

Laís Machado de Jesus

**DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM
AMOSTRAS DE TECIDO E FLUIDOS CORPÓREOS DE PACIENTES COM
CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO.**

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

Área do conhecimento: Oncologia

Orientador: Dr^a Ana Carolina de Carvalho

Coorientador: Dr. André Lopes Carvalho

Barretos, SP

2020

J58d Jesus, Laís Machado de.

Detecção e caracterização de alterações moleculares em amostras de tecido e fluidos corpóreos de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. / Laís Machado de Jesus. - Barretos, SP - 2020.

186 f. : il.

Orientadora: Ana Carolina de Carvalho Peters.

Coorientador: André Lopes Carvalho.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2020.

1. Mutação. 2. Tumores de cabeça e pescoço. 3. Prognóstico. 4. Marcadores moleculares. 5. Metilação. 6. Biópsia líquida. I. Autor. II. Peters, Ana Carolina de Carvalho. III. Carvalho, André Lopes. IV. Título.

CDD 616.994

FICHA CATALOGRÁFICA

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

FOLHA DE APROVAÇÃO

Laís Machado de Jesus

Deteção e caracterização de alterações moleculares em amostras de tecido e fluidos corpóreos de pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

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

Data da aprovação: 04/03/2020

Banca Examinadora:

Dr. Andre Luiz Vettore de Oliveira
Universidade Federal de São Paulo, Departamento de Ciências Biológicas.

Dra. Letícia Ferro Leal
Fundação Pio XII - Hospital de Amor de Barretos.

Dra. Ana Carolina de Carvalho Peters
Orientadora

Dr. Ricardo Ribeiro Gama
Presidente da Banca

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) através de Auxílio à Pesquisa – Regular (processo número 1506/2017).

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

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

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

Dedico este trabalho a Deus, que me deu sabedoria para manter o foco e todo o equilíbrio necessário. Dedico também a minha família, meu alicerce nos dias difíceis, obrigada por compreenderem minha ausência em diversos momentos. Vô, meu Paizinho, dedico ao senhor essa vitória, quero celebrar contigo essa conquista e dizer que eu te amo muito (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Ana Carolina de Carvalho Peters, por ter me recebido no grupo de **Biologia dos Tumores de Cabeça e Pescoço** com tanto carinho. Você me proporcionou o crescimento acadêmico e, principalmente, o de vida. Foi quem me deu suporte nos experimentos, bem como nos momentos de nervosismo antes, durante e, algumas vezes, depois das minhas apresentações no decorrer de todo o curso. Com você aprendi que posso sonhar e que tenho capacidade de conseguir o que eu quiser, mas pra isso é preciso correr atrás e me dedicar muito. Obrigada, Dra. Carolzinha, fizemos uma ótima dupla juntas.

Ao Prof^o. Dr. André Lopes Carvalho, que mesmo a distância se fez presente em nossas reuniões. Obrigada por todas as sugestões e ensinamentos, tenho grande admiração pelo excelente profissional que você é!

A Banca de Acompanhamento, Dra. Edenir Inez Palmero e Dr. André Luiz Vettore, por toda a assistência durante nossas reuniões. Os questionamentos levantados e orientações contribuíram para que esse trabalho fosse realizado com excelência.

A Deus, meu melhor amigo e Papai! Você tem sido fiel a mim desde o princípio, como eu me orgulho de poder registrar aqui minha gratidão e todo o meu amor por Você. Obrigada por estar comigo quando achei que estava sozinha, quando acreditei que não ia conseguir e quando quis desistir e também por estar ao meu lado quando consegui fazer minha primeira PCR funcionar, quando eu fiz uma boa apresentação, por cada momento feliz que você me permitiu viver. Obrigada Aba!

Ao grupo de cabeça e pescoço, nossas reuniões foram essenciais para que eu tivesse uma visão ampla e translacional sobre os tumores de cabeça e pescoço. Agradeço em especial a minha colega de grupo, amiga e irmã científica **Raiany**, por estar comigo durante as disciplinas e congressos, compartilhando toda sua experiência e também me ajudando a ver a vida acadêmica com mais entusiasmo. Rai, muito obrigada por cada mensagem de apoio, carinho e de fé.

Ao Hospital de Câncer de Barretos (HCB) e ao programa de pós-graduação do Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP), por me proporcionarem um

ensino de altíssima qualidade, pelo apoio não apenas no período do mestrado, mas em toda a minha jornada no Hospital de Amor. **As agências de fomento Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), ao Ministério Público do Trabalho (MPT) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo apoio financeiro que tornou essa pesquisa de sonho a realidade. Agradeço também ao departamento de **Escritório de Projetos e Inovação Tecnológica (EPIT)**, em especial ao **Dorion e a Joyce**, obrigada pelo suporte dado durante esses dois anos de mestrado, vocês cuidaram com muito zelo de todos os nossos afazeres e parte financeira do projeto.

Agradeço ao Dr. Rui Manuel Reis, pelo auxílio no estudo e também pelo trabalho de altíssima qualidade frente ao CPOM. **Agradeço aos biólogos, secretária, a Cris e a Ana** que auxiliam na limpeza e organização do departamento e **demais funcionários**. A pesquisa não funciona, o laboratório não funciona, os experimentos não funcionam se não tiver o trabalho em equipe de todos vocês! **Sou grata ao Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular** e ao grupo incrível de colaboradores que temos no laboratório. **Aos meus amigos do CPOM**, agradeço por mais de 4 anos de amizade e muita ciência!

Também agradeço a outros departamentos que me auxiliaram durante o desenvolvimento dessa pesquisa: **Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Biobanco, Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística (NEB), Biblioteca (Milene e Martins), Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) e Departamento de Patologia (Gisele Caravina de Almeida), Rafael** pela ajuda com a plataforma REDCap.

Ao University Medical Center Utrecht (UMC), em especial ao **Dr. Stefan Martin Willems, a Joyce van Kuik, ao grupo de cabeça e pescoço e amigos de laboratório** (em especial aos meus amigos **Wissie, Betzabel, Willem, Floris, Anuska e Sangeeta**). Vocês me proporcionaram a melhor experiência da minha vida, sou grata por me receberem de portas abertas e me aceitarem como membro do grupo. Nossos *coffee breaks* vão ficar guardados na minha memória, as nossas refeições "*totally Dutch*" de cada dia ainda não são minhas favoritas (apenas a batata frita no almoço e o *Stropwafel* no café), mas eu sinto falta de cada um de vocês.

Agradeço a todos os meus amigos que me ajudaram com o processo

antes da viagem, em especial a vocês **Adeylson e Camila**, obrigada pela enorme ajuda! **Aos amigos que fiz na Holanda** e em especial a você, minha querida **Maeve**. Com você aprendi a abrir a minha mente e me tornar uma pessoa melhor, a ser mais compreensiva, aprendi a apreciar as diferenças e também tentei aprender holandês! Você me apresentou o seu país e me fez amar esse lugar, e que ironia dessa vida de cruzar os caminhos de uma brasileira com uma holandesa que fala português! Também agradeço a você **Mart**, meu amigo e companheiro. Ainda não conheci alguém tão gentil e querido como você, obrigada por cada conselho, pela ajuda com tudo (sim, se eu te ligasse no meio da madrugada você me ajudaria, sempre disposto e cuidadoso) e pelos dias de descontração conhecendo a cidade juntos. Também gostaria de deixar meus sinceros agradecimentos a **Simone e família**, minha família da Holanda, não tenho palavras para descrever o quanto vocês significam para mim. Vocês me deram um novo lar e nos 2 meses que ficamos juntos eu me senti segura e feliz em sua companhia. A vocês deixo meu eterno e sincero "*Dank u wel*".

Um carinho especial para o "**grupo de tumores pediátricos**", em especial para meus amigos e também família científica: **Aline, André, Daniel, Juliana, Maria Fernanda e Rafael**. Vocês foram o início de tudo, não há como concluir essa etapa sem dizer o meu sincero "obrigada". Vocês me mostraram que a pesquisa vai além de estar atrás de uma bancada ou de um computador, vocês me mostraram o significado de uma verdadeira amizade. Fico feliz em poder continuar com a nossa tradição mesmo com os integrantes do grupo tendo tomado uma nova direção (inclusive eu), que continuemos no propósito de estarmos sempre juntos.

Agradeço em especial aos meus companheiros do Hospital de Amor: **Gisele, Maísa, Paola, Priscila, Mariana, Maraísa, Aline Larissa, Adihara, Débora, Karina, Letícia B. Ângela, Bruna, Rodrigo, Wellington, Jun** e todos aqueles que deixaram a minha trajetória mais bonita e cheia de amor.

A minha família, que foi o meu combustível diário para fazer isso funcionar. Saber que estava orgulhando vocês me motivava em todo o tempo. Sim, eu quis fazer valer a pena e eu me emociono em poder receber esse título por vocês! **Mãezinha (vó)**, o seu carinho foi essencial, foi meu estímulo para conseguir ir mais longe. **Tios, tias e Melininha**, vocês me lembravam a todo o tempo que essa vitória seria nossa, obrigada por levarem alegria nos dias nublados. **Mãe, pai e Laurinha**,

obrigada por me apoiarem e me entenderem em todo o tempo, por me motivarem a terminar essa longa jornada sem desistir, amo vocês!

“Faça ou não faça. A tentativa não existe.”

Mestre Yoda, Star Wars

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	34
1.1	Epidemiologia dos tumores de cabeça e pescoço	34
1.2	Fatores de risco relacionados aos tumores de cabeça e pescoço	35
1.3	Diagnóstico e estadiamento dos tumores de cabeça e pescoço	35
1.4	Tratamento dos tumores de cabeça e pescoço	36
1.5	Prognóstico dos tumores de cabeça e pescoço	38
1.6	Etiologia tumoral e modelos de progressão dos tumores de cabeça e pescoço	40
1.7	Alterações genéticas	41
1.7.1	Alterações genéticas nos tumores de cabeça e pescoço	43
1.8	Alterações epigenéticas	46
1.8.1	Alterações epigenéticas nos tumores de cabeça de pescoço	48
1.9.	Biópsia Líquida	49
1.10	PCR Digital	51
2.	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	54
3	OBJETIVOS	55
3.1	Objetivo geral	55
3.2	Objetivos específicos	55
4	MATERIAL E MÉTODOS	56
4.1	Delineamento e local do estudo	56
4.2	População de estudo	56
4.3	Processamento das amostras incluídas no estudo	57
4.3.1	Extração de DNA das amostras de tecido tumoral	57
4.3.2	Extração de DNA das amostras de fluido corpóreo	59
4.4	Avaliação da presença de metilação em genes específicos em pacientes com CEC de orofaringe	60
4.5	Avaliação da presença de mutação em amostras de CEC de cavidade oral	64
4.6	Avaliação da presença de mutação em amostras de CEC de orofaringe	

	66	
4.7	Análises estatísticas	69
5	RESULTADOS	70
5.1	Seleção das amostras e delineamento do estudo	70
5.2	Avaliação da presença de metilação em genes específicos em pacientes com CEC	75
5.2.1	Otimização das análises de metilação por PCR digital	75
5.2.2	Análise de especificidade dos ensaios para a detecção de DNA metilado	76
5.2.3	Detecção da metilação do DNA em amostras de CEC de orofaringe	77
5.3	Avaliação da presença de mutação em amostras de CEC de cavidade oral	88
5.3.1	Caracterização da população	88
5.4	Avaliação da presença de mutação em amostras de CEC de orofaringe	99
5.4.1	Caracterização da população	99
6	DISCUSSÃO	117
7	CONCLUSÃO	130
8	REFERÊNCIAS	132
	ANEXOS	148
	Anexo A	149
	Anexo B	161
	Anexo C	163
	Anexo D	166
	Anexo E	170
	Anexo F	174
	Anexo G	186

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Sobrevida global em 5 anos de acordo com o estadiamento clínico dos pacientes com câncer de língua, laringe e faringe que não realizaram tratamento no Hospital de Câncer de Barretos (Unidades de Barretos e Jales) entre os anos 2000 e 2015. Fonte: Registro de Câncer - Hospital de Amor (Unidades: Barretos e Jales / São Paulo) 39

Figura 2 - Diferentes tipos de mutações no DNA e as alterações provocadas na sequência de proteínas codificadas. Os esquemas indicam as possíveis mutações pontuais e de frameshift que podem levar a formação de proteínas alteradas. Fonte: Google imagens 42

Figura 3 - Representação esquemática de alterações reversíveis na organização da cromatina que influenciam a expressão gênica. A hipermetilação do DNA induz a repressão da expressão de genes supressores tumorais, enquanto a hipometilação está associada à ativação da transcrição de oncogenes. Fonte: Adaptado de Esteller, 2007⁵⁹ 47

Figura 4 - Representação do processo de metilação do DNA. A metilação do DNA envolve a adição de um grupo metil à posição 5 de resíduos de citosina, mediada por enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). A metilação do DNA ocorre quase que exclusivamente em dinucleotídeos CpG. Fonte: Adaptado de Cominetti e Rogero, 2016⁶² 48

Figura 5 - Componentes derivados de células neoplásicas detectados na biópsia líquida. 1: Células tumorais circulantes (CTCs) invadindo a corrente sanguínea. 2: Exossomos sendo liberados pelas células tumorais e saudáveis. 3: DNA tumoral circulante (cfDNA) liberados na circulação sanguínea por meio de processos de apoptose e necrose celular. 4: Exossomos provenientes das CTCs. 5: cfDNA derivado das CTCs. A amostra de sangue poderá ser solicitada para a análise desses componentes com o objetivo de estratificar os pacientes, monitorá-los durante o tratamento, detectar possíveis alvos

terapêuticos e também detectar o aparecimento de segundos tumores primários ou metástases. Fonte: Adaptado de Alix- Panabières e Pantel. Alix, 2017⁷⁷ 51

Figura 6 - Representação das etapas da metodologia de ddPCR. Primeiramente é realizado o particionamento do mix da reação de PCR para formação das droplets. Em seguida, as droplets geradas são levadas ao termociclador para início da PCR. Ao final, será realizada a contagem das droplets positivas e negativas 61

Figura 7 - Processo de seleção das amostras para inclusão no estudo. 70

Figura 8 - Representação esquemática da seleção de amostras de CEC de cavidade oral (tecido congelado e lavado bucal) e fluxo de análises das alterações moleculares 71

Figura 9 - Representação esquemática da seleção de amostras de CEC de orofaringe (tecido fixado em formalina e embebido em parafina/FFPE e plasma) e fluxo de análises das alterações moleculares 73

Figura 10 - Amostras de FFPE de tumores utilizadas na etapa de otimização para a detecção de mutações no gene *TP53* por ddPCR 74

Figura 11 - Amostras de plasma de seguimento de tumores de cabeça e pescoço para análise de detecção de variantes no gene *TP53* 74

Figura 12 - Ensaio de especificidade para os genes *CCNA1* (B), *DAPK* (C), *TIMP3* (D) e *CDH8* (E), CM: controle metilado; CNM: controle não metilado, NTC: no template control 77

Figura 13 - Porcentagem de metilação na região promotora dos genes avaliados nas amostras de FFPE, PMR: porcentagem de referência metilada 80

Figura 14 - Curvas de sobrevida livre de recorrência entre amostras metiladas e não metiladas para os genes *CCNA1* (A), *CDH8* (B), *DAPK* (C) e *TIMP3* (D)
83

Figura 15 - Representação da porcentagem de referência metilada para os genes *CCNA1*, *CDH8*, *DAPK* e *TIMP3* nas amostras de plasma dos indivíduos sem câncer de cabeça e pescoço selecionados como controles do estudo 84

Figura 16 - Comparação entre os níveis de metilação aberrante do DNA em biópsias de tecido pré-tratamento pareadas com amostras de plasma de pacientes com câncer de orofaringe. Os triângulos vermelhos representam as amostras de plasma, enquanto os amarelos representam as amostras de tecido. PMR: porcentagem de referência metilada 85

Figura 17 - Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) mostrando a boa precisão da detecção de cfDNA metilado em discriminar amostras de plasma de casos e controles 86

Figura 18 - Metilação do gene *CCNA1* (PMR) no DNA tumoral circulante (cfDNA) obtido a partir do plasma mensurado antes do tratamento, após o último tratamento curativo e durante o acompanhamento (dias após o tratamento inicial). Cada cor representa um paciente, com linhas sólidas com aumento ou diminuição real no nível de metilação do cfDNA em amostras de plasma. A linha pontilhada representa o número de dias entre a última detecção do cfDNA metilado no plasma e a recorrência 87

Figura 19 - Diagrama representando os diferentes tipos de mutações e suas frequências observados no CEC de cavidade oral. Os genes (localizadas nas linhas) são classificados de acordo com a frequência de mutações em amostras mutadas (n=11; representadas no painel esquerdo) e em toda a população do estudo (n=12; painel direito). As amostras (localizadas nas colunas) são classificadas de acordo com o uso do tabaco. Acima há o número de mutações por amostra. As cores indicam o tipo de mutação e status de tabagismo 92

Figura 20 - Comparação da frequência das mutações encontradas em 15 genes em indivíduos com CEC de cavidade oral incluídos nesse estudo (n= 12) e na casuística estendida do TCGA (n=239) De acordo com o gráfico, as barras de cor azul claro indicam as frequências de mutações nos pacientes desse estudo e as barras de cor azul escuro indicam as frequência de mutações nos pacientes do TCGA

