural (Figura 1A, Tabela Suplementar 1).

Uma vez que o foco do estudo foi avaliar as DEGs em amostras de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço de invasão perineural negativa e positiva, realizamos uma coleta de lista de genes usando o *Entrez Gene* do NCBI e *GeneCards*, que foram usados como identificadores para os genes associados à “resposta das células de Schwann em nervos lesados”. Analisando os genes que exclusivamente estavam associados à invasão perineural, foram identificados que os genes *NTRK1*, *NDRG1*, *CNTNAP1*, *NRG1*, *EGFR*, *GJA1*, *IFNG*, *TH*, *NINJ2*, *ITGB4*, *TUBB3*, *CDH2*, *CDKN2A*, *PRNP*, *PDGFRB*, *HTRA1*, *SNAP25*, *SPP1*, *CXCL10*, *POU3F1*, *MYO5A*, *SEMA3A*, *TYMP*, *CCL5*, *RTN4R*, *IL2RA*, *CNTNAP2*, *SIGMAR1*, *PRF1*, *KRT14*, *MSN*, *PTPRZ1*, *ITPR3*, *MKI67*, *IRS1*, *TUBB*, *BRIP1*, *HOXA1*, *SERPINE2*, *F2R*, *TGFA*, *TFRC* e *KRT5* tiveram a expressão aumentada em amostras teciduais positivos para a invasão

perineural; enquanto *MPZ, GJB1, IL6, EGR2, S100B, NTF3, PLP1, IGF1, FGF2, CCL2, ACHE, AQP4, EGF, EDNRB, MYOC, EGR1, FOS, BCL2, ATP1A3, RAPSN, NOS1, NTRK3, DMD, MB, S100A1, CD36, CD34, MITF, AQP1, NR4A2, SELE, ADCYAP1, ERBB4, TRIM2, FGF1, MEF2C, NTN1, FGFR2, FABP7, TGFB2, CXCL12, TYRP1, ATP1A2, GFRA1, ADCY6, INSR, PLA2G2A, CADM1, GLUL, SPTBN4, LIFR, ATF3, CADM3, HBEGF, PLCB1, CAMK2B, TFF3, IL6ST, NFIC, CAV3, PGR, SLIT2, TXLNB* e *CTSF* foram regulados negativamente. Da mesma forma, realizamos análise de nos tecidos neoplásicos negativos para a invasão perineural e observamos que apenas o gene *TRPA1* estava aumentado positivamente. Nenhum gene foi identificado com a expressão diminuída nas amostras de tecido neoplásico negativo para a invasão perineural (Figura 1B).

A análise do bando de dados do David foi utilizada a fim de entender quais as vias biológicas estão associadas aos genes da lista que foram combinados com as DEGs. Junção de adesão, via de sinalização PI3K-Akt, Glioma, resistência ao inibidor de tirosina quinase *EGFR*, Vias no câncer, Regulação do citoesqueleto de actina, via de sinalização de cálcio, via de sinalização de estrogênio e doença associado ao Prion foram associadas as combinações para as DEGs com expressão aumentada (Tabela Suplementar 2). Já as vias de inativação da síntese do paratormônio, via de sinalização *MAPK*, sinalização do cálcio, sinalização do *AGE-RAGE* em complicações diabéticas, resistência ao inibidor da tirosina quinase *EGFR*, secreção de insulina, via de sinalização Rap1 e ritmo circadiano foram associadas à combinação da lista de genes e as DEGs com expressões diminuídas nos tecidos positivos para a invasão (Tabela Suplementar 3).

Análise de genes envolvidos na desdiferenciação de células de Schwann

As células de Schwann produzem proteínas de manutenção da diferenciação celular (*SOX10, EGR2, MBP, ROBO1, ROBO2, SLIT2* e *MPZ*) que, após lesão do sistema nervoso periférico, diminuem sua expressão, provocando a desdiferenciação celular. Imediatamente após a lesão, o corpo celular inicia uma série de respostas metabólicas, reorganização citoplasmática e alterações específicas na expressão gênica (aumentado a expressão dos genes *SOX10, GAP43, NCAM1, NGFR* e *GFAP*) conhecida como reação neuronal. Analisando especificamente a expressão dos genes supracitados, foi identificado que os genes *SOX10* e *ROBO2* estão com a expressão diminuídas em ambos os grupos tanto negativos e positivos para a a invasão perineural, enquanto *SLIT2, EGR2* e *MPZ* foram identificados com a expressão diminuída apenas em tumores positivos para a invasão perineural (Figura 2C-D).