93

Figura 21 - Curvas de Kaplan Meier indicando a diferença na sobrevida livre de recorrência (SLR) em 5 anos, de acordo com as características clínicas e moleculares. SLR associada ao estadiamento TNM (A), estadiamento T (B), mutações em qualquer gene (C), *CDKN2A* (D), *NFE2L2* (E), *TP53* (F) e *NOTCH1* (G)

98

Figura 22 - Diagrama descrevendo os diferentes tipos de mutações e suas frequências observadas nas amostras de CEC de orofaringe avaliadas. Os genes (localizados nas linhas) são classificados de acordo com a frequência de mutações nas amostras mutadas (n=31; representadas no painel esquerdo) e em toda a população do estudo (n=51; painel direito). As amostras (localizadas nas colunas) são classificadas de acordo com o uso do tabaco e o status do HPV. As barras acima do gráfico representam o número de mutações por amostra. As cores indicam o tipo de mutação, status de tabagismo e status de infecção

pelo

HPV

102

Figura 23 - Número de variantes somáticas identificadas nas amostras testadas de acordo com o status do HPV (A) e o uso do tabaco (B)

102

Figura 24 - Curvas de Kaplan Meier indicando a diferença na sobrevida livre de recorrência (SLR) em 5 anos, de acordo com o status da mutação no gene *PTEN* e *NOTCH1*

e

NOTCH1

105

Figura 25 - *Forest plot* com os valores do Hazard Ratio e IC 95% para as alterações moleculares selecionadas (p-valor foi obtido através do teste de regressão de Cox)
105

Figura 26 - Comparação da frequência das mutações encontradas nos 15 genes do painel em indivíduos com CEC de orofaringe do TCGA (n= 39) e desse estudo (n= 51), independente do status de HPV. De acordo com o gráfico, a barra de cor cinza indica as frequências de mutações nos pacientes desse estudo e a barra de cor azul indica as frequência de mutações nos pacientes do TCGA
108

Figura 27 - Comparação da frequência das mutações encontradas nos 15 genes do painel apenas em indivíduos com CEC de orofaringe HPV-positivos incluídos na casuística extendida do TCGA (n = 31) e desse estudo (n = 18). As barras de cor azul claro correspondem a este estudo e as barras listradas de cor azul escuro equivalem a casuística extendida do TCGA
109

Figura 28 - Comparação da frequência das mutações encontradas nos 15 genes do painel apenas em indivíduos com CEC de orofaringe HPV-negativos incluídos na casuística extendida do TCGA (n = 8) e desse estudo (n = 33). As barras de cor azul claro correspondem a este estudo e as barras listradas de cor azul escuro equivalem a casuística extendida do TCGA
110

Figura 29 - Primeiro teste de gradiente de temperatura dos ensaios. As figuras representam as populações de droplets positivas para o alelo mutante em azul e selvagem (do inglês *wild type* – WT) em verde, e as populações negativas em cinze escuro. A linha rosa indica o ponto de corte (do inglês *threshold*) utilizado. Abaixo de cada figura estão todas as temperaturas analisadas neste teste
112

Figura 30 - Primeiro teste de especificidade dos ensaios. As figuras indicam a frequência alélica das variantes testadas por amostra, assim como os números de droplets detectadas em cada reação. As barras com colaração verde escura representam as droplets totais, verde clara são as droplets positivas para o

alelo selvagem (do inglês *wild type* – WT) e azul são as droplets com mutação *TP53* de variantes c.527G>T (A), c.527G>A (B) e c.919+1G>T (C). PC: controle positivo da reação). As amostras cujo nome é iniciado por PCR seguido pelo número 1, antes do ponto final, indica o número do ensaio o qual a amostra é positiva para a variante (ensaio 1), o mesmo para os números 2 e 3 (ensaio 2 e 3). Já o segundo número representa o número da amostra positiva para o ensaio correspondente (amostra 1, 2 3 e 4) 113

Figura 31 - Porcentagem de cfDNA no plasma com presença de mutação no gene *TP53* nos pacientes 1 (A), 2 (B) e 3 (C). Porcentagem de cfDNA mutante em amostras de plasma dos pacientes 1 (A), 2 (B) e 3 (C), coletadas em diferentes momentos durante o acompanhamento. O eixo y representa o valor percentual de cfDNA mutado no gene *TP53*. O eixo x representa o número de dias durante o acompanhamento. Cada círculo representa o momento de uma nova coleta e, conseqüentemente, uma nova amostra. O asterisco indica o início de um tratamento, a linha vermelha sólida é o fim do tratamento e a linha vermelha pontilhada significa o óbito. A caixa de texto ao lado de cada figura mostra as datas exatas das coletas, bem como a identificação de cada amostra 116

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Estimativa para 2018 da incidência de tumores de cabeça e pescoço no mundo e no Brasil e número de casos novos diagnosticados no Hospital de Câncer de Barretos em 2018 34
- Tabela 2** - Genes com alterações genéticas somáticas frequentes e altamente significativas nos tumores de cabeça e pescoço 46
- Tabela 3** - Sequências de *primers* e sondas e temperatura de anelamento padronizada para análise de metilação por ddPCR dos 6 genes de interesse 75
- Tabela 4** - Características clinicopatológicas dos pacientes com câncer de orofaringe (n=52) 79
- Tabela 5** - Status de metilação dos genes *CCNA1*, *CDH8*, *DAPK* e *TIMP3* avaliados nas amostras de DNA tumoral de 52 pacientes por ddPCR 80
- Tabela 6** - Associação entre dados clínicos e moleculares dos pacientes com carcinoma de orofaringe incluídos no estudo 82
- Tabela 7** - Características clínicas e patológicas dos pacientes com CEC de cavidade oral avaliados nesta etapa do estudo (n=12) 89
- Tabela 8** - Lista dos 52 genes que apresentaram mutação aberrante em pelo menos 2 amostras da população deste estudo 91
- Tabela 9** - Análise comparativa das frequências das mutações nos genes selecionados entre as casuísticas de CEC de cavidade oral desse estudo e do TCGA 93
- Tabela 10** - Resultados da associação entre o status do consumo de tabaco com o status de mutações genéticas somáticas (genes *CASP8*, *CDKN2A*, *FAT1* e *HLA-A*) nos pacientes com CEC de cavidade oral 95

Tabela 11 – Resultados da associação entre o status do consumo de tabaco com o status de mutações genéticas somáticas (genes *KMT2D*, *NFE2L2*, *NOTCH1*, *PIK3CA* e *TP53*) nos pacientes com CEC de cavidade oral 96

Tabela 12 – Resultado da validação do exoma e detecção de mutação em amostras de pacientes com CEC de cavidade oral (n=4) 99

Tabela 13 - Características clínicas e patológicas dos pacientes com CEC de orofaringe avaliados nesta etapa do estudo (n=51) 100

Tabela 14 - Resultados da associação entre o status do HPV e o uso do tabaco com o status de mutações genéticas somáticas nos pacientes com CEC de orofaringe 104

Tabela 15 - Relação entre a taxa de sobrevida livre de recorrência em 5 anos e as características clínicas e moleculares dos pacientes com CEC de orofaringe 106

Tabela 16 - Análise comparativa das frequências das mutações nos 15 genes do painel entre as casuísticas de CEC de orofaringe desse estudo e do TCGA (coorte extendida) 108

Tabela 17 – Descrição dos tipos de mutações no gene *PIK3CA* detectadas nas amostras HPV-positivas e HPV-negativas dos pacientes com CEC de orofaringe deste estudo (HCB) (HPV-positivas n = 1; HPV=negativas n = 3) e do estudo do TCGA (TCGA) (HPV-positivas n = 5; HPV=negativas n = 3) 110

Tabela 18 - Frequência alélica das variantes (VAF) no gene *TP53* detectadas por NGS e ddPCR 114

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ACTB</i>	Actin Beta
<i>ACVR1B</i>	Activin A Receptor Type 1B
AJCC	American Joint Committee on Cancer
<i>AJUBA</i>	Ajuba LIM Protein
<i>ALK</i>	ALK Receptor Tyrosine
anti-PD-1	anti-programmed cell death-1
<i>APC</i>	APC Regulator Of WNT Signaling Pathway
<i>ASXL1</i>	ASXL Transcriptional Regulator 1
AUC	Area Under the Curve
<i>BCL10</i>	BCL10 Immune Signaling Adaptor
BEPE	Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior
<i>CASP8</i>	Caspase 8
<i>CCNA1</i>	Cyclin A1
<i>CCND1</i>	Cyclin D1
<i>CDH8</i>	Cadherin 8
<i>CDK4</i>	Cyclin Dependent Kinase 4
<i>CDKN2A</i>	Cyclin-dependent kinase Inhibitor 2 ^a
CEC	Carcinoma de células escamosas
CECP	Carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço
cfDNA	Circulating cell-free DNA
CGI	Cancer Genome Interpreter
<i>CHD2</i>	Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 2

<i>CHD6</i>	Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 6
<i>CLOCK</i>	Clock Circadian Regulator
<i>CLTC</i>	Clathrin Heavy Chain
CM	Controle metilado
CNA	Copy number variation
CNM	Controle não metilado
CNVs	Copy number variations
CP	Cabeça e pescoço
<i>CSDE1</i>	Cold Shock Domain Containing E1
<i>CTCF</i>	CCCTC-Binding Factor
CTCs	Circulating tumor cells
ctDNA	Circulating tumor DNA
<i>CYLD</i>	CYLD Lysine 63 Deubiquitinase
<i>DAPK</i>	Death Associated Protein Kinase 1
<i>DAXX</i>	Death Domain Associated Protein
ddPCR	Droplet Digital PCR
DNA	deoxyribonucleic acid
DNMTs	DNA methyltransferases
dUTP	Deoxyuridine triphosphate
EBV	Epstein-Bar
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
<i>EP300</i>	E1A Binding Protein P300
EUA	Estados Unidos da América
ExAC	Exome Aggregation Consortium
<i>EZH2</i>	Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit

FAPESP

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
São Paulo

FAT1

FAT Atypical Cadherin 1

FAT2

FAT Atypical Cadherin 2

<i>FBXO11</i>	F-Box Protein 11
<i>FBXW7</i>	F-Box And WD Repeat Domain Containing 7
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin-Embedded
<i>FRG1</i>	FSHD Region Gene 1
GLOBOCAN	Global Cancer Observatory
H&E	Hematoxylin and eosin
<i>H3F3A</i>	H3.3 Histone A
HCB	Hospital de Câncer de Barretos
<i>HLA-A</i>	Major Histocompatibility Complex, Class I, A
<i>HNF1A</i>	HNF1 Homeobox A
HPV	Human papillomavirus
HR	Hazard Ratio
<i>HRAS</i>	HRas Proto-Oncogene, GTPase
<i>HSPA8</i>	Heat Shock Protein Family A (Hsp70) Member 8
IARC	International Agency for Research on Cancer
IC	Intervalo de confiança
IGV	Integrative Genomics Viewer
INCA	Instituto Nacional de Câncer
<i>INPP4B</i>	Inositol Polyphosphate-4-Phosphatase Type II B
<i>IRF6</i>	Interferon Regulatory Factor 6
<i>KCNJ5</i>	Potassium Inwardly Rectifying Channel Subfamily J Member 5
<i>KMT2C</i>	Lysine Methyltransferase 2C
<i>KMT2D</i>	Lysine Methyltransferase 2D
<i>LATS1</i>	Large Tumor Suppressor Kinase 1
<i>MACF1</i>	Microtubule Actin Crosslinking Factor 1
<i>MAGI2</i>	Membrane Associated Guanylate Kinase
<i>MAP3K13</i>	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 13

MBD	Methyl-CpG Binding Domain Protein 1
MCC	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 13
met-cfDNA	Circulating cell-free DNA (cfDNA) metilado
MGA	MAX Dimerization Protein MGA
MCC	MCC Regulator Of WNT Signaling Pathway
MT	Mutado
MYC	MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor
NCI	National Cancer Institute
NFE2L2	Nuclear Factor, Erythroid 2 Like 2
Ng	Nanograma
NGS	Next-generation Sequencing
NHGRI	National Human Genome Research Institute Home
nm	Nanometro
NOTCH1	Notch Receptor 1
NSD1	Nuclear Receptor Binding SET Domain Protein 1
NTC	No Template Control
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PD-1	Programmed cell death protein 1
PD-L1	Programmed Cell Death 1 Ligand 1
PI3Ks	Phosphoinositide 3-kinases
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate Catalytic Subunit Alpha
PMR	percentage of methylated reference
POLR2B	RNA Polymerase II Subunit B
pRb	Phosphorylated Retinoblastoma protein
POLR2B	RNA Polymerase II Subunit B

<i>PRKAA1</i>	Protein Kinase AMP-Activated Catalytic Subunit Alpha 1 2
<i>PTCH1</i>	<i>Patched 1</i>
<i>PTEN</i>	Phosphatase And Tensin Homolog
qMSP	Quantitative Methylation Specific PCR
qPCR	Quantitative polymerase chain reaction
<i>RASA1</i>	RAS P21 Protein Activator 1
<i>RB1</i>	RB Transcriptional Corepressor 1
REDCap	Research Electronic Data Capture
RHC	Registro Hospitalar de Câncer
RNA	Ribonucleic acid
ROC	Receiver operating characteristic curve
rpm	Revolutions per minute
RT	Reverse transcriptase
<i>SETD2</i>	SET Domain Containing 2
SLR	Sobrevida livre de recorrência
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
<i>STAT3</i>	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3
<i>SYK</i>	Spleen Associated Tyrosine Kinase
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<i>TIMP3</i>	TIMP Metallopeptidase Inhibitor 3
TMAP	Torrent Mapping Alignment Program
<i>TP53</i>	Tumor Protein P53
<i>TP63</i>	Tumor Protein P63
TVC	Torrent Variant Caller
UMC	University Medical Center from Utrecht
VAF	Variant allele frequency

WRN

WT

WRN RecQ Like
Helicase
Wild Type

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
>	Maior
μl	Microlitro
μg	Micrograma
ng	Nanograma
mM	Milimolar
mL	Mililitro
μm	Micrômetro
°C	Graus Celsius

RESUMO

de Jesus LM. Detecção e caracterização de alterações moleculares em amostras de tecido e fluidos corpóreos de pacientes com câncer de cabeça e pescoço. **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2020.

Justificativa: Os principais fatores de risco associados aos carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CECP) são o tabagismo e etilismo, além da infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) em tumores de orofaringe. Estes tumores são associados a altas taxas de incidência, morbidade e mortalidade. Além disso, sua heterogeneidade etiológica, molecular e clínica dificulta o manejo dos pacientes. Recidivas locorregionais e desenvolvimento de segundos tumores primários são frequentes, impactando nas taxas de sobrevida e na qualidade de vida. **Objetivo:** Portanto, realizamos a caracterização molecular de pacientes com CECP tratados no Hospital de Câncer de Barretos, visando identificar subgrupos de acordo com diferentes prognósticos e detectar alterações câncer-específicas em amostras coletadas de forma minimamente invasiva. **Metodologia:** Foram incluídas amostras de tecido tumoral de 12 pacientes com CEC de cavidade oral e de 90 pacientes com CEC de orofaringe tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Câncer de Barretos. Fluidos corpóreos (lavado bucal n = 9 e plasma n = 48) de um subgrupo destes pacientes também foram avaliados. A detecção de mutações nas amostras de tecido foi realizada através de sequenciamento de nova geração pelas plataformas Ion Torrent PGM (Life Technologies, EUA) e Illumina HiSeq 2500™ System (Illumina Technologies, EUA). A detecção de metilação nas amostras de tecido e também a busca pela presença das alterações mais frequentes em fluidos corpóreos foi realizada através do sistema QX200™ AutoDG Droplet Digital™ PCR system (Bio-Rad, EUA). **Resultados:** Entre os 51 pacientes com CEC de orofaringe, 61% (31/51) tiveram mutação em pelo menos um dos genes testados e mutações em *NOTCH1* e *PTEN* reduziram significativamente a sobrevida livre de recidiva dos pacientes (SLR) testados, sendo que apenas a mutação em *NOTCH1* permaneceu significativa na análise multivariada (HR = 2,982; 95% IC = 1,029-8,644; p = 0,044). Dos 12 pacientes com CEC de cavidade oral, todos apresentaram mutação em pelo menos um gene e

mutação nos genes *CDKN2A* e *NFE2L2* foram associadas a uma diminuição significativa da SLR (0,0% versus 57,1% para WT; $p = 0,017$ e 0,0% versus 51,9% para WT; $p = 0,038$, respectivamente). A detecção de metilação foi realizada em amostras de CEC de orofaringe ($n = 52$) e *CCNA1* metilado foi associado à pior SLR (45,8% versus 91,3%; $p = 0,041$). A presença de linfonodos clinicamente negativos ao diagnóstico (N0) foi significativamente associada a ausência de metilação no gene *TIMP3* (teste exato de Fisher; $p = 0,005$). Dos casos com amostras tumorais hipermetiladas (37/52), 15 tinham amostras de plasma pré-tratamento disponíveis e o cfDNA metilado foi detectado em 11/15 (73,3%). Por outro lado, nenhuma amostra de plasma dos controles saudáveis foi considerada positiva para a metilação do DNA (AUC = 0,867; IC 95% = 0,720 - 1.000). Estes dados sugerem uma boa acurácia na discriminação entre amostras de plasma de casos e controles,. Além disso, a detecção de metilação em amostras de plasma coletadas pós-tratamento foram concordantes com a evolução dos pacientes. Na etapa de detecção de mutações no plasma de 3 pacientes com CEC de orofaringe, detectamos variantes patogênicas do gene *TP53* no cfDNA de duas amostras e verificamos um resultado concordante entre o nível de cfDNA e o seguimento. **Conclusão:** Os achados desse estudo podem fornecer informações úteis para a determinação de novas abordagens que tornem o tratamento do CECP personalizado, considerando sua heterogeneidade. Também observamos a possibilidade da aplicação da ddPCR na rotina clínica, contribuindo para um melhor e mais amplo manejo dos pacientes acometidos por esses tumores.

PALAVRAS-CHAVE: Mutação; Tumores de cabeça e pescoço; Prognóstico; Marcadores moleculares; Metilação; Biópsia Líquida.

ABSTRACT

de Jesus LM. Detection and characterization of molecular alterations in tissue and body fluids samples of patients with head and neck tumors. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2020.

Justificative: The main risk factors associated with head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) are tobacco and alcohol consumption, in addition to the human papilloma virus (HPV) infection in oropharyngeal tumors. These tumors are correlated with high rates of incidence, morbidity and mortality. Moreover, the etiological, molecular and clinical heterogeneity complicates the management of patients. Locoregional recurrences and the development of second primary tumors are frequent, affecting the survival rates and quality of life. **Aim:** Therefore, we performed the molecular characterization of patients with HNSCC treated at the Barretos Cancer Hospital, aiming to identify subgroups according to different prognoses and detect cancer-specific alterations in samples collected in a minimally invasive way. **Methodology:** Tumor tissue samples from 12 patients with oral squamous cell carcinoma (OSCC) and 90 patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma (OpSCC) treated at the Department of Head and Neck Surgery at Barretos Cancer Hospital were included. Body fluids (saliva n = 4 and plasma n = 48) from a subgroup of these patients were also evaluated. The detection of mutations in tissue samples was performed through next sequencing generation by the Ion Torrent PGM (Life Technologies, USA) and Illumina HiSeq 2500™ System (Illumina Technologies, USA) platforms. The detection of methylation in tissue samples and also the search for the presence of the most frequent alterations in body fluids was performed using the QX200™ AutoDG Droplet Digital™ PCR system (Bio-Rad, USA). **Results:** Among the 51 patients with OpSCC, 61% (31/51) had mutations in at least one of the tested genes and mutations in *NOTCH1* and *PTEN* significantly reduced the patients' recurrence-free survival (RFS), with only *NOTCH1* mutation remaining significant in the multivariate analysis (HR = 2,982; 95% CI = 1,029-8,644; p = 0.044). Of the 12 patients with OSCC, all had mutations in at least one gene and

mutations in the *CDKN2A* and *NFE2L2* genes were associated with a significant decrease in RFS (0.0% versus 57.1% for WT; $p = 0.017$ and 0,0% versus 51.9% for WT; $p = 0.038$, respectively). Methylation detection was performed on OpSCC samples ($n = 52$) and methylated *CCNA1* was associated with the worst RFS (45.8% versus 91.3%; $p = 0.041$). The presence of clinically negative lymph nodes at diagnosis (N0) was significantly associated with the absence of methylation in the *TIMP3* gene (Fisher's exact test; $p = 0.005$). Of the cases with hypermethylated tumor samples (37/52), 15 had pre-treatment plasma samples available and the methylated cfDNA was detected in 11/15 (73.3%). On the other hand, no plasma samples from healthy controls were considered positive for DNA methylation (AUC = 0.867; 95% CI = 0.720 - 1,000). These data suggest a good accuracy in the discrimination between plasma samples from cases and controls. In addition, the detection of methylation in plasma samples collected after treatment was consistent with the evolution of the patients. In the plasma mutation detection stage of 3 patients with OpSCC, we detected pathogenic variants of the *TP53* gene in the cfDNA of two samples and verified a concordant result between the cfDNA level and the follow-up.

Conclusion: The findings of this study can provide useful information for the determination of new approaches that make the treatment of HNSCC personalized, considering its heterogeneity. We also observed the possibility of applying ddPCR in the clinical routine, contributing to a better and broader management of patients affected by these tumors.

KEYWORDS: Mutation; Head and neck tumors; Prognosis; Molecular markers; Methylation; Liquid biopsy.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia dos tumores de cabeça e pescoço

Os carcinomas de cabeça e pescoço ocupam a 8ª posição entre os tumores mais incidentes no mundo, e são normalmente associados a altas taxas de morbidade e mortalidade^{1, 2}. Estes tumores podem se manifestar na cavidade oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe ou laringe, e 90% são do tipo histopatológico de carcinoma escamocelular (CEC), com surgimento no epitélio escamoso que recobre o trato aerodigestivo superior¹.

Segundo dados do GLOBOCAN, foram estimados para 2018 834.860 novos casos de câncer de cabeça e pescoço e 431.131 óbitos nos diferentes sítios relacionados a esta topografia³. No Brasil, a estimativa para o triênio de 2020-2022 de novos casos de tumores de cabeça e pescoço é de 22.840, com os tumores de cavidade oral ocupando a 5ª posição entre os tumores mais comuns em homens e a 13ª posição entre as mulheres⁴. O Registro Hospitalar de Câncer do Hospital de Câncer de Barretos (HCB) realizou o levantamento do número de casos de tumores diagnosticados nessa instituição no ano de 2018, com 407 novos casos de carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço (CECP) tendo sido registrados neste ano (Tabela 1)⁵.

Tabela 1 - Estimativa para 2018 da incidência de tumores de cabeça e pescoço no mundo e no Brasil e número de casos novos diagnosticados no Hospital de Câncer de Barretos em 2018.

Topografia	Mundial (2018)	Brasil (2020)	Hospital de Câncer de Barretos (2018)
Cavidade oral	354.864	15.190	167
Laringe	177.422	7.650	78
Nasofaringe	129.079	*	26
Orofaringe	92.887	*	136
Hipofaringe	80.608	*	18
TOTAL	834.860	22.840	407

Fonte: Globocan 2018, INCA 2020, Registro Hospitalar de Câncer de Barretos 2018. * O sítio da nasofaringe não foi incluído, já o sítio da orofaringe está agrupado na cavidade oral e da hipofaringe está agrupado na laringe.

1.2 Fatores de risco relacionados aos tumores de cabeça e pescoço

O tabagismo associado ou não ao etilismo é classicamente reconhecido como o principal fator de risco para os tumores de cabeça e pescoço^{6, 7}. Mais recentemente, a infecção por variantes de alto risco do vírus do papiloma humano (HPV, do inglês *human papillomavirus*) tem se mostrado um importante fator de risco para tumores de orofaringe; enquanto o herpes vírus Epstein-Bar (EBV) é reconhecido como um fator de risco para tumores da nasofaringe⁸⁻¹⁰.

Nos países desenvolvidos, 75% dos tumores de cabeça e pescoço são causados pelo uso do tabaco e do álcool, considerados os principais fatores de risco associados a esta doença, que quando associados podem potencializar os efeitos oncogênicos na mucosa⁷. A forte redução do consumo do tabaco nos últimos anos tem refletido em uma menor incidência dos tumores de laringe, cavidade oral e hipofaringe^{11, 12}. Contudo, um aumento significativo da incidência dos tumores na região da orofaringe vem sendo observado, com um aumento nos EUA de 225% entre 1984 e 2004^{11, 13}. Este aumento tem sido associado à infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV), com o contato sexual como principal forma de transmissão, e desenvolvimento de tumores na orofaringe. Em países desenvolvidos, a infecção por HPV está presente em 17% a 56% desses tumores, e em 13% dos casos em países em desenvolvimento⁷.

Estudos apontam para importantes diferenças clínicas, biológicas e epidemiológicas entre pacientes com CECP HPV - positivos e HPV-negativos. Epidemiologicamente, os casos HPV-negativos são geralmente representados por indivíduos com mais de 60 anos de idade que fazem uso excessivo de tabaco e álcool. Não há um sítio preferencial de acometimento desses tumores e, geralmente, eles apresentam um prognóstico desfavorável¹². Já os casos positivos para HPV compreendem principalmente indivíduos em faixa etária mais jovem, do sexo masculino, de etnia branca, com um maior nível socioeconômico e de escolaridade, não-tabagistas (ou com baixa carga tabágica) e não-etilistas^{12, 14-16}. Além disso, estes casos frequentemente descrevem comportamento sexual de risco via sexo oral, fator de risco importante para a exposição ao vírus do HPV¹².

1.3 Diagnóstico e estadiamento dos tumores de cabeça e pescoço

Usualmente, o diagnóstico dos tumores de cabeça e pescoço é realizado por

meio de avaliação do histórico do paciente, avaliação clínica médica ou odontológica, além de exames de imagem (nasofaringolaringoscopia direta, tomografia computadorizada, ressonância magnética e tomografia por emissão de pósitrons), para avaliar e identificar a localização de possíveis lesões tumorais locais e a distância. Em seguida, biópsias seguidas de análises anatomopatológicas são realizadas para confirmação do diagnóstico e caracterização histopatológica da lesão¹⁷.

Assim que identificado o sítio do tumor, a lesão é classificada conforme o tamanho do tumor (T), presença ou ausência de linfonodos comprometidos (N) e presença ou ausência de doença metastática (M), de acordo com as recomendações da AJCC (*American Joint Committee on Cancer*), para assim ser determinado o estadiamento tumoral TNM¹⁸. Diante da informação da localização do tumor e estadiamento clínico, é feito o planejamento terapêutico. Além do estadiamento, informações adicionais podem ser úteis na estratificação do prognóstico dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço, como o status de tabagismo e etilismo e o status de HPV¹⁹.

1.4 Tratamento dos tumores de cabeça e pescoço

O tratamento padrão para os tumores de cabeça e pescoço inclui a associação de cirurgia, quimioterapia e/ou radioterapia. A escolha da melhor linha de tratamento se dá de acordo com a localização do tumor primário e o estadiamento tumoral TNM^{19, 20}.

Para os tumores em cavidade oral, a doença em estágio inicial (I e II) pode geralmente ser tratada com cirurgia ou radioterapia isoladas, com cerca de 90% de cura para os pacientes em estágio I e 70% de cura para os pacientes em estágio II. Já para os CEC de cavidade oral em estágio avançado (III e IV), o tratamento cirúrgico é seguido pela quimioterapia e/ou radioterapia (tratamento multimodal)^{17, 20, 21}.

Para os tumores de orofaringe, são preconizadas abordagens de preservação de órgãos, que incluem a utilização de radioterapia e a quimioterapia como primeira escolha de tratamento. A introdução da cirurgia na terapêutica geralmente ocorre apenas em casos de tumores iniciais, bem como se ainda houver persistência de

doença após o término do tratamento curativo^{22, 23}.

O tratamento do câncer de laringe segue as mesmas recomendações indicadas nos casos de tumor de orofaringe, tendo a preservação da funcionalidade do órgão como importante parâmetro de escolha. Neste caso, os pacientes são frequentemente tratados com radioterapia, quimioterapia e/ou excisão cirúrgica primária preservadora de laringe (associada ou não a radioterapia e quimioterapia)^{24, 25}.

O campo da medicina personalizada tem avaliado a possibilidade de um melhor direcionamento da terapia de acordo com as características não apenas clínicas como também moleculares do tumor do paciente de maneira individualizada. Isso tem ocorrido com a intenção de, principalmente, proporcionar um tratamento menos agressivo e com melhores resultados de resposta terapêutica²⁰. Neste contexto, a utilização de terapias alvo-específicas e imunoterapia têm sido exploradas com o objetivo de mudar o cenário desafiador do tratamento dos tumores de cabeça e pescoço, propondo um tratamento menos agressivo, mas ainda com possibilidade de aumentar a chance de sobrevivência dos pacientes²⁶.

O anticorpo monoclonal quimérico cetuximabe, age ligando-se ao domínio extracelular do fator de crescimento epidérmico (EGFR do inglês *Epidermal Growth Factor Receptor*), bloqueando a transdução de sinais indutores de proliferação celular. A proteína EGFR encontra-se superexpressa em mais de 90% dos tumores de cabeça e pescoço. Ela codifica um receptor transmembrana que se liga ao fator de crescimento epidermal (EGF) e outras proteínas regulatórias, que por sua vez controlam mecanismos importantes para a manutenção celular. Quando essa proteína se encontra desregulada devido a alterações moleculares (como a superexpressão por fatores parócrinos ou autócrinos, amplificação, mutação ou translocação nuclear), o que é muito frequente nos tumores sólidos, há o descontrole dessas vias, resultando em um aumento da proliferação das células, da sobrevivência, da malignização celular, da migração e de metástases. À vista disso, a aplicação de estratégias terapêuticas para bloquear o sistema de transdução de sinal de EFGR nesses casos tem trazido a possibilidade de diminuir o desenvolvimento tumoral²⁷. A utilização desta droga alvo em pacientes com CECP metastático tem sido associada a uma melhora significativa na sobrevida global, com o aumento das taxas de 7,4 meses para 10,1 meses, ao se utilizar esse tratamento

associado a quimioterapia a base de platina-fluorouracil²⁶.

A tentativa de diminuir a toxicidade do tratamento padrão nos tumores HPV - positivos, que sabidamente apresentam melhor prognóstico quando comparado a evolução dos tumores HPV-negativos, está sendo analisada por estudos que buscam substituir o tratamento padrão (quimioterapia a base de cisplatina associada a radioterapia) pelo tratamento com drogas imunoterápicas^{28, 29}.

1.5 Prognóstico dos tumores de cabeça e pescoço

A taxa de sobrevida global para pacientes com CECP é de cerca de 50%, no entanto, este valor é bastante variável, de acordo com o estadiamento das lesões no início do tratamento. Cerca de 1/3 dos pacientes com CECP apresentam tumores iniciais ao diagnóstico (estágio I e II) e tem taxa de cura de cerca de 90% para os casos com estágio I e cerca de 70% para os casos com estágio II²¹. Infelizmente, cerca de dois terços dos pacientes apresentam doença avançada (estágio III e IV) ao diagnóstico e requerem uma abordagem multidisciplinar que, apesar de ainda potencialmente curativa, frequentemente tem efeitos colaterais em longo prazo, impactando na qualidade de vida dos pacientes²⁰.

O estudo de Abrahão e colaboradores realizou uma análise dos preditores de sobrevivência em pacientes da América do Sul com CECP, sendo que 80.3% (1.174/1.463) dos casos avaliados eram do Brasil. A maioria dos pacientes (55,5%) foi diagnosticada com doença em estágio IV e as taxas de sobrevida variaram de 37,8% a 56,0%. Após a análise multivariada, os pacientes com estadiamento IV tiveram 7,6 (câncer de laringe/câncer de hipofaringe), 11,7 (câncer de cavidade oral) e 3,5 (câncer de orofaringe) vezes mais mortalidade em relação aos pacientes com doença em estágio I³⁰.

A imagem abaixo (Figura 1) evidencia o impacto significativo da detecção tardia na sobrevida global em 5 anos dos pacientes diagnosticados com câncer de língua, laringe e faringe no Hospital de Câncer de Barretos (Unidades de Barretos e Jales) no período entre 2000 e 2015. Dados do RHC mostram uma importante redução da sobrevida global em 5 anos de acordo com o estadiamento. Como pode ser observado na figura, a taxa de sobrevida para os tumores diagnosticados em estadiamento inicial (I/II) fica entre 51,4% e 71,7%, enquanto que em tumores

diagnosticados em estadiamento avançado (III/IV), a taxa de sobrevida encontra-se entre 14,4% e 41,9%⁵.

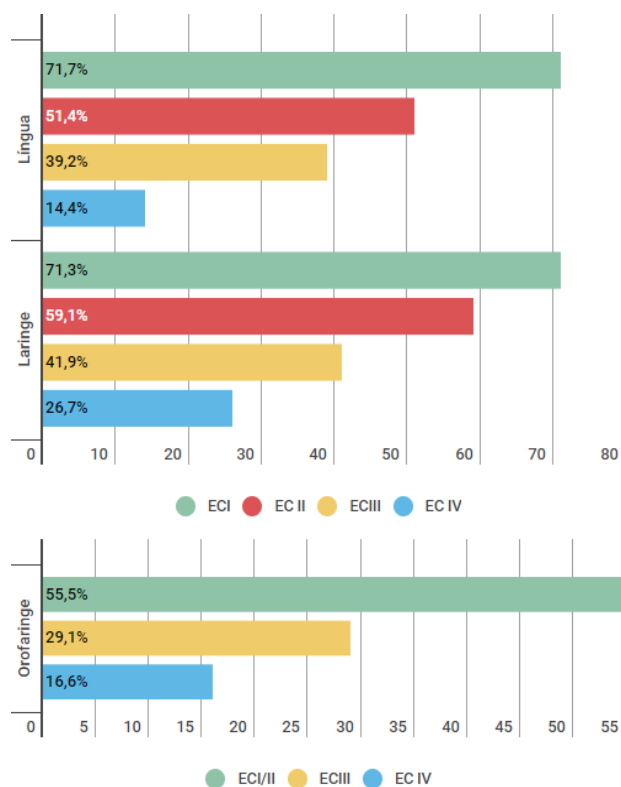


Figura 1 - Sobrevida global em 5 anos de acordo com o estadiamento clínico dos pacientes com câncer de língua, laringe e faringe que não realizaram tratamento no Hospital de Câncer de Barretos (Unidades de Barretos e Jales) entre os anos 2000 e 2015. **Fonte:** Registro de Câncer - Hospital de Amor (Unidades: Barretos e Jales / São Paulo).