Análise de genes relacionados ao relógio

Tendo em vista que a via do ritmo circadiano foi identificada em ambas as análises do Pathfinder e David e a fim de entender o mecanismo pelo qual a via supracitada auxilia no desenvolvimento neoplásico, foram identificados a lista de genes específica para o ritmo circadiano. Em amostras negativas de invasão perineural, observamos aumento da expressão dos genes *SERPINE1*, *MMP9*, *NOX4*, *OIP5* e *NUF2*, e diminuição dos níveis de *RORC*, *KAT2B*, *RORA* e *NPAS2*. Da mesma forma, a invasão perineural positiva mostrou regulação positiva de *CDKN2A*, *FOXP3*, *OXTR*, *TIMELESS* e *ARNTL*, e regulação negativa de *DLK1*, *PPARGC1A*, *RASD1*, *DEFB1*, *PER2*, *ID2*, *CRY2*, *S100A8*, *NR1D2*, *ARRB1*, *PER1*, *TGFB2*, *RORC* e *KAT2B* (Figura 2C-D).

Análise da alteração do número de cópias, metilação gênica e correlação

Os dados de alteração do número de cópias, comparando ambos os grupos de tecido neoplásico, não identificou nenhuma associação significativa considerando todos os genes disponíveis no banco de dados (Figure 2 A). A análise de metilação comparando os grupos tumorais demonstrou que apenas os genes *PER2* e *RORC* apresentaram hipermetilação nas amostras positivas para invasão perineural quando comparado ao grupo negativo. Foi identificado correlação negativa entre a expressão e a metilação dos respectivos genes, quando analisados separadamente em ambos grupos tumorais (Figure 2 B-C). As correlações positivas entre as expressão de *PER2* e *RORC*, bem como de *RORC* com os genes *MPZ*, *S100A8* e *NUF2*, foram identificadas apenas nos grupos de pacientes que não apresentaram invasão perineural. Com relação a análise de expressão proteica, apenas a proteína mTOR apresentou associação, demonstrando aumento da expressão nos pacientes que apresentam invasão (Figure 2D).

Análise imunohistoquímica e Sobrevida

A visualização da expressão proteica foi realizada pela plataforma *The Human Protein Atlas*, demonstrando que o tecido normal expressa os genes *PER2* e *CDKN2A* em maior intensidade quando comparado ao tecido neoplásico (Figura 4). Para as análises de sobrevida, inicialmente foi utilizado a plataforma PRECOG identificando cada gene de forma individual. A expressão diminuída dos genes *KAT2B*, *FOXP3*, *NR1D2* e *ARRB1* e a expressão aumentada do gene *SERPINE1* foram associados a um menor de tempo de sobrevida. Uma vez que a plataforma PRECOG não possibilita a análise estratificando por dados clínicos, realizamos análises

multivariadas considerando, separadamente, ambos os grupos de tecidos tumorais, negativo e positivo para invasão perineural. A expressão aumentada do gene *CDKN2A* foi associada ao menor tempo de sobrevida dos pacientes com invasão perineural.

Discussão

O desenvolvimento de um processo neoplásico é constituído por alterações teciduais não apenas nas células primárias, mas também no tecido entorno, constituindo o que conhecemos como microambiente tumoral. Dependendo das características do tumor primário, do estroma e da capacidade intrínseca das células tumorais metastáticas de se adaptarem a um novo local, as células neoplásicas utilizam mecanismos distintos para proliferação, sobrevida e disseminação (22–24). A fim de deixar o tumor primário e se disseminar para órgãos distantes, as células metastáticas perdem a capacidade de aderir às células adjacentes, aumentando sua capacidade migratória e invasiva. Diferentes mecanismos são utilizados nesse processo, sendo que no câncer de cabeça e pescoço, destaca-se a invasão perineural (10,11,25). Diferentes vias moleculares comparando ausência e presença de invasão perineural foram observadas nas análises realizadas, destacando as vias associadas ao guia axonal e ritmo circadiano (15).