Apesar da maioria dos pacientes HPV - positivos serem diagnosticados com tumores em estadiamento avançado, com T inicial e categoria N avançada, com metástases linfonodais e císticas em vários níveis, tem sido descrito que eles apresentam melhor resposta ao tratamento e uma boa evolução e, conseqüentemente, um melhor prognóstico e sobrevida^{8, 11, 31-33}. Entretanto, alguns casos podem manifestar uma evolução desfavorável^{34, 35}.

O risco de morte para os tumores de orofaringe foi classificado em três grupos em importante estudo desenvolvido por Ang e colaboradores, levando-se em consideração a presença ou ausência de infecção pelo HPV, status de tabagismo, tamanho da lesão e presença ou ausência de linfonodos comprometidos. Os resultados mostram que tumores positivos para o HPV de pacientes com baixa

exposição ao tabaco e tumores HPV - positivos em pacientes fumantes com estadiamento N0 a N2a são considerados tumores com baixo risco de morte (sobrevida global em 5 anos = 93,0%), tumores HPV- positivos de indivíduos fumantes com estadiamento N2b a N3 e tumores HPV- negativos de pacientes com baixa exposição ao tabaco e estadiamento T<4 apresentam risco intermediário de morte (sobrevida global em 5 anos = 70,8%). Além disso, tumores HPV-negativos de pacientes que apresentam baixa exposição ao tabaco e estadiamento T4 ou tumores HPV-negativos de indivíduos tabagistas são tumores com alto risco de morte (sobrevida global em 5 anos = 46,2%)³⁴.

Fakhry e colaboradores observaram em seu estudo que houve diferença proeminente na taxa de resposta ao tratamento entre os tumores negativos e positivos para a infecção pelo HPV, onde os CECP HPV - positivos tiveram uma resposta mais eficaz ao tratamento com quimiorradioterapia em comparação aos CECP HPV-negativos (84% e 57% respectivamente). As taxas de sobrevivência também se mostraram maiores para os tumores com positividade para o vírus em relação aos tumores negativos para o HPV, onde a sobrevivência livre de progressão em dois anos foi de 86% e 53% e a sobrevivência global em 2 anos foi de 95% e 62 % respectivamente¹⁹.

1.6 Etiologia tumoral e modelos de progressão dos tumores de cabeça e pescoço

Os modelos de progressão baseados em alterações genômicas mais recentes para os tumores de cabeça e pescoço são resultado de novas descobertas sobre genes e vias frequentemente alteradas em CECP que direcionam a transformação maligna da mucosa. A etiologia do tumor, seja tabagismo ou infecção por HPV, é extremamente relevante para a compreensão das diferentes alterações genéticas e epigenéticas observadas nestes tumores³⁶.

O tabaco e o álcool apresentam muitas substâncias químicas potencialmente carcinogênicas (como o acetaldeído, N-nitrosaminas e uretano), que podem aumentar a permeabilidade a outros carcinógenos ou lesionar diretamente as células da mucosa. A ação sinérgica aumenta as chances do desenvolvimento de CECP, visto que o etanol pode agir como um solvente para as substâncias presentes no tabaco³⁷.

Já o processo de malignização celular relacionada à infecção pelo HPV é mediado pelas oncoproteínas virais E6 e E7. A associação da oncoproteína E6 com a proteína ubiquitina-ligase E3 induz a degradação da proteína supressora tumoral p53, causando a desregulação dos pontos de parada do ciclo celular G1/S e G2/M, além de outros eventos que levam à instabilidade genômica como o não recrutamento do sistema de reparo e a inibição da indução de morte celular. Já a oncoproteína E7 promove a degradação por ubiquitinação da proteína retinoblastoma (pRb), que também contribui para o desequilíbrio da fase G1/S, bem como a liberação do fator de transcrição E2F com consequente transcrição dos genes da fase S e indução da proliferação. A proteína pRb regula negativamente a expressão de p16, proteína inibidora de quinase dependente de ciclina. Assim, a inativação de pRb leva ao aumento de p16, frequentemente observado em tumores HPV - positivos³⁸⁻⁴¹.

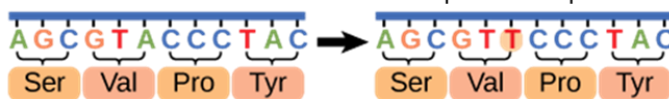
1.7 Alterações genéticas

Dentre as alterações genéticas, as mutações, são eventos que causam a modificação da sequência de nucleotídeos do DNA e levam ou não a formação de uma proteína alterada (Figura 2). Os principais erros que podem acontecer são inserções, deleções ou substituições de nucleotídeos, podendo atingir apenas um único nucleotídeo como também toda a extensão do cromossomo⁴².

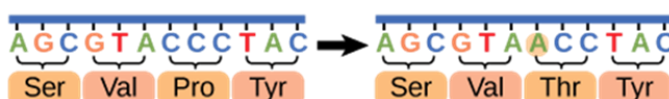
As mutações pontuais podem ser classificadas em: mutações silenciosas, causadas pela substituição de um nucleotídeo que não acarretará mudança na sequência de aminoácidos durante a síntese proteica; mutações “*missense*”, cuja substituição do nucleotídeo levará a formação de uma proteína alterada; e mutações “*nonsense*” em que a substituição do nucleotídeo formará um códon de parada. As mutações conhecidas como “*frameshift*” alteram o quadro de leitura através de inserções e deleções de nucleotídeos que levam à alteração de todo o quadro de leitura para transcrição em aminoácidos e formação de uma proteína incorreta⁴².

Mutações pontuais

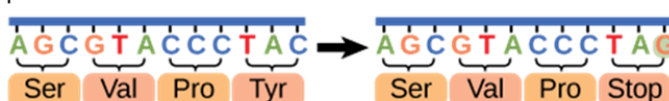
Silenciosa: Não tem efeito sobre a sequência de proteínas



Missense: Resulta na substituição de um aminoácido



Nonsense: Substitui um aminoácido por um códon de parada



Mutações frameshift

Inserção ou deleção de nucleotídeos pode resultar na mudança no quadro de leitura ou inserção de um códon de parada

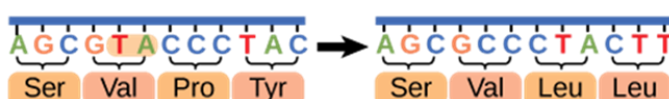


Figura 2 - Diferentes tipos de mutações no DNA e as alterações provocadas na sequência de proteínas codificadas. Os esquemas indicam as possíveis mutações pontuais e de frameshift que podem levar a formação de proteínas alteradas. **Fonte:** Google imagens.

O acúmulo de mutações em genes de uma célula pode levar ao desequilíbrio celular e uma proliferação descontrolada de células anormais, resultando no desenvolvimento do câncer. Os mecanismos de malignização celular e crescimento tumoral são estimulados por mutações que foram selecionadas durante a tumorigênese e que conferem uma vantagem proliferativa e de sobrevivência às células neoplásicas. O processo ocorre basicamente quando uma única célula adquire mutações que garantem a ela uma capacidade de se manter viva e de se multiplicar ativamente de maneira mais eficaz do que as células vizinhas. Essas mutações recebem o nome de “*drivers*” (mutações condutoras) e estarão presentes em todas as células do câncer. Há também a ocorrência de outras mutações que podem ser neutras e não contribuir diretamente para a expansão clonal e formação do câncer, conhecidas como mutações “*passengers*” (mutações passageiras).

Portanto, por não possuírem vantagem no crescimento clonal essas mutações não são selecionadas⁴³⁻⁴⁷.

Todo esse espectro de mutações gênicas vai se acumulando durante a vida do indivíduo e a quantidade dessas alterações no DNA pode variar de acordo com o tipo celular, com o tipo de neoplasia, com a exposição de agentes mutagênicos presentes no ambiente e também com a presença de doenças hereditárias raras. Essas mutações podem ativar (mutações de ganho de função) genes específicos responsáveis pela estimulação da progressão da divisão celular (proto-oncogenes) ou desativar (mutações de perda de função) genes que conferem um controle negativo do ciclo celular, ou seja, uma mensagem de parada da divisão⁴⁴. Muitos estudos têm procurado entender melhor o mecanismo de carcinogênese e a contribuição da detecção de mutações específicas no diagnóstico precoce do câncer e no seguimento dos pacientes.

1.7.1 Alterações genéticas nos tumores de cabeça e pescoço

O câncer de cabeça e pescoço ocorre como resultado de numerosas alterações moleculares que podem estimular a transformação neoplásica de uma célula normal. Em geral, CECP HPV - positivos estão associados a um perfil molecular caracterizado pela presença de *TP53* selvagem, baixos níveis de pRb e aumento da expressão de p16. Já os tumores HPV-negativos frequentemente apresentam mutações no gene *TP53*, níveis aumentados de pRb e p16 hipoexpressa devido a mutações pontuais, metilação e deleção homozigótica deste gene^{32, 48-50}.

Considerando que os CECP são altamente heterogêneos em relação à sua etiologia, evolução clínica e prognóstico, existe um interesse crescente em investigar se tal heterogeneidade pode ser atribuída a diferenças moleculares. A busca por alterações somáticas que influenciam a iniciação, manutenção e progressão de tumores pode permitir a identificação de características específicas que auxiliem na definição de subgrupos de pacientes com evoluções clínicas distintas e na identificação de novos alvos terapêuticos.

Recentemente, um melhor entendimento da progressão molecular dos CECP tem sido possível através da publicação de estudo que caracterizaram o espectro de mutações de CECP através do sequenciamento completo do exoma de mais de 300

amostras (de 32 a 279 por estudo) destes tumores⁵¹⁻⁵⁴. Estes estudos mostraram que os CECP são caracterizados por um alto grau de heterogeneidade inter-tumoral, confirmando sua complexidade biológica, e foram capazes de identificar genes supressores tumorais e oncogenes frequentemente mutados, cuja desregulação afeta vias de sinalização críticas para a integridade genômica e a diferenciação do epitélio, podendo representar eventos genéticos dominantes na carcinogênese dos CECP⁵⁵.

Diversos trabalhos tem validado o papel dominante de alguns genes pertencentes a vias envolvidas no processo de patogênese destes tumores, incluindo *CDKN2A*, *PTEN*, *RB1* e *TP53* (supressores tumorais); *PIK3CA* e *HRAS* (transdução de sinal); *NOTCH1*, *TP63* e *IRF6* (desenvolvimento e manutenção do epitélio estratificado); *FBXW7* (ubiquitinização); *NSD1*, *EZH2* e *KTMD2* (metilação de histonas); *CASP8* (apoptose, necrose, inflamação) e *FAT1* (polarização e migração celular)^{51-54, 56}. A busca pela identificação de alterações somáticas nesses genes que já se mostraram relevantes ao processo de carcinogênese dos tumores de cabeça e pescoço é embasada na intenção de se melhor caracterizar o perfil genético dos CECP em diferentes populações,

Em 2015, o consórcio *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), coordenado pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI) e o Instituto Nacional de Pesquisas do Genoma Humano (NHGRI, do inglês *National Human Genome Research Institute Home*) e que tem como objetivo uma melhor caracterização genômica na área oncológica, contendo informações de 33 tipos de câncer, publicou dados moleculares de 279 casos de tumores de cabeça e pescoço. Em CECP, os resultados confirmam a relevância de muitos dos genes encontrados nos estudos anteriores para o processo de carcinogênese dos tumores de CP⁵⁷.

Tanto o estudo publicado por Agrawal e colaboradores quanto o publicado pelo TCGA realizaram a comparação do perfil de mutações entre tumores HPV - positivos e negativos e verificaram que a frequência de mutações nos casos positivos para HPV é inferior quando comparada aos HPV- negativos^{51, 55}. Contudo, o estudo de Lui e colaboradores encontrou mutações no gene *PIK3CA* em 20% dos pacientes com CECP HPV - positivos, enquanto o artigo do TCGA encontrou este gene mutado em 56% dos casos HPV - positivos e em apenas 34% dos casos HPV-negativos^{54, 57}. Estes dados sugerem que o processo de malignização celular de

uma parcela dos tumores HPV – positivos seja induzido pela atividade das oncoproteínas virais, levando a mutações do gene *PIK3CA* e a perda de função de p53 e pRb⁵⁴.

Recentemente, Leemans e colaboradores (2018) classificaram os tumores de cabeça e pescoço em três subtipos baseados nas alterações genéticas mais recentes descritas para os tumores de cabeça e pescoço, resultado de novas descobertas sobre genes e vias frequentemente alteradas em CECp que direcionam a transformação maligna da mucosa. A tabela 2 lista os genes e as alterações genéticas somáticas mais frequentes nos tumores de cabeça e pescoço, que serão descritas a seguir⁵⁸.

(i) *Tumores HPV - positivos*: Tumores associados à infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV) que se encontra transcricionalmente ativo com expressão das oncoproteínas virais E6 e E7. Esse subtipo é subdividido em mais duas classes, sendo a primeira a classe dos tumores HPV-KRT, caracterizados por eventos oncogênicos de diferenciação de queratinócitos e processos de redução oxidativa, e a segunda a classe dos tumores HPV-IMU, que podem desencadear a resposta imune ao HPV, assim como a diferenciação de células mesenquimais. As mutações ativadoras do oncogene *PIK3CA*, são eventos muito frequentes nos tumores HPV-KRT. Esse gene codifica a subunidade catalítica p110 da família de enzimas PI3Ks de classe 1, e sua ativação gera uma desregulação da via de sinalização celular AKT, que controla os processos de proliferação e sobrevivência das células;

(ii) *Tumores HPV-negativos com alterações no número de cópias (do inglês CNA – high, copy number variation high)*: Tumores associados ao tabaco com alto número de alterações no número de cópias de regiões cromossômicas e um acúmulo de mutações genéticas. A perda de função dos genes supressores tumorais *TP53* e *CDKN2A* acomete a maioria dos casos. O gene *TP53* expressa uma proteína com função de supressor tumoral que atua na regulação celular e reparo do DNA. A perda de sua função gera um acúmulo de alterações genéticas subsequentes que irão conferir vantagens de sobrevivência às células neoplásicas. A perda de função do gene supressor tumoral *CDKN2A*, que codifica a proteína p16, leva a desregulação do ciclo celular e aumento da proliferação celular. Em fases do processo de carcinogênese, ocorrem alterações em outros genes como *NOTCH1* e *FAT1*, relacionados à diferenciação de células epiteliais, e a partir das quais novas

alterações são adquiridas dando origem aos subgrupos basal, mesenquimal e clássico;

(iii) *Tumores HPV – negativos com baixo número de cópias (do inglês CNA – silent, copy number variation silent)*: Tumores que não apresentam positividade para o HPV, mas são estáveis genomicamente e tem como alterações moleculares mais características mutações de perda de função de *CASP8* e ganho de função de *HRAS*. Sua etiologia ainda é incerta, entretanto, o envelhecimento é tido como um fator de risco.

Tabela 2 -Genes com alterações genéticas somáticas frequentes e altamente significativas nos tumores de cabeça e pescoço.

Processo celular	Gene	Tipo de gene	Frequência de mutação (%)	Frequência de CNA (%)
Ciclo celular	<i>CDKN2A</i>	Supressor tumoral	22	32
	<i>TP53</i>	Supressor tumoral	72	1,4
	<i>CCND1</i>	Oncogene	0,6	25
Crescimento Celular	<i>EGFR</i>	Oncogene	4	11
Sobrevivência celular	<i>PIK3CA</i>	Oncogene	18	21
	<i>PTEN</i>	Supressor tumoral	3	4
Sinalização de WNT	<i>FAT1</i>	Supressor tumoral	23	8
	<i>AJUBA</i>	Supressor tumoral	7	1
	<i>NOTCH1</i>	Supressor tumoral	18	4
Regulação epigenética	<i>KMT2D</i>	Supressor tumoral	16	0,4
	<i>NSD1</i>	Supressor tumoral	12	0,8
Apoptose, necrose, inflamação	<i>CASP8</i>	Supressor tumoral	5-9	*
Transdução de sinal	<i>HRAS</i>	Oncogene	4-8	*

Fonte: Adaptado de Leemans et al⁵⁸ e TCGA⁵⁷. CNA - Alteração no número de cópias, do inglês *copy number variation*. . * Sem informação sobre a frequência de CNA.

1.8 Alterações epigenéticas

A metilação do DNA é um dos eventos responsáveis pelo controle da

expressão gênica em células normais. No entanto, a desregulação desse mecanismo está associada à iniciação e progressão de vários tipos tumorais. Esta desregulação pode ocorrer de duas maneiras principais: (i) silenciamento da transcrição de genes supressores tumorais através da hipermetilação de ilhas CpGs dos seus promotores gênicos, e (ii) ativação da transcrição de oncogenes pela hipometilação dos seus promotores (Figura 3).

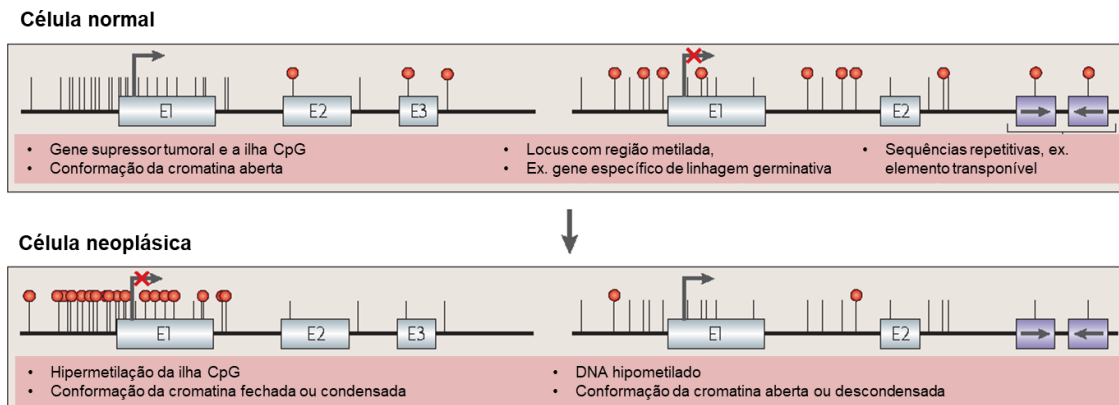


Figura 3 - Representação esquemática de alterações reversíveis na organização da cromatina que influenciam a expressão gênica. A hipermetilação do DNA induz a repressão da expressão de genes supressores tumorais, enquanto a hipometilação está associada à ativação da transcrição de oncogenes. **Fonte:** Adaptado de Esteller, 2007⁵⁹.

Essa alteração epigenética consiste em modificações químicas reversíveis no material genético que alteram a estrutura da cromatina, e, dessa forma, provocam a inibição da transcrição gênica (Figura 4). Esse evento ocorre através da adição, catalisada pelas enzimas DNA metil-transferases (DNMTs), de um radical metil (CH_3) em bases nitrogenadas citosinas (C) localizadas a 5' de guaninas (G). Este processo ocorre principalmente em ilhas CpG, regiões ricas em dinucleotídeos CpG, frequentemente localizadas nas regiões promotoras dos genes⁵⁹⁻⁶¹.

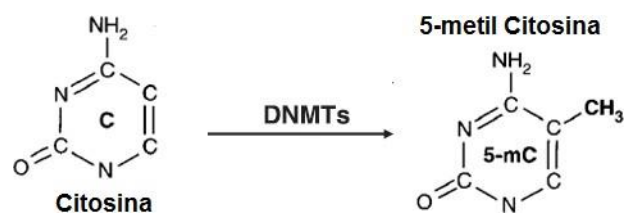


Figura 4 - Representação do processo de metilação do DNA. A metilação do DNA envolve a adição de um grupo metil à posição 5 de resíduos de citosina, mediada por enzimas DNA metiltransferases (DNMTs). A metilação do DNA ocorre quase que exclusivamente em dinucleotídeos CpG. **Fonte:** Adaptado de Cominetti e Rogero, 2016⁶².

A metilação do DNA pode regular a expressão de genes através do recrutamento de proteínas envolvidas na repressão gênica (*methyl-CpG-binding domain proteins* – MBD, proteínas repressoras transcricionais). A ligação dessas proteínas repressoras impede o reconhecimento da região metilada do gene pelos fatores de transcrição e pela RNA polimerase, impedindo a transcrição e produção da molécula de RNA mensageiro e, conseqüentemente, a expressão do gene^{63, 64}. Além disso, a presença de hipermetilação das citosinas, juntamente com a deacetilação das histonas mediada pelas enzimas histonas deacetilases (HDAC), tornam a cromatina condensada (que recebe o nome de heterocromatina), impedindo o acesso de proteínas regulatórias e de fatores de transcrição e, conseqüentemente, inibindo a transcrição do gene⁶⁵⁻⁶⁷.

Em tumores, a hipermetilação bloqueia a transcrição de genes supressores tumorais, além de genes associados à metástase, ao reparo do DNA, ao controle da angiogênese e ao ciclo celular⁶⁸. Schuebel e colaboradores realizaram uma análise do metiloma para detectar genes afetados por metilação na região promotora com conseqüente silenciamento transcricional. O estudo observou que aproximadamente 5% dos genes conhecidos por serem metilados em câncer colorretal (CCR) tinham a região promotora hipermetilada em linhagens celulares de CCR⁶⁰.

1.8.1 Alterações epigenéticas nos tumores de cabeça de pescoço

A metilação aberrante de genes supressores tumorais é a alteração molecular mais comumente encontrada em tumores de cabeça e pescoço.

A análise do status de metilação dos genes *CCNA1*, *TIMP3* e *DAPK*, relevantes ao processo de carcinogênese, tem sido avaliada em CECP por diversos

grupos. Os resultados mostram que esses genes estão frequentemente metilados em tumores de cabeça e pescoço e que essa metilação está envolvida com o processo de carcinogênese nestes tumores e, inclusive, está associada com o prognóstico destes pacientes^{69, 70}.

Outro estudo confirmou a importância da detecção da metilação como ferramenta útil na área oncológica, onde a hipermetilação dos genes *CCNA1*, *DAPK* e *TIMP3* em amostras de lavado bucal (n = 61 pacientes) foi associada à presença de recorrência local e a pior sobrevida global em pacientes com CECP⁶⁹.

Recentemente, um trabalho publicado pelo Grupo de Biologia dos Tumores de Cabeça e Pescoço do Hospital de Câncer de Barretos avaliou a metilação dos genes *CCNA1*, *CDH8*, *DAPK*, *PCDH10* e *TIMP3* em amostras de CEC de orofaringe. Os resultados analisados identificaram que o gene *CCNA1* estava metilado em 16% dos casos, *CDH8* em 10%, *DAPK* em 32%, *TIMP3* em 24% e *PCDH10* em 36%. A hipermetilação do gene *DAPK* mostrou-se associada com o status de HPV das amostras (p = 0,023)⁷¹.

O estudo de Rettori e colaboradores analisou o perfil de metilação de 24 genes em amostras de lavado bucal coletadas ao diagnóstico, após a realização do último tratamento e após seis meses de seguimento de pacientes com CECP. Destes, cinco genes estavam frequentemente metilados nas amostras coletadas pré-tratamento com resultados altamente específicos e sensíveis para detecção da presença de hipermetilação. Dentre esses genes, a hipermetilação do *TIMP3* nas amostras coletadas seis meses após o tratamento pôde ser considerada um fator prognóstico independente para a sobrevida livre de recorrência local, destacando o importante papel desse gene como uma ferramenta potencial não invasiva importante para o monitoramento e detecção de possíveis recidivas nos tumores de cabeça e pescoço⁷⁰.

1.9. Biópsia Líquida

A biópsia líquida é definida, em oncologia, como a utilização de fluidos corpóreos (sangue, urina, saliva, dentre outros) contendo material genético proveniente da região tumoral e tem sido útil na busca por biomarcadores para uma gama de malignidades⁷².

O DNA tumoral da biópsia líquida é normalmente proveniente de processos apoptóticos e necróticos (Figura 5). Esses eventos provocam a liberação de fragmentos celulares derivados das células tumorais circulantes (CTCs, do inglês *circulating tumor cells*), que se acumulam e são dispensados na circulação ou em outros fluidos corpóreos, juntamente com o material genético, que passa a ser denominado DNA tumoral circulante (ctDNA, do inglês *circulating tumor DNA*), podendo apresentar alterações somáticas indicativas do tumor^{73, 74}.

Outros meios de se obter o material genético do tumor é através da obtenção de vesículas extracelulares, definidas como pequenas vesículas de membrana plasmática com dimensão variando de 40 e 1000nm^{72, 74, 75}.

A biópsia líquida tem como principal vantagem em relação à biópsia de tecido, a possibilidade de avaliação de marcadores moleculares através de técnicas de alta acurácia em amostras coletadas de forma pouco invasiva. A biópsia tecidual, habitualmente utilizada na rotina clínica dos pacientes com diagnóstico de CECP, por mais que seja efetiva, apresenta certa limitação quanto à representatividade tumoral já que estes tumores são heterogêneos¹⁵. Além disso, sabe-se que as alterações moleculares muitas vezes precedem as alterações detectáveis por métodos histopatológicos. Sendo assim, testes moleculares em biópsia líquida poderiam tornar possível a detecção de alterações câncer-específicas antes que os pacientes tenham sintomas, aumentando as chances de detecção de novos tumores ainda em fase inicial e reduzindo a necessidade de biópsias teciduais^{15, 76}.

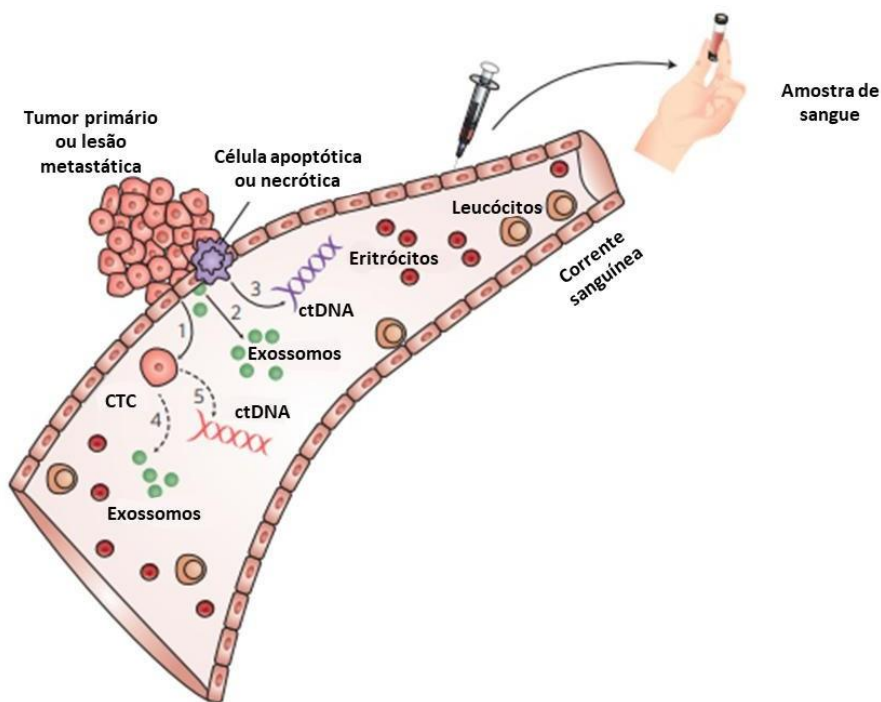


Figura 5 - Componentes derivados de células neoplásicas detectados na biópsia líquida. 1: Células tumorais circulantes (CTCs) invadindo a corrente sanguínea. 2: Exossomos sendo liberados pelas células tumorais e saudáveis. 3: DNA tumoral circulante (cfDNA) liberados na circulação sanguínea por meio de processos de apoptose e necrose celular. 4: Exossomos provenientes das CTCs. 5: cfDNA derivado das CTCs. A amostra de sangue poderá ser solicitada para a análise desses componentes com o objetivo de estratificar os pacientes, monitorá-los durante o tratamento, detectar possíveis alvos terapêuticos e também detectar o aparecimento de segundos tumores primários ou metástases. **Fonte:** Adaptado de Alix- Panabières e Pantel. Alix, 2017⁷⁷.

Muitos trabalhos têm explorado a identificação de alterações específicas de células tumorais nestes fluidos, que podem ser utilizadas no diagnóstico precoce em programas de rastreamento de populações de risco e no monitoramento da doença de pacientes com câncer, seja para avaliar a resposta ao tratamento ou para identificar, de forma precoce, recidivas e novos tumores primários^{15, 76}.

1.10 PCR Digital

Inicialmente, a utilização da biópsia líquida era tida como inviável na busca por alterações moleculares por meio de técnicas tradicionais de sequenciamento, devido à quantidade escassa de material, que geralmente equivale a <1,0% do DNA presente na amostra⁷⁶. Técnicas altamente sensíveis, como PCR digital (dPCR) e sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *next-generation sequencing*), tem sido empregadas para a análise quantitativa de amostras contendo DNA e RNA que

se desprenderam das células, exossomos e células tumorais circulantes (CTCs, do inglês *circulating tumor cells*), destacando a alta precisão destas técnicas na detecção de prováveis mutações ou variantes somáticas⁷⁵.

A PCR Digital é uma metodologia quantitativa que permite a detecção e quantificação absoluta do DNA de interesse em uma determinada amostra. Sua alta sensibilidade é adequada ao contexto de detecção de baixas concentrações de DNA, detecção de variantes raras, análise de variações no número de cópias do genoma (CNVs, do inglês *copy number variations*) dentre outras aplicações. A tecnologia de PCR por emulsão de gotas, mais conhecida como *Droplet Digital PCR* (ddPCR) se fundamenta no particionamento da reação de PCR em milhares de gotas contendo um óleo específico (droplets) e na amplificação do material de interesse de forma individualizada. Ao final, a quantificação desse material é realizada através de uma distribuição de probabilidade chamada Distribuição de Poisson, que irá calcular o número médio de moléculas alvo presentes nas droplets da reação⁷⁸.

Apesar do número limitado de estudos sobre a utilidade do DNA tumoral circulante na prática clínica de tumores de cabeça e pescoço, van Ginkel e colaboradores demonstraram a viabilidade do uso de biópsia líquida na detecção e monitoramento de câncer de cabeça e pescoço, enfatizando também a técnica de *Droplet Digital PCR* (ddPCR) como altamente sensível para a detecção de alterações específicas da doença. Mutações no gene *TP53* estão fortemente associadas aos CECP, o que coloca esse gene como um potencial biomarcador para a presença da doença em pacientes diagnosticados com esse tipo de tumor. Seu estudo teve como objetivo identificar a capacidade de detecção de mutação no gene *TP53* e quantificar o DNA tumoral circulante (ctDNA, do inglês *circulating tumor DNA*) em amostras de plasma de seis pacientes diagnosticados com tumor de cavidade oral usando a metodologia ddPCR. Foi possível detectar uma quantidade entre 0,04 a 7,60 cópias mutadas de *TP53* por microlitro usado na reação, com concentrações plasmáticas de DNA tumoral com mutação para esse gene variando de 2,2 a 422 cópias por mililitro de plasma, demonstrando a capacidade de detectar mutações importantes em baixas frequências na biópsia líquida através da ddPCR⁷⁹.

80.

Além da sua utilidade na detecção de material genético tumoral em amostras

de biópsia líquida, a técnica de PCR digital, também parece útil para a análise de material escasso e degradado. Um estudo recentemente publicado por Lissa e colaboradores mostrou a viabilidade e sensibilidade da metodologia de PCR digital na detecção da presença de metilação em amostras de biópsia fixadas em formalina e incluídas em parafina (FFPE, do inglês *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*), sabidamente conhecida por apresentar uma quantidade escassa e fragmentação do material genético⁸¹.

2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O carcinoma de cabeça e pescoço é frequentemente detectado tardiamente e com lesões em estágio avançado, levando à necessidade de tratamentos cirúrgicos extensos que causam comprometimento funcional e estético e terapias com efeitos tóxicos e agressivos (quimio- radioterapia). Além disso, é muito comum o desenvolvimento de recidivas e de novos tumores primários durante o seguimento graças à falhas no monitoramento dos pacientes no pós-tratamento que prejudicam o diagnóstico precoce. O conjunto desses fatores tem impacto no sucesso do tratamento, diminuindo as chances de cura e contribuindo para as baixas taxas de sobrevida observadas nesse tipo tumoral.

A heterogeneidade dos CECP quanto à sua biologia, evolução clínica e prognóstico está frequentemente associada às falhas no tratamento e na detecção precoce de novos eventos tumorais. Desta forma, este estudo pretende identificar prováveis biomarcadores moleculares em uma população de pacientes com CECP tratados no Hospital de Câncer de Barretos, visando uma melhor caracterização de subgrupos com diferente prognóstico e a detecção de alterações câncer-específicas em amostras coletadas de forma não-invasiva. Através dos resultados obtidos, espera-se que o uso dos métodos baseados em biópsia líquida se mostrem viáveis para aplicação na prática clínica no contexto de delineamento do prognóstico, diagnóstico precoce e monitoramento de pacientes com CEC de cabeça e pescoço.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho tem como objetivo caracterizar alterações genéticas e epigenéticas em amostras de tumor e fluidos corpóreos de pacientes com CECP, tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Câncer de Barretos.

3.2 Objetivos específicos

a) Caracterizar o perfil de metilação dos genes *CCNA1*, *CDH8*, *DAPK* e *TIMP3* selecionados por serem descritos como frequentemente metilados em amostras de tumores de pacientes diagnosticados com CEC de orofaringe.

b) Caracterizar o perfil de mutação do exoma completo (CEC de cavidade oral) e de um painel de genes frequentemente mutados em CECP (CEC de orofaringe) em amostras de tumores de pacientes diagnosticados com cabeça e pescoço.

c) Avaliar a viabilidade de detecção de alterações moleculares encontradas nas amostras de tumor em amostras de plasma e lavado bucal coletadas destes mesmos pacientes antes do tratamento.

d) Verificar se existe associação entre o perfil de mutações e de metilação encontrado nas amostras tumorais e de fluidos corpóreos e as características clínicas e anatomopatológicas destes pacientes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento e local do estudo

O desenvolvimento deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos segundo descrito no parecer consubstanciado sob o número 1506/2017 (Anexo A). O estudo foi desenvolvido no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital de Câncer de Barretos no Brasil e na *University Medical Center de Utrecht (UMC)* na Holanda.