Apesar de os eventos biológicos associados à invasão perineural não estarem esclarecidos, há o envolvimento de diferentes mecanismos, destacando a participação das células de Schwann. Durante o processo de invasão perineural, as células de Schwann são induzidas a entrarem em processo de desdiferenciação celular por fatores produzidos pelas células do câncer. Em seguida, migram até regiões próximas ao tumor, realizando a interação célula – célula (10,25). As células de Schwann, então, carregam as células neoplásicas até a região axonal do sistema nervoso periférico. Alguns genes são descritos como participantes desse fenômeno, destacando os genes *GAP43*, *NCAM1*, *NGFR* e *GFAP* que tem a expressão aumentada durante o processo de desdiferenciação das células de Schwann (26–28). No presente estudo, nenhum dos genes supracitados foram associados à expressão gênica nos diferentes grupos tumorais. No entanto, analisando a expressão dos genes que mantêm a diferenciação das células de Schwann, foi identificado que os genes *SOX10* e *ROBO2* estão com a expressão diminuídas em ambos os grupos (negativos e positivos para a a invasão perineural), enquanto *SLIT2*, *EGR2* e *MPZ* foram identificados com a expressão diminuída apenas em tumores positivos para a invasão perineural. O aumento da expressão dos genes *SLIT2*, *EGR2* e *MPZ* podem impedir o desenvolvimento da invasão perineural através da manutenção da diferenciação das células de Schwann no sistema nervoso periférico próximo a região tumoral.

O aumento da expressão dos genes *SLIT2* e *ROBO2* participam do processo de regeneração axonal, induzindo a proliferação das células de Schwann desdiferenciadas e, posteriormente, auxiliando na formação de componentes que são conhecidos como cordões celulares de Bungner, ou simplesmente bandas de Bungner, que servem como orientação norteadora que direciona a invasão do novo broto axônico em processo regenerativo (29–31). Durante o processo de carcinogênese, ocorre a inativação dos genes *SLIT2* e *ROBO2*, sendo, portanto, considerados como genes supressores de tumor. No presente estudo, foi observado que apenas o gene *SLIT2* está diminuídos em amostras de câncer positivos para invasão perineural.

Tendo em vista foram identificadas alterações moleculares associadas a eventos do ritmo circadiano, associamos os DEGs à lista de genes relacionados aos genes Clock. Os genes *DLK1*, *PPARGC1A*, *RASD1*, *DEFB1*, *PER2*, *ID2*, *CRY2*, *S100A8*, *NR1D2*, *ARRB1*, *PER1* e *TGFB2* apresentaram-se diminuídos exclusivamente nas amostras com invasão perineural; enquanto os genes *CDKN2A*, *FOXP3*, *OXTR*, *TIMELESS* e *ARNTL* apresentaram-se aumentados. Interessantemente, os genes identificados como diminuídos são considerados supressores tumorais, enquanto os aumentados são oncogenes, em diferentes tipos tecidos tumorais.

Nenhum estudo tem demonstrado associação entre a invasão peritumoral e alterações nos genes do ritmo circadiano. No entanto, tem sido demonstrado que a desregulação dos genes do ritmo está associada à dificuldades na reparação do tecido nervoso periférico. Ainda, a melatonina, importante mediador do ritmo circadiano, está envolvida na desdiferenciação e aumento da proliferação das células de Schwann (32,33). Na análise do presente estudo foi observado que os genes *RORC*, *PER2* e *CDKN2A* estão desregulados nos tecidos com a invasão perineural. Enquanto *RORC* e *PER2* apresentam-se diminuídos, o *CDKN2A* está aumentado. *RORC* e *PER2* foram identificados como hipermetilados, enquanto o aumento da expressão de *CDKN2A* foi associado a um menor tempo de sobrevida.

O ritmo circadiano é conhecido biologicamente por comandar e participar de vários processos moleculares. Expressando genes específicos como *PER1*, *PER2*, *CRY*, *BMAL1* e *CLOCK*, os genes do relógio biológico podem influenciar diretamente em vários eventos moleculares, dentre eles destaca-se o ciclo celular, evento de maior importância para a célula por garantir a sua proliferação (34). Os genes do relógio atuam principalmente nos chamados “checkpoints” ou pontos de verificação, que garantem a célula a progressão no ciclo no momento adequado e minimizam erros genéticos (35).

Um dos pontos de verificação mais estudados é a passagem da fase G1 para a fase S onde são encontradas as proteínas P14 e/ou P16, codificadas pelo mesmo gene *CDKN2A*, essas proteínas são capazes de interromper o ciclo celular ao detectar qualquer tipo de erro e devido essa característica são consideradas supressores tumorais (36), além disso, a proteína p14 pode atuar estabilizando indiretamente a proteína p53 por conseguir interagir com a proteína MDM2 responsável por degradar a p53 (37). Como citado anteriormente, os genes do relógio biológico atuam em checkpoints específicos, já foi observado que o gene *PER1* consegue exercer influência direta sobre o gene *CDKN2A* controlando sua ritmicidade. Em eventos neoplásicos, observa-se uma baixa expressão de *PER1* e consequentemente de *CDKN2A* (35), sem esse ponto de checagem funcionando a célula consegue proliferar descontroladamente e garantir um maior sucesso na progressão tumoral. As mutações nos genes *TP53* e *CDKN2A* são as mais observadas em pacientes que apresentam invasão perineural afetando pelo menos 50% e 30% respectivamente dos pacientes sendo consideradas as principais nesse evento molecular (38).

A regulação negativa do gene *PER2* pode ser evidenciada pelo aumento da expressão da via de sinalização PI3K-Akt em células A549/DDP de câncer de pulmão. A restrição da expressão de PTEN, um regulador negativo da sinalização PI3K/AKT, e a interação com as subunidades P110, responsáveis pela condução intracelular de sinais extracelulares, por *PER2*, podem estar relacionadas ao aumento da expressão desta via. A regulação negativa do gene *PER2* pode estar relacionada a redução da apoptose e maior proliferação celular (39,40). Foi relatado que a diminuição da expressão de *PER2* está relacionada com a diminuição da expressão da caspase-8, colaborando para a redução da apoptose e favorecendo a carcinogênese. Além disso, sua expressão foi correlacionada positivamente com P14ARF, onde este, contendo MDM2, aumentaria o nível intracelular de P53 funcional, à medida que diminuiria sua ubiquitinação e degradação

Temos visto que *PER2* tem sido associado a regulação da síntese proteica e proliferação celular. Além disso, WU et al, sugeriu que *PER2* regula negativamente a síntese proteica pela inibição de mTORC1. A sinalização mTOR está associada a síntese proteica, metabolismo de lipídios e glicose, autofagia e controle translacional. Em resumo, mTORC1 fosforila 4E-BPs o que permite a dissociação de eIF4E, desta forma a tradução de mRNA dependente de cap é iniciada (41). O mTOR é importante para a sincronização do relógio biológico, pois o aumento da fosforilação da 4E-BPs em pela luz em Thr37/46 no SCN é dependente de mTORC1. No

entanto, é bem conhecido que a sinalização mTORC1 é fundamental para a progressão do ciclo celular, proliferação celular e metabolismo (42).

Por meio de splicing alternativo e uso de promotor, cada gene *ROR* produz várias isoformas que são expressas de uma maneira altamente específica do tecido. Os *RORs* têm sido implicados na regulação do desenvolvimento embrionário e em vários processos metabólicos e imunológicos. A perda da expressão de *RORC* altera significativamente o padrão do relógio biológico, alterando o pico de expressão de vários genes do relógio. Ainda, perda da expressão de *RORC* reduz significativamente a expressão dos genes *CRY1*, *REV-ERB*, *E4BP4*, *PER2* e *BMAL1* (43). No presente estudo, foi identificada correlação significativa entre a expressão de *RORC* e *PER2* sugerindo coparticipação no desenvolvimento neoplásico.

Em nosso estudo podemos visualizar um aumento da expressão de mTOR em pacientes que apresentaram invasão perineural. Outros estudos também têm associado o mTOR a capacidade de invasão tumorigênica. Petel et al. (2010) mostraram que a inibição do mTOR com rapamicina e everolimus diminui a linfangiogênese no tumor primário e impede a disseminação de células cancerosas de cabeça e pescoço para os linfonodos cervicais. O que pode ser ressaltado pelo aumento da expressão da via PI3K-Akt, mostrado neste estudo, pois estaria associada às propriedades invasivas do tumor.