4.2 População de estudo

Dada a grande heterogeneidade clínica e biológica dos tumores de cabeça e pescoço, o foco deste trabalho foi apenas em tumores de cavidade oral e orofaringe.

Para a etapa de caracterização de alterações moleculares em amostras de tecido tumoral de pacientes com CEC de orofaringe (n=90) e cavidade oral (n=12), foram utilizadas amostras de pacientes tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Câncer de Barretos entre 2009 e 2018. Os critérios de inclusão destes pacientes foram:

- i. Pacientes com mais de 18 anos com diagnóstico confirmado de carcinoma escamocelular em cavidade oral ou orofaringe;
- ii. Pacientes que aceitaram a coleta e armazenamento de amostras no Biobanco institucional através de assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) específico do Biobanco;
- iii. Pacientes não tratados anteriormente à coleta da amostra biológica;
- iv. Pacientes candidatos a tratamento com finalidade curativa;
- v. Pacientes que tiveram como primeira modalidade terapêutica o procedimento cirúrgico (tumores de cavidade oral) ou pacientes submetidos a biópsia pré-tratamento seguida de quimio e radioterapia concomitante (tumores de orofaringe);
- vi. Pacientes com CEC de cavidade oral com amostras de tecido tumoral e buffy coat disponíveis no Biobanco desta instituição.
- vii. Pacientes com CEC de orofaringe com amostras de biópsia tumoral pré-tratamento disponíveis no Departamento de Patologia desta instituição.

Para a etapa de validação dos alvos moleculares identificados, também foram

utilizadas amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) de diversos tipos tumorais provenientes de de pacientes tratados no Departamento de Oncologia da UMC.

Para a análise de viabilidade de detecção dos alvos identificados na etapa de caracterização molecular em amostras de biópsia líquida, foram utilizadas amostras de fluidos corpóreos (plasma n=48; lavado bucal n=4) destes pacientes (segundo recomendado por Wang e colaboradores¹⁵):

- i. Amostras de lavado bucal pré-tratamento dos pacientes com CEC de cavidade oral (n=4);
- ii. Amostras de plasma pré-tratamento dos pacientes com CEC de orofaringe (n=23);
- iii. Amostras de plasma pós-tratamento para um subgrupo das amostras do HCB (n=7) e da UMC (n=18).

Dados clínicos dos pacientes incluídos, assim como levantamento de dados demográficos e de hábitos de vida foram obtidos por pesquisa em prontuários e preenchimento de uma ficha para coleta de dados clínicos e demográficos (Anexo B e Anexo C).

Amostras de plasma provenientes de 10 indivíduos saudáveis (controles), pareados conforme o sexo, idade, status de tabagismo e etilismo com um subgrupo de casos de pacientes com CEC de orofaringe com plasma disponível também foram utilizadas neste estudo durante a fase de validação dos marcadores de metilação em biópsia líquida por PCR digital. Esta etapa permitiu a análise da especificidade e acurácia do método de detecção de metilação em cfDNA (DNA livre circulante, do inglês *circulating free DNA*) através da comparação entre indivíduos doentes e saudáveis.

4.3 Processamento das amostras incluídas no estudo

4.3.1 Extração de DNA das amostras de tecido tumoral

Para a caracterização das amostras de CEC de cavidade oral, foram avaliadas amostras de tecido tumoral congelado a fresco obtido a partir de ressecções cirúrgicas. Já para a caracterização das amostras de CEC de orofaringe, o material disponível era proveniente de biópsias pré-tratamento

incluídas em parafina. O processamento e obtenção do DNA a partir destas amostras será descrito a seguir. Para todas as amostras, o DNA total foi quantificado pelo equipamento *NanoDrop ND1000* (Nanodrop Technologies, EUA) e por ensaio fluorimétrico no equipamento *Qubit 2.0* (Invitrogen, EUA), com armazenamento a -20 °C até o momento de utilização.

a) Tecido tumoral congelado de pacientes com CEC de cavidade oral

As amostras de CEC de cavidade oral foram coletadas no momento do tratamento cirúrgico e armazenadas a -80°C no Biobanco Institucional até o início da etapa da recuperação do DNA.

Antes da extração do DNA, foram feitos cortes dos fragmentos contendo o tecido tumoral congelado e preparadas lâminas coradas com H&E. O primeiro corte foi revisado por um patologista para confirmação do diagnóstico e determinação da porcentagem tumoral. Amostras com porcentagem tumoral $\geq 60\%$ de tumor e até 30% de necrose foram submetidas à extração do DNA na plataforma automatizada *Qiasymphony* (Qiagen, Alemanha), utilizando o *QIASymphony DNA Mini Kit* (Qiagen, Alemanha), de acordo com o protocolo utilizado no Biobanco Insitucional.

Dos pacientes com CEC de cavidade oral, também foram utilizadas amostras de *buffy coat* obtidas a partir do processamento de aproximadamente 4 mL de sangue coletado em tubos EDTA. As amostras de sangue foram centrifugadas por 10 minutos a 3500 x rpm a 4°C e, após separação das frações, o *buffy coat* foi coletado e armazenado a -80°C. O DNA foi então extraído com a metodologia automatizada *Qiasymphony* (Qiagen, Alemanha), utilizando o *QIASymphony DNA Midi Kit* (Qiagen, Alemanha).

b) Tecido tumoral em FFPE de pacientes com CEC de orofaringe

As amostras de pacientes com CEC de orofaringe foram coletadas no momento da biópsia diagnóstica e incluídas em parafina para posterior avaliação e confirmação do diagnóstico pelo Departamento de Patologia.

Foram realizados cortes de 5 µm das amostras de FFPE para a extração do DNA e preparação e coloração de lâminas para coloração com hematoxilina e

eosina (H&E). Em seguida, foi realizada a revisão das seções coradas com H&E correspondentes aos blocos de parafina contendo as amostras de tecido tumoral para confirmação do diagnóstico e a caracterização dos componentes celulares presentes.

Cortes da região do tecido identificada como possuindo pelo menos 60% de células tumorais foram processados usando o *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit* (Qiagen, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de FFPE provenientes da *University Medical Center Utrecht* (UMC) foram processadas com a utilização do método automatizado *Maxwell RSC* (Promega, EUA), utilizando o *Maxwell FFPE Plus DNA Kit* (Promega, EUA), de acordo com as instruções utilizadas na rotina do Laboratório de Diagnóstico Molecular da instituição.

4.3.2 Extração de DNA das amostras de fluido corpóreo

Para a análise de viabilidade de detecção dos alvos identificados na etapa de caracterização molecular em amostras de biópsia líquida, foram utilizadas amostras de fluidos corpóreos. A seguir descrevemos o processamento e obtenção de cfDNA das amostras de lavado bucal e plasma utilizadas na etapa de validação destes marcadores.

Para todas as amostras, o DNA total foi quantificado por ensaio fluorimétrico no equipamento *Qubit 2.0* (Invitrogen, EUA), com armazenamento a -20 °C até o momento de utilização.

a) Lavado bucal de pacientes com CEC de cavidade oral

Foi coletado lavado bucal de todos os pacientes com CEC de cavidade oral incluídos no estudo. Aproximadamente 10 mL de lavado bucal foi coletado em solução salina estéril e, após uma centrifugação de 10 minutos a 1500 x rpm a 4°C, o sobrenadante foi descartado. O pellet de células foi ressuscitado em 200 µL de tampão fosfato-salino 1x (PBS) estéril, centrifugado novamente por 1 minuto a 13000 x rpm a 4°C e teve o seu sobrenadante descartado mais uma vez. O pellet remanescente foi ressuscitado em 50 µL de PBS estéril a 1% e armazenado a -80°C.

Para extração do DNA, os pellets de células foram descongelados e o DNA foi

imediatamente isolado usando o *QIAamp DNA Mini kit* (Qiagen, Alemanha), seguindo o protocolo recomendado para sangue ou fluidos corpóreos.

b) Plasma de pacientes com CEC de orofaringe

Foram coletadas amostras de sangue em tubos EDTA de um subgrupo de pacientes. A partir de um volume de aproximadamente 4 mL de sangue total coletado de cada paciente, foram obtidas as seguintes frações: aproximadamente 2 mL de plasma e 500 µL de *buffy coat*. Para a obtenção das frações, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 3500 x rpm e 4°C, a camada superior contendo o plasma foi recuperada e armazenada a -80°C.

O DNA circulante foi isolado a partir do plasma utilizando o método de extração de DNA padronizado com *QIAamp Circulating Nucleic Acid kit* (Qiagen, Alemanha). As amostras provenientes da UMC foram processadas utilizando o *Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit* (Promega, EUA), segundo protocolo do Laboratório de Diagnóstico Molecular da instituição. Além disso, foi realizado um método para checagem e controle de qualidade das amostras de cfDNA extraído com o *Agilent 2100 Bioanalyzer System* (Agilent, EUA).

4.4 Avaliação da presença de metilação em genes específicos em pacientes com CEC de orofaringe

a) Amostras de tecido de pacientes com CEC de orofaringe

Previamente às análises de metilação, foi realizado o tratamento de 200- 500 ng de DNA das amostras de tecido com bissulfito de sódio, utilizando o *EpiTect Bisulfite Kit* (Qiagen, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram eluídas em 20 µL de água livre de nuclease e armazenadas a -80° C até análise pela ddPCR.

A conversão com bissulfito de sódio permite a conversão de todas as citosinas não metiladas do DNA em uracilas, enquanto as citosinas metiladas se mantêm como citosinas, permitindo identificar o status de metilação por PCR. Dessa forma, as amostras tornam-se aptas para o teste de detecção de metilação. Os genes *CCNA1*, *CDH8*, *DAPK* e *TIMP3* foram selecionados para a análise de

metilação neste trabalho com base em estudos anteriores, que os identificaram como frequentemente metilados em tumores de cabeça e pescoço e destacaram sua relevância no processo de carcinogênese. Esses genes tem sido relatados como alvos para o silenciamento epigenético em diferentes tumores humanos, incluindo o CECp⁶⁹⁻⁷¹.

Na técnica de PCR digital (Figura 6), o DNA é inicialmente misturado ao master mix de reação e aos *primers* e sondas. Em seguida, ocorre o particionamento de cada amostra em cerca de 20.000 droplets em um cartucho. As droplets geradas são transferidas para uma placa de 96 poços e seguem para um termociclador para a reação de PCR que ocorrerá dentro de cada uma destas partições. Ao final, as 20.000 reações serão avaliadas individualmente para detecção da fluorescência e determinação dos alelos e suas respectivas frequências em cada amostra. Todos os experimentos incluem um controle negativo de reação sem DNA, além de controles negativos, sem a presença do alvo, e positivos, com a presença do alvo.



Figura 6 - Representação das etapas da metodologia de ddPCR. Primeiramente é realizado o particionamento do mix da reação de PCR para formação das droplets. Em seguida, as droplets geradas são levadas ao termociclador para início da PCR. Ao final, será realizada a contagem das droplets positivas e negativas.

Para a análise de metilação por ddPCR, seguimos as recomendações

sugeridas pela empresa Bio-Rad (Bio-Rad, EUA), com adaptações para a análise de metilação segundo outros trabalhos^{71, 81, 82}. Brevemente, a detecção de metilação por PCR digital se baseia na utilização de um par de *primers* e sonda marcados que reconhecem sequências metiladas, e um par de *primers* e sonda para o gene referência *ACTB*, usado como controle interno da reação para controlar a quantidade de DNA total adicionado (input). Os *primers* e sonda para o gene *ACTB* foram desenhados em regiões livres de nucleotídeos CGs, o que garante a amplificação desta região independentemente do status de metilação do DNA. No entanto, estes *primers* foram desenhados em regiões com citosinas, para que somente o DNA convertido corretamente por bissulfato de sódio seja amplificado, ou seja, cujas citosinas foram convertidas em uracilas.

A utilização da PCR digital para a detecção de metilação é realizada através de reações em monoplex (1 reação para o gene *ACTB* e outra reação para o gene alvo) com volume final de 22 µl, contendo: 900 nM de *primers*, 250 nM de sondas, 2X *ddPCR™ SuperMix for probes No dUTP* (Bio-Rad, EUA) e 10 ng de DNA de tecido convertidos por bissulfato de sódio. Em seguida, o mix com as amostras é adicionado manualmente ao cartucho *Automated Droplet Generator Cartridges* (Bio-Rad, EUA), juntamente com 70 µL do óleo *Automated Droplet Generation Oil for Probes* (Bio-Rad, EUA), e levados ao equipamento *Automated Droplet Generator* (Bio-Rad, EUA), para a geração das droplets. As droplets geradas são transferidas para uma placa de PCR de 96 poços e levadas ao termociclador *C1000 Touch™ Thermal Cycle with 96- Deep Well Reaction Module* (Bio-Rad, EUA) com as seguintes condições de ciclagem: (i) Ativação da DNA polimerase: 10 min a 95 °C; (ii) Desnaturação das fitas de DNA: 40 ciclos de 30 s a 94 °C; (iii) Anelamento e extensão: 1 min a temperaturas específicas de acordo com os genes (descrito no tópico resultados); (iv) Inibição da enzima: 98 °C por 10 min; e (v) Resfriamento: 4 °C. Posteriormente à reação de amplificação nas gotas contendo, ou não, o DNA, a placa é levada ao equipamento *QX200™ Droplet Reader* (Bio-Rad, EUA) que realiza a leitura das gotas geradas, e os dados são analisados no software *QuantaSoft* (QuantaSoft v1,7,4, Bio-Rad, EUA).

Após determinação das partições positivas e negativas, a concentração de alvo detectada é estimada pelo modelo matemático denominado distribuição de *Poisson*, que usa os valores de números de droplets positivas e negativas para

calcular a concentração através da quantificação absoluta, sem a necessidade de curva padrão⁸².

Todos os experimentos de determinação do status de metilação das amostras incluíram, além do controle negativo da reação (sem adição de DNA), controles comerciais contendo 10 ng de DNA sabidamente metilado (*CpGenome Universal Methylated DNA*, EMD Millipore, Alemanha) e 10 ng de DNA não metilado (*Human Non-methylated DNA*, Zymo Research, EUA).

Para a quantificação do nível de metilação dos genes para cada amostra, foi realizado o cálculo da porcentagem de referência metilada (PMR, do inglês *percentage of methylated reference*), através da utilização do número de cópias metiladas do gene alvo em um volume de 20 µl na amostra de interesse (amostra) e na amostra controle (DNA metilado), além desses mesmos valores para o gene referência, de acordo com a fórmula a seguir:

$$PMR = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ cópias do gene alvo} / \text{n}^{\circ} \text{ de cópias do gene referência (amostra)}}{\text{n}^{\circ} \text{ cópias do gene alvo} / \text{n}^{\circ} \text{ de cópias do gene referência (DNA metilado)}} \times 100$$

b) Amostras de plasma de pacientes com CEC de orofaringe

Após caracterização do perfil de metilação dos genes específicos nas amostras de tecido tumoral, a presença de metilação também foi avaliada em amostras de plasma coletadas antes do tratamento dos mesmos pacientes. Para esta análise, foi realizado o tratamento de 20 µL de cfDNA de plasma, utilizando o *EZ DNA Methylation-Direct Kit* (Zymo Research, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras foram eluídas em 20 µL de água livre de nuclease e armazenadas a -80° C até o momento da análise pela ddPCR, seguindo os mesmos procedimentos realizados na análise dos tecidos tumorais, mas com um input de 5 µL de cfDNA obtido a partir do plasma e convertidos por bissulfito de sódio para as análises.

4.5 Avaliação da presença de mutação em amostras de CEC de cavidade oral

a) Amostras de tecido de CEC de cavidade oral

Após a obtenção do DNA das amostras de tecido congelado selecionadas, foi avaliada a presença de mutações ao longo de toda a extensão codificadora do genoma através da técnica de sequenciamento do exoma completo. Essa técnica foi efetuada por meio da plataforma *Illumina HiSeq 2500™ System* (Illumina Technologies, EUA), pela empresa de biotecnologia *Sophia Genetics* (Sophia Genetics, Suíça).

Para todas as amostras avaliadas, também foi realizado o sequenciamento de amostras de DNA extraídas a partir de buffy coat dos mesmos pacientes. Esta análise fornece o perfil de variantes germinativas o qual está sendo desconsiderado do espectro de variantes obtidos a partir das amostras tumorais, de forma que somente alterações somáticas e presentes exclusivamente nas amostras tumorais estão sendo consideradas.

Os dados de sequenciamento foram compilados em um arquivo FASTQ (arquivo em formato de texto que contém toda a informação sobre a sequência de nucleotídeos e sobre a qualidade do sequenciamento) e alinhados à sequência do genoma de referência humano hg19. Em seguida, foi realizada a chamada de variantes utilizando pipeline da *Sophia Genetics* (Sophia Genetics, Suíça).

Foram selecionadas apenas variantes não identificadas nas amostras de buffy coat, e presentes nas amostras tumorais com uma frequência alélica maior ou igual a 5%. As variantes encontradas foram anotadas no software *wANNOVAR* (<http://wannovar.wglab.org/>) e na plataforma *Cancer Genome Interpreter* (CGI).

b) Amostras de lavado bucal de pacientes com CEC de cavidade oral

Após o sequenciamento do exoma completo das amostras de tecido tumoral de cavidade oral, foram selecionadas 4 amostras para validação de mutações detectadas no exoma que estivessem também contempladas no painel *TruSight Tumor 15* na plataforma *Illumina MiSeq* (Illumina Technologies, EUA). Após validação, o mesmo painel foi utilizado para avaliação da possibilidade de detecção da presença das mesmas mutações em amostras de lavado bucal coletadas antes

do tratamento dos mesmos pacientes.