Em conclusão os dados demonstram que as vias de “ritmo circadiano” e “orientação axônica” apresentaram-se desreguladas em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço com invasão perineural positiva. As análises da expressão diferencial identificaram que os genes associados à resposta das células de Schwann em nervos lesados que são regulados positivamente ativam a via do “ritmo circadiano”. Foi identificada correlação negativa entre a expressão e a metilação dos genes *PER3* e *RORC*, quando analisados separadamente em ambos os grupos tumorais. As correlações positivas entre as expressões de *PER2* e *RORC*, bem como de *RORC* com os genes *MPZ*, *S100A8* e *NUF2*, foram identificadas apenas nos grupos de pacientes que não apresentaram invasão perineural. Os genes do ritmo circadiano estão desregulados nos tecidos neoplásicos, estando os oncogenes com a expressão aumentada e os supressores de tumor com a expressão diminuída. O aumento da expressão da proteína mTOR foi identificada nos pacientes que apresentam invasão perineural. Os dados sugerem que a desdiferenciação e proliferação das células de Schwann podem estar associadas à desregulação de genes do ritmo circadiano; conseqüentemente, tais células produzem diferentes fatores que participam de diversos processos de progressão tumoral e invasão dos tecidos adjacentes, incluindo

ativação da via mTOR. Esses processos também podem estar envolvidos na invasão tumoral no tecido perineural no câncer de cabeça e pescoço (Figura 5).

Referências

- [1] Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol* 2009. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.01.004>.
- [2] Johnson DE, Burtness B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. *Nat Rev Dis Prim* 2020 61 2020;6:1–22. <https://doi.org/10.1038/s41572-020-00224-3>.
- [3] Tanaka T, Tanaka M, Tanaka T. Oral Carcinogenesis and Oral Cancer Chemoprevention: A Review. *Patholog Res Int* 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/431246>.
- [4] Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2011. <https://doi.org/10.1038/nri3024>.
- [5] Ogata T. Opposing Extracellular Signal-Regulated Kinase and Akt Pathways Control Schwann Cell Myelination. *J Neurosci* 2004. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5520-03.2004>.
- [6] Mascolo M, Siano M, Ilardi G, Russo D, Merolla F, de Rosa G, et al. Epigenetic dysregulation in oral cancer. *Int J Mol Sci* 2012. <https://doi.org/10.3390/ijms13022331>.
- [7] Uhlen M, Zhang C, Lee S, Sjöstedt E, Fagerberg L, Bidkhori G, et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* (80-) 2017;357. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAN2507/SUPPL_FILE/SUPPLEMENTARY-TABLES.ZIP.
- [8] Lo HC, Zhang XHF. EMT in Metastasis: Finding the Right Balance. *Dev Cell* 2018. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.05.033>.
- [9] Zhou Y, Shurin G V., Zhong H, Bunimovich YL, Han B, Shurin MR. Schwann cells augment cell spreading and metastasis of lung cancer. *Cancer Res* 2018. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-18-1702>.
- [10] Deborde S, Omelchenko T, Lyubchik A, Zhou Y, He S, McNamara WF, et al. Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion. *J Clin Invest* 2016. <https://doi.org/10.1172/JCI82658>.
- [11] Silva VM, Gomes JA, Tenório LPG, de Omena Neta GC, da Costa Paixão K, Duarte AKF, et al. Schwann cell reprogramming and lung cancer progression: A meta-analysis of transcriptome data. *Oncotarget* 2019. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.27204>.
- [12] Clements MP, Byrne E, Camarillo Guerrero LF, Cattin AL, Zakka L, Ashraf A, et al. The Wound Microenvironment Reprograms Schwann Cells to Invasive Mesenchymal-like Cells to Drive Peripheral Nerve Regeneration. *Neuron* 2017. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2017.09.008>.
- [13] Ben-Shlomo R. Chronodisruption, cell cycle checkpoints and DNA repair. *Indian J Exp Biol* 2014;52:399–403. <https://doi.org/24851401>.

- [14] Mazzocchi G, Paziienza V, Vinciguerra M. Clock genes and clock-controlled genes in the regulation of metabolic rhythms. *Chronobiol Int* 2012. <https://doi.org/10.3109/07420528.2012.658127>.
- [15] Tiong YL, Ng KY, Koh RY, Ponnudurai G, Chye SM. Melatonin promotes Schwann cell dedifferentiation and proliferation through the Ras/Raf/ERK and MAPK pathways, and glial cell-derived neurotrophic factor expression. *Exp Ther Med* 2020;20:1–1. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.9143>.
- [16] Lowrey PL, Takahashi JS. Genetics of circadian rhythms in mammalian model organisms. *Adv Genet* 2011;74:175–230. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-387690-4.00006-4>.
- [17] Nirvani M, Khuu C, Utheim TP, Sand LP, Sehic A. Circadian clock and oral cancer. *Mol Clin Oncol* 2018. <https://doi.org/10.3892/mco.2017.1518>.
- [18] Webber CA, Christie KJ, Cheng C, Martinez JA, Singh B, Singh V, et al. Schwann cells direct peripheral nerve regeneration through the Netrin-1 receptors, DCC and Unc5H2. *Glia* 2011. <https://doi.org/10.1002/glia.21194>.
- [19] Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, et al. TCGAbiolinks: An R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res* 2016;44:e71. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1507>.
- [20] Silva TC, Colaprico A, Olsen C, Malta TM, Bontempi G, Ceccarelli M, et al. TCGAbiolinksGUI: A graphical user interface to analyze cancer molecular and clinical data. *F1000Research* 2018;7:439. <https://doi.org/10.12688/f1000research.14197.1>.
- [21] Kanehisa M, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res* 2016;44:D457–62. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1070>.
- [22] Binmadi NO, Basile JR. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: A discussion of significance and review of the literature. vol. 47. Elsevier Ltd; 2011. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2011.08.002>.
- [23] Poswar FDO, Fraga CAD, Gomes ESB, Farias LC, Souza LWF, Santos SHS, et al. Protein expression of MMP-2 and MT1-MMP in actinic keratosis, squamous cell carcinoma of the skin, and basal cell carcinoma. *Int J Surg Pathol* 2015;23. <https://doi.org/10.1177/1066896914540998>.
- [24] Gatenby RA, Gillies RJ. A microenvironmental model of carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2008. <https://doi.org/10.1038/nrc2255>.
- [25] Deborde S, Wong RJ. How Schwann cells facilitate cancer progression in nerves. *Cell Mol Life Sci* 2017. <https://doi.org/10.1007/s00018-017-2578-x>.
- [26] Zhang X, Patterson TA, Paule MG, Wang C, Slikker W. Schwann cells. *Neural Cell Biol.*, 2017. <https://doi.org/10.1201/9781315370491>.
- [27] Demir IE, Boldis A, Pfitzinger PL, Teller S, Brunner E, Klose N, et al. Investigation of schwann cells at neoplastic cell sites before the onset of cancer invasion. *J Natl Cancer Inst* 2014. <https://doi.org/10.1093/jnci/dju184>.
- [28] Jessen KR, Morgan L, Stewart HJ, Mirsky R. Three markers of adult non-myelin-forming Schwann cells, 217c(Ran-1), A5E3 and GFAP: development and regulation by neuron-Schwann cell interactions. *Development* 1990.

- [29] Wang LJ, Zhao Y, Han B, Ma YG, Zhang J, Yang DM, et al. Targeting Slit-Roundabout signaling inhibits tumor angiogenesis in chemical-induced squamous cell carcinogenesis. *Cancer Sci* 2008;29:510–7. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00721.x>.
- [30] Gohrig A, Detjen KM, Hilfenhaus G, Korner JL, Welzel M, Arsenic R, et al. Axon guidance factor SLIT2 inhibits neural invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Cancer Res* 2014;74:1529–40. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-1012>.
- [31] Carr L, Parkinson DB, Dun XP. Expression patterns of Slit and Robo family members in adult mouse spinal cord and peripheral nervous system. *PLoS One* 2017. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172736>.
- [32] Chen K, Zhu P, Chen W, Luo K, Shi XJ, Zhai W. Melatonin inhibits proliferation, migration, and invasion by inducing ROS-mediated apoptosis via suppression of the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in gallbladder cancer cells. *Aging (Albany NY)* 2021;13:22502. <https://doi.org/10.18632/AGING.203561>.
- [33] Behram Kandemir Y, Sarikcioglu L. Melatonin and its therapeutic actions on peripheral nerve regeneration. *Folia Morphol (Warsz)* 2015;74:283–9. <https://doi.org/10.5603/FM.2015.0043>.
- [34] Soták M, Polidarová L, Ergang P, Sumová A, Pácha J. An association between clock genes and clock-controlled cell cycle genes in murine colorectal tumors. *Int J Cancer* 2013;132:1032–41. <https://doi.org/10.1002/ijc.27760>.
- [35] Kowalska E, Ripperger JA, Hoegger DC, Bruegger P, Buch T, Birchler T, et al. NONO couples the circadian clock to the cell cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013;110:1592–9. https://doi.org/10.1073/PNAS.1213317110/SUPPL_FILE/PNAS.201213317SI.PDF.
- [36] Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, et al. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 1998;17:5001–14. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/17.17.5001>.
- [37] Zhang Y, Xiong Y. Mutations in Human ARF Exon 2 Disrupt Its Nucleolar Localization and Impair Its Ability to Block Nuclear Export of MDM2 and p53. *Mol Cell* 1999;3:579–91. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80351-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80351-2).
- [38] Moreira A, Poulet A, Masliah-Planchon J, Lecerf C, Vacher S, Larbi Chérif L, et al. Prognostic value of tumor mutational burden in patients with oral cavity squamous cell carcinoma treated with upfront surgery. *ESMO Open* 2021;6. <https://doi.org/10.1016/J.ESMOOP.2021.100178>.
- [39] Chen B, Tan Y, Liang Y, Chen L, Wu S, Xu W, et al. Per2 participates in AKT-Mediated drug resistance in A549/DDP lung adenocarcinoma cells. *Oncol Lett* 2017;13:423–8. <https://doi.org/10.3892/OL.2016.5430/DOWNLOAD>.
- [40] Su S, Liao J, Liu J, Huang D, He C, Chen F, et al. Blocking the recruitment of naive CD4+ T cells reverses immunosuppression in breast cancer. *Cell Res* 2017. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.34>.
- [41] Cao R. mTOR Signaling, Translational Control, and the Circadian Clock. *Front Genet* 2018;0:367. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2018.00367>.
- [42] Liu P, Cheng H, Roberts TM, Zhao JJ. Targeting the phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2009;8:627–44. <https://doi.org/10.1038/nrd2926.Targeting>.