O painel *TruSight Tumor 15* utiliza a tecnologia de NGS para analisar um painel de 15 genes frequentemente mutados em tumores sólidos, incluindo variantes de nucleotídeos únicos (SNVs), inserções, deleções (indels) e ampliações associadas ao câncer. Os genes avaliados no painel são: *AKT1*, *BRAF*, *EGFR*, *ERBB2*, *FOXL2*, *GNA11*, *GNAQ*, *KIT*, *NRAS*, *KRAS*, *MET*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *RET* e *TP53*. Ele permite a detecção precisa de variantes somáticas com frequência alélica de 5%, tendo sido otimizado para amostras de FFPE.

A detecção de mutação por esse painel se baseia no princípio do PCR em multiplex, cuja finalidade é a preparação de bibliotecas para o sequenciamento de DNA. A preparação das bibliotecas de DNA foi realizada segundo o protocolo fornecido pelo fabricante e o sequenciamento foi realizado na plataforma *Illumina MiSeq* (Illumina Technologies, EUA).

Vinte nanogramas quantificados pelo Qubit 2,0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) de DNA total foram utilizados na reação. O DNA foi diluído para uma concentração mínima de 2 ng/μL com água livre de RNase/DNase em um volume final de 12,5 μL. Dois *pools* de primers foram utilizados para o preparo dos Master Mix A e Master Mix B, que foram adicionados (10 μL de cada mix de reação) a duas reações de 5 μL de DNA a 2 ng/μL em tubos diferentes. Os tubos com o mix de PCR foram levados ao termociclador com as seguintes condições de temperatura: 98 °C por 3 minutos, 16 ciclos de 96 °C por 45 segundos, 70 °C por 1 minuto, 54 °C por 3 minutos. Ao final da ciclagem, foram colocados na placa da reação 4 μL de cada adaptador (*Index 1* e *Index 2*) e 27 μL de TAM juntamente aos produtos da PCR para a reação de amplificação de acordo com os seguintes ciclos de temperatura: 98 °C por 30 segundos, seguidos de 17 ciclos de 98 °C por 20 segundos, 60 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos, 72 °C por 5 minutos, e 10 °C ao final da ciclagem. A purificação das bibliotecas foi realizada com *Beads* magnéticas e lavagem com etanol 80%. Cada biblioteca purificada (pool A e pool B) foi transferida para uma nova placa. Em seguida, a qualidade das bibliotecas foi avaliada em gel de agarose 1,5% corado com gel red e as bibliotecas amplificadas foram quantificadas utilizando Qubit™ dsDNA HS Assay Kit pelo Qubit 2,0 (Invitrogen, Carlsbad, CA) e, por fim, foi efetuado o agrupamento das bibliotecas para a reação de sequenciamento, de acordo com as recomendações do protocolo.

Bibliotecas individuais com molaridade de 2 nM foram reunidas em um pool de oito amostras. Até 8pM do pool de biblioteca foram submetidos à geração de cluster na *flow cell*. O sequenciamento *pair-end* foi realizado utilizando o *MiSeq Reagent Kit v3, 600 Cycles* na plataforma *Illumina MiSeq* (Illumina Technologies, EUA).

4.6 Avaliação da presença de mutação em amostras de CEC de orofaringe

a) Amostras de tecido de CEC de orofaringe

Dado a limitação em termos de qualidade e quantidade do DNA obtido a partir de amostras de biópsia incluídas em parafina, a caracterização do perfil mutacional nas amostras de tumor de orofaringe foi feita através do sequenciamento de um painel de oncogenes e genes supressores tumorais na plataforma *Ion Torrent PGM* (Life Technologies, EUA), de acordo com o estudo realizado por Perdomo e colaboradores⁸³.

O painel inclui os seguintes genes, frequentemente descritos na literatura como associados aos tumores de cabeça e pescoço: *TP53*, *NOTCH1*, *CDKN2A*, *PTEN*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *HRAS*, *TP63*, *CASP8*, *FAT1*, *KMT2D*, *RB1*, *IRF6*, *EZH2* e *NSD1*⁵¹⁻⁵⁴.

Nesta etapa foram sequenciadas amostras de DNA de biópsia pré- tratamento de pacientes com câncer de orofaringe admitidos no Hospital de Câncer de Barretos. Para isso, foram desenhados *primers* com tamanho entre 125 e 175 pares de bases (pb), com o propósito de melhorar a eficiência da preparação da biblioteca e diminuir o impacto da fragmentação do DNA nesse processo. Sendo assim, foram utilizados três conjuntos de iniciadores para a amplificação simultânea de 923 amplicons dos 15 genes selecionados.

A preparação da biblioteca, a partir de 10 ng totais de DNA genômico de cada amostra foi realizada com a utilização do *Ion AmpliSeq Library Kit 2.0* (Life Technologies, EUA). A amplificação de toda a região codificadora dos 15 genes foi feita através do *AmpliSeq Custom Panel* (Life Technologies, EUA), com uma cobertura equivalente a 99,26%. As amostras foram identificadas por meio de códigos de barra utilizando o *IonXpress Barcode Adapters* (Life Technologies, EUA).

Em seguida, 30 pM de biblioteca purificada foram utilizados para a preparação

e enriquecimento dos alvos no *Ion Chef System* (Life Technologies, EUA) e o sequenciamento aconteceu no *Ion Torrent PGM* (Life Technologies, EUA) usando o *Ion PGM Hi -Q View Sequencing Kit* (Life Technologies, EUA). Os resultados do sequenciamento foram processados no servidor do *Ion Torrent PGM* (Life Technologies, EUA) e os dados gerados foram alinhados ao genoma de referência humano hg19 utilizando o *Torrent Mapping Alignment Program* (TMAP).

Os seguintes filtros de qualidade de sequenciamento foram adotados: profundidade de cobertura média de pelo menos 600x, no mínimo 80% das *reads* (sequências) alinhadas à região alvo e pelo menos 100,000 *reads* mapeadas (adaptados a partir de de Leng, 2016⁸⁴).

Posteriormente, foi realizada a chamada de variantes utilizando o *Torrent Variant Caller* (TVC) *plugin version v5.8.0.19* (464) e a anotação da lista de variantes geradas foi feita utilizando as ferramentas *Wannovar* (<http://wannovar.wglab.org/>) e *CGI* (<https://www.cancergenomeinterpreter.org/home>). Para a seleção das variantes, foram aplicados os filtros a seguir:

- variantes não sinônimas que ocorrem dentro de exons;
- variantes com profundidade de cobertura de pelo menos 200x;
- variantes com uma frequência alélica de pelo menos 10%⁸⁵;
- frequência observada nas bases de dados populacionais de variantes germinativas (como 1000 genomes, ExAC e ESP6500 entre outros) inferior a 1% (para os casos sequenciados na plataforma *Ion Torrent PGM* que não possuíam amostras normais pareadas);
- variantes classificadas como drivers conhecidos ou preditos usando a ferramenta CGI (<https://www.cancergenomeinterpreter.org/home>);
- variantes já descritas nas bases de dados COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) em quaisquer tumores e/ou TCGA (<http://www.cbioportal.org/>) em tumores de cabeça e pescoço (para os casos de CEC de orofaringe).

Para as amostras da *University Medical Center* (UMC), foi realizado previamente o sequenciamento de toda a região codificadora somente do gene *TP53*. Os mesmos critérios de seleção de variantes foram utilizados para estas amostras.

b) Amostras de plasma de pacientes com CEC de orofaringe

A presença de mutações em amostras de plasma de pacientes com CEC de orofaringe foi avaliada em uma população de casos da University Medical Center de Utrecht através da técnica de PCR digital. As variantes mais frequentes nas amostras de tumor de orofaringe da UMC foram selecionadas para a pesquisa em amostras de plasma coletadas no seguimento dos mesmos pacientes com informação do perfil de mutação no tecido tumoral utilizando o sistema *QX200™ AutoDG Droplet Digital™ PCR system* (Bio-Rad, EUA).

A detecção de mutação pelo método de ddPCR se baseia no princípio do PCR em Tempo Real para genotipagem com sistema de sondas, no qual o ensaio duplex utiliza um único par de *primers* e duas sondas com marcações diferentes para cada alelo, permitindo identificar a presença de alelos mutados através da coloração azul (MT), selvagens através da cor verde (WT, *wild type*) e a presença dos dois alelos pela coloração laranja, em cada amostra.

Para realizar as reações, duplicatas com 4 μ L e 8 μ L de amostra de cfDNA do plasma do paciente foram misturadas a *2X ddPCR supermix for probes* (no dUTP) e a *20X target primers/probe* (FAM) e *20X reference primers/probe* (HEX/VIC) a 900nM/250nM para MT e WT, consecutivamente, resultando em volumes de reação de ddPCR de 22 μ L. Apenas 20 μ L do mix de reação de PCR são transferidos ao cartucho, juntamente com 70 μ L do óleo *Automated Droplet Generation Oil for Probes* (Bio-Rad, EUA) para a geração das droplets através do método automatizado *QX200 AutoDG Droplet Digital PCR System* (Bio-Rad, EUA). As droplets já depositadas na placa de 96 poços são levadas ao termociclador *T100™ Thermal Cycler* (Bio-Rad, EUA) com as seguintes condições de ciclagem: (i) Ativação da DNA polimerase: 10 min a 95 °C; (ii) Desnaturação das fitas de DNA: 40 ciclos de 30 s a 94 °C; (iii) Anelamento e extensão: 1 min a temperaturas específicas de acordo com os genes selecionados (também descrito no tópico resultados); (iv) Inibição da enzima: 98 °C por 10 min; e (v) Resfriamento: 4 °C. Em seguida, a placa é levada ao equipamento *QX200™ Droplet Reader* (Bio-Rad, EUA), que realiza a leitura das droplets positivas e negativas da reação, e os dados são analisados no software *QuantaSoft* (QuantaSoft v1,7,4, Bio-Rad, EUA).

Esta etapa foi realizada no Laboratório de Genética Molecular da *University Medical Center*, em Utrecht, Holanda, durante período de estágio de pesquisa no

exterior (Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior – BEPE).

Todos os experimentos incluíram um controle negativo da reação (NTC) sem adição de DNA, além de controles negativos (10 ng de DNA de amostras sem a presença do alvo) e controles positivos (10 ng de DNA de amostras com a presença do alvo).⁸⁰

4.7 Análises estatísticas

As informações clínicas, demográficas e moleculares do presente estudo foram registradas na plataforma REDCap (*Research Electronic Data Capture*). Para as análises estatísticas, as variáveis coletadas foram transformadas em variáveis categóricas e a análise estatística foi realizada no programa estatístico para microcomputador SPSS 20.0. Para a construção dos gráficos, foi utilizado o *software GraphPad Prism version 5.00 for Windows*.

Para a avaliação da associação entre as variáveis anatomopatológicas dos pacientes incluídos e os resultados moleculares, foi utilizado o teste de frequência do Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. As análises de sobrevida foram realizadas através da construção de curvas de *Kaplan-Meier*, que foram comparadas através do teste de *log-rank*. A sobrevida livre de recorrência foi definida como o intervalo entre a data do tratamento inicial e o diagnóstico de recorrência (local, regional e/ou distante). O modelo de regressão múltipla de Cox foi utilizado para avaliar a influência das variáveis clínicas e moleculares no risco de recidivas.

A taxa de concordância entre o status de metilação em amostras de tecido e plasma foi determinada pelo teste *Cohen's Kappa*. A concordância entre os níveis de metilação foi associada pelo teste de correlação de *Spearman*. Para avaliar o potencial de detecção das alterações moleculares selecionadas nas amostras de fluidos corpóreos foram calculados os valores de sensibilidade e especificidade, além da construção de curvas ROC e cálculo da área sob a curva ROC (AUC). A significância estatística considerada para todas as análises foi determinada para um valor de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Seleção das amostras e delineamento do estudo

Foi realizada uma busca criteriosa para a seleção de casos, através do levantamento de informações de pacientes com diagnóstico de carcinoma escamocelular de cavidade oral (língua oral, palato duro, assoalho da boca, mucosa jugal e trígono retromolar) ou orofaringe (base de língua, palato mole, úvula, amígdala e orofaringe sem outras especificações), com amostra de tecido e de fluidos corpóreos armazenados no Biobanco institucional.

Esta busca foi realizada na plataforma SISONCO do Hospital de Câncer de Barretos a partir de relatório gerado contendo as amostras armazenadas no Biobanco institucional com os critérios descritos acima (sítio tumoral, disponibilidade de tecido tumoral, buffy coat e fluidos).

Após seleção inicial dos casos, foi efetuada a análise de prontuários e preenchimento de fichas de coleta, contendo dados clinicopatológicos e sociodemográficos (Figura 7) a fim de garantir apenas a seleção de pacientes que estivessem de acordo com os critérios de inclusão descritos na metodologia.

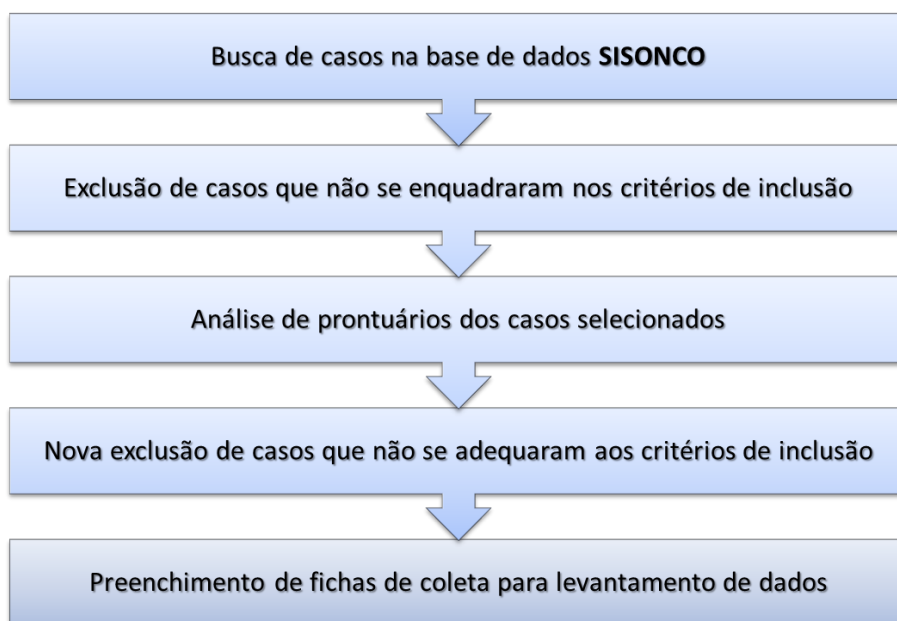


Figura 7 - Processo de seleção das amostras para inclusão no estudo.

a) Amostras de CEC de cavidade oral

Como descrito anteriormente, os pacientes com CEC de cavidade oral são frequentemente tratados com ressecção cirúrgica, o que geralmente garante material tumoral abundante e de qualidade. No entanto, para a pesquisa de mutações pela análise do exoma completo é imprescindível a disponibilidade de buffy coat pareado com as amostras tumorais. Sendo assim, no decorrer da triagem ocorreram muitas exclusões, resultando em 12 amostras de CEC de cavidade oral (Assoalho da boca: n = 6, 50,0%; Língua: n = 4, 33,3%; Gengiva: n = 1, 8,3% e Trígono Retromolar: n = 1, 8,3%) com tecido tumoral e saliva disponíveis, conforme descrito a seguir na figura 8.

As 12 amostras de tecido tumoral congelado foram utilizadas para realização do sequenciamento do exoma completo. Quatro amostras de tecido tumoral foram selecionadas e validadas através do sequenciamento do painel *TruSight Tumor 15* na plataforma *Illumina MiSeq* (Illumina Technologies, EUA), pois apresentaram mutações em genes incluídos no painel. O mesmo painel também foi utilizado para a busca de variantes mais representativas desse grupo em amostras de lavado bucal destes mesmos 4 pacientes (Figura 8).