- [43] Takeda Y, Jothi R, Birault V, Jetten AM. RORc directly regulates the circadian expression of clock genes and downstream targets in vivo n.d. <https://doi.org/10.1093/nar/gks630>.
- Gururaj R, Samuel SR, Vijaya Kumar K, et al. Relação entre atividade física, parâmetros objetivos do sono e ritmo circadiano em pacientes com câncer de cabeça e pescoço recebendo quimiorradioterapia: Um estudo longitudinal. *Laryngoscope Investig Otolaryngol* . 2021; 6 (6): 1455-1460. Publicado 2021 em 29 de outubro. Doi: 10.1002 / lio2.664.
- MACHIELS, J. P.; RENÉ LEEMANS, C.; GOLUSINSKI, W.; GRAU, C.; LICITRA, L.; GREGOIRE, V. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, larynx, oropharynx and hypopharynx: EHNS–ESMO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, [S. l.], v. 31, n. 11, p. 1462–1475, 2020. ISSN: 09237534. DOI: 10.1016/j.annonc.2020.07.011.
- PRUEGSANUSAK, K. et al. Survival and Prognostic Factors of Different Sites of Head and Neck Cancer: An Analysis from Thailand. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, v. 13, n. 3, p. 885–890, 31 mar. 2012.
- Rahman S, Kraljević Pavelić S, Markova-Car E. Circadian (De) Regulation in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* . 2019; 20 (11): 2662. Publicado em 30 de maio de 2019. doi: 10.3390 / ijms20112662
- ZHANG, Ze; LIU, Ruoyan; JIN, Rui; FAN, Yanling; LI, Tingting; SHUAI, Yanjie; LI, Xingchen; WANG, Xudong; LUO, Jingtao. Integrating Clinical and Genetic Analysis of Perineural Invasion in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Frontiers in Oncology*, [S. l.], v. 9, n. MAY, p. 1–15, 2019. ISSN: 2234-943X. DOI: 10.3389/fonc.2019.00434. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2019.00434/full>.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (org.). Head and Neck Cancers: what causes cancers of the head and neck?. What causes cancers of the head and neck?. 2017. Revisado em 2021. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet#what-causes-cancers-of-the-head-and-neck>. Acesso em: 31 dez. 2021.
- CAUSAS e Prevenção: Estatísticas do câncer. [S. l.], 10 jun. 2021. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 10 jan. 2022.
- DEBORDE, Sylvie et al. Schwann cells induce cancer cell dispersion and invasion. *Journal of Clinical Investigation*, [S. l.], v. 126, n. 4, p. 1538–1554, 2016. ISSN: 15588238. DOI: 10.1172/JCI82658.