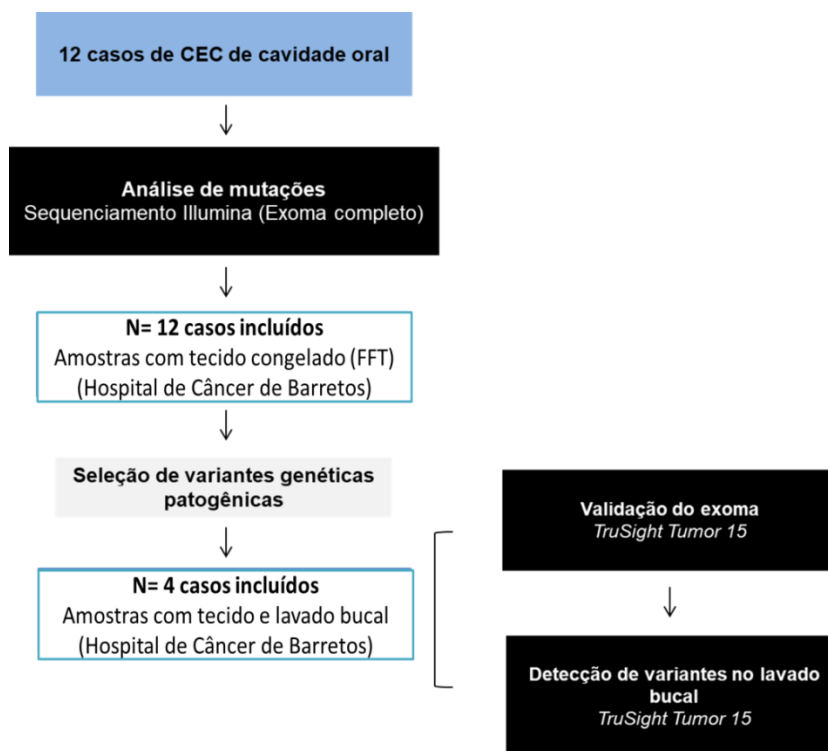


Figura 8 - Representação esquemática da seleção de amostras de CEC de cavidade oral (tecido congelado e lavado bucal) e fluxo de análises das alterações moleculares.

b) Amostras de CEC de orofaringe (HCB)

Já os pacientes com CEC de orofaringe são frequentemente tratados com protocolo de preservação de órgão, ou seja, através de quimio/radioterapia. Nestes casos, o material disponível para análise molecular era o tecido coletado no momento da biópsia diagnóstica pré-tratamento. Foram incluídas na etapa de caracterização molecular destes pacientes, 90 amostras de CEC de orofaringe, conforme descrito a seguir na figura 9. O baixo rendimento de DNA recuperado a partir das biópsias de CEC de orofaringe, não permitiu que tanto a busca de alterações genéticas quanto epigenéticas fossem feitas nas mesmas amostras. Sendo assim, a busca por variantes genéticas foi feita através do sequenciamento de um painel de genes em 51 amostras (Amígdala: n = 8, 22,2%; Base de língua: n = 4, 11,1%; Orofaringe SOE: n = 17, 47,2%; Palato mole: n = 3, 8,3%; Úvula: n = 1, 2,8%; Valécula: n = 3, 8,3%) e a análise do perfil de metilação em 54 amostras (Amígdala: n = 11, 28,2%; Base de língua: n = 6, 15,4%; Orofaringe SOE: n = 12, 30,8%; Palato mole: n = 8, 20,5%; Úvula: n = 2, 5,1%), com 15 amostras em comuns entre as casuísticas (Amígdala: n = 6, 40,0%; Orofaringe SOE: n = 5, 33,3%; Palato mole: n = 3, 20,0%; Úvula: n = 1, 6,7%). Amostras de plasma de apenas 23 dos casos estavam disponíveis e foram utilizadas no ensaio de detecção da metilação em fluidos corpóreos.

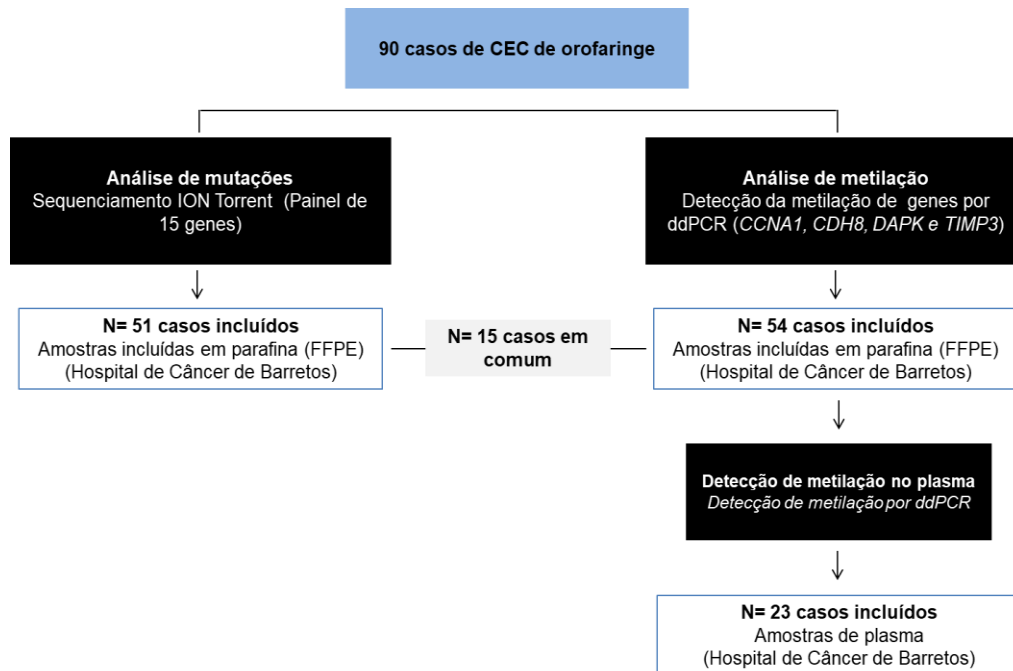


Figura 9 - Representação esquemática da seleção de amostras de CEC de orofaringe (tecido fixado em formalina e embebido em parafina/FFPE e plasma) e fluxo de análises das alterações moleculares.

c) Amostras CEC de orofaringe (UMC)

Durante a realização do Estágio de Pesquisa no Exterior, foi realizada a padronização e detecção de mutações específicas em *TP53* em amostras de plasma de pacientes com CECP. Para as etapas de padronização dos ensaios, foram utilizadas amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE), escolhidas por serem sabidamente positivas para as variantes no gene *TP53*, de tumores de esôfago (n=1), tumor de pulmão (n=1), tumores de cabeça e pescoço (n=3) e linfonodos metastáticos para o carcinoma escamocelular (n=3), fornecidas pelo *University Medical Center Utrecht (UMC)*, conforme a figura 10.

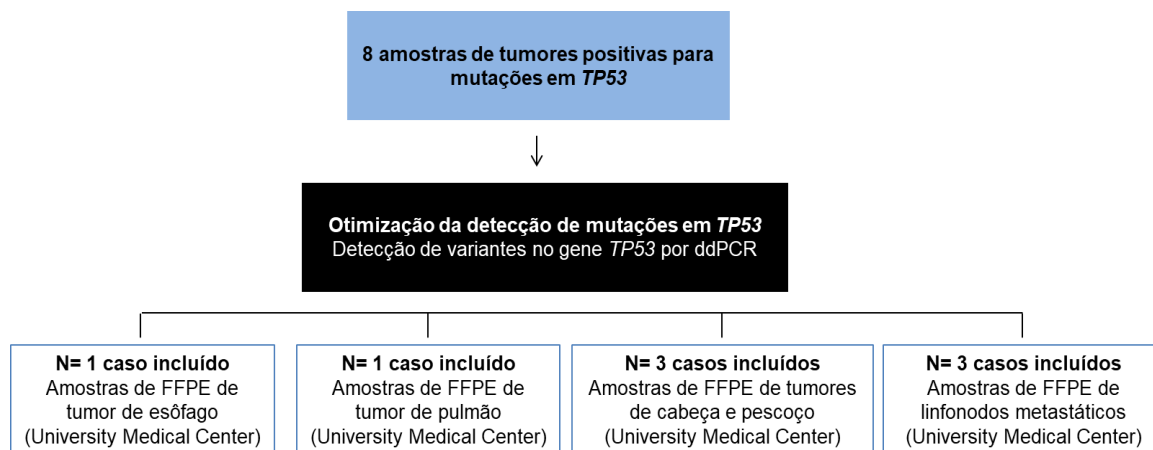


Figura 10 - Amostras de FFPE de tumores utilizadas na etapa de otimização para a detecção de mutações no gene *TP53* por ddPCR.

Também foram utilizadas 18 amostras de plasma coletadas durante o seguimento de três pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados na UMC com resultado do status de mutação do gene *TP53* disponível, de acordo com a figura 11. Esses ensaios foram realizados durante o período de Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) nessa mesma instituição.

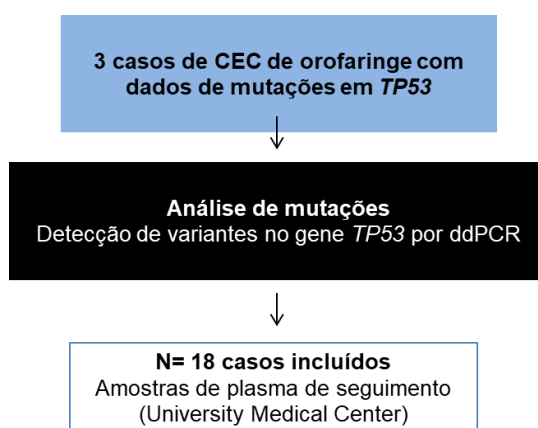


Figura 11 - Amostras de plasma de seguimento de tumores de cabeça e pescoço para análise de detecção de variantes no gene *TP53*.

5.2 Avaliação da presença de metilação em genes específicos em pacientes com CECP

5.2.1 Otimização das análises de metilação por PCR digital

Os ensaios de detecção de metilação dos genes *CCNA1*, *CDH8*, *DAPK* e *TIMP3*, originalmente otimizados para análises por PCR em Tempo Real (qMSP), foram padronizados para análise por *Droplet Digital PCR* (ddPCR). Para isso utilizamos amostras de DNA metilado e não metilado comerciais como controles da reação.

A concentração de 900 nM de *primers* e 250 nM de sonda foi utilizada no ensaio de acordo com as recomendações do fabricante⁸². Para a determinação das temperaturas de anelamento, foi realizado um ensaio de gradiente de temperatura, que avaliou a temperatura ótima para cada gene utilizando amostras de DNA metilado como controle positivo da reação e água como controle negativo (NTC; *No Template Control*). Foram testadas as seguintes condições: 63,8 °C; 63,2 °C; 61,8 °C; 60,0 °C; 57,8 °C; 55,8 °C; 54,5 °C e 53,8 °C. Os critérios utilizados para a escolha da melhor temperatura foram: (i) o número de droplets totais e positivas geradas na reação, (ii) o número de cópias metiladas e (iii) a amplitude da fluorescência. A tabela 3 apresenta as sequências dos *primers* e as temperaturas de anelamento definidas com estes testes.

Tabela 3 - Sequências de *primers* e sondas e temperatura de anelamento padronizada para análise de metilação por ddPCR dos 6 genes de interesse.

Gene	Forward 5'-3'	Sonda 6FAM 5'-3'TAMRA	Reverse 5'-3'	TA
<i>ACTB</i> ¹	TGGTGATGGAGG AGGTTTAGTAAGT	ACCACCACCCAACAC ACAATAACAAACACA	AACCAATAAACCT ACTCCTCCCTTAA	56°C
<i>CCNA1</i> ²	TCGCGGCGAGTTT ATTCG	CGTTATGGCGATGCGG TTTCGG	CCGACCGCGACAA ACG	56°C
<i>CDH8</i> ³	TAGGCGGGTTCGT ACGTC	TTTAAGTTTCGTTCGTCG TCGTCCG	CGCGCTAAACTCTA AATATCCG	58°C
<i>DAPK</i> ⁴	GGATAGTCGGATC GAGTTAACGTC	TTCGGTAATTCGTAGC GGTAGGGTTTGG	CCCTCCCAAACGC CGA	56°C
<i>TIMP3</i> ¹	GCGTCGGAGGTTA AGGTTGTT	AACTCGCTCGCCCGCC GAA	CTCTCCAAAATTAC CGTACGCG	56°C

(1) Eads CA, Lord RV, Wickramasinghe K, et al. Epigenetic patterns in the progression of esophageal adenocarcinoma. *Cancer research*, 2001;61(8):3410. (2) Carvalho AL, Jeronimo C, Kim MM, et al. Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, 2008;14(1):97-107. (3) de Carvalho AC, Melendez ME, da Silva Sabato C, Palmero EL, Arantes LMRB, Neto CS, Carvalho AL, Clinical and Molecular Characterization of Surgically Treated Oropharynx Squamous Cell Carcinoma Samples. *Pathol Oncol Res*, 2018; 24 (92): 1-12. (4) Harden SV, Tokumaru Y, Westra WH, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and lymph nodes of stage I lung cancer patients. *Clinical cancer research*, 2003;9(4):1370.

5.2.2 Análise de especificidade dos ensaios para a detecção de DNA metilado

Com o objetivo de determinar a especificidade dos ensaios, foram efetuadas reações com 10 nanogramas de DNA metilado (CM) e de DNA não metilado (CNM) comerciais, convertidos por bissulfito de sódio. A presença de droplets positivas no ensaio para o gene *ACTB*, indica que a amostra de DNA do CM e do CNM foi corretamente convertida pelo tratamento com bissulfito de sódio (Fig, 12 A). Foi possível observar que as reações são específicas para detecção de DNA metilado para os genes *CCNA1*, *CDH8*, *DAPK* e *TIMP3* conforme representado na figura 12 (Figura12B, C, D e E), pela ausência de droplets acima do threshold na coluna com os resultados para o CNM, assegurando a não amplificação do DNA controle não metilado.

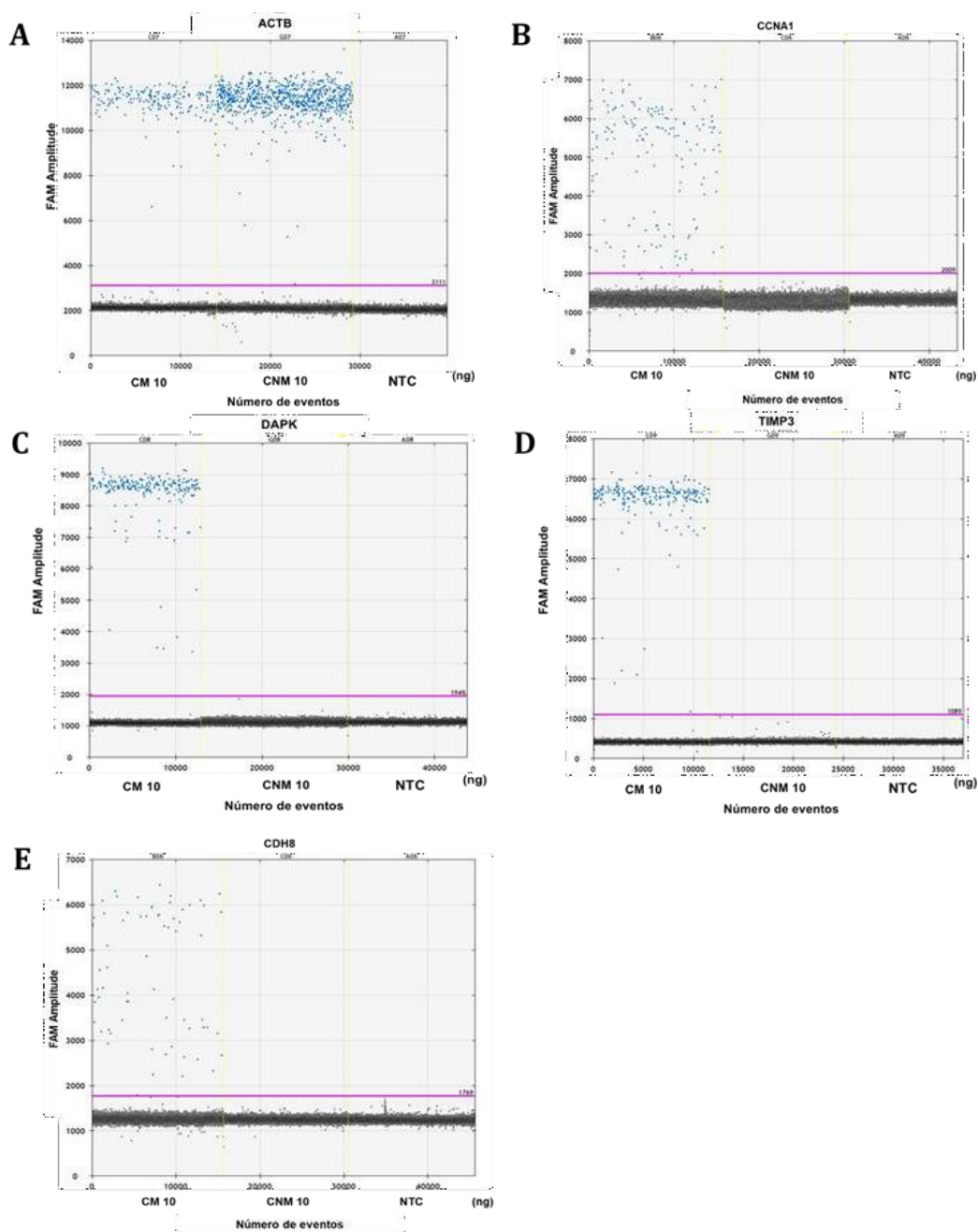


Figura 12 - Ensaio de especificidade para os genes *CCNA1* (B), *DAPK* (C), *TIMP3* (D) e *CDH8* (E), CM: controle metilado; CNM: controle não metilado, NTC: no template control.

5.2.3 Detecção da metilação do DNA em amostras de CEC de orofaringe

a) Amostras de tecido de pacientes com CEC de orofaringe

Cinquenta e dois pacientes diagnosticados com carcinoma escamocelular de orofaringe pelo Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Câncer de Barretos entre 2014 e 2018 foram incluídos nessa etapa do estudo.

Informações sobre o status de tabagismo e etilismo, características clínicas e histopatológicas foram adquiridas através de busca nos prontuários dos pacientes (Tabela 4).

A maioria dos pacientes dessa coorte eram homens (90,7%) com idade variando entre 40 e 79 anos (mediana = 56 anos), tabagistas (85,2%) e etilistas (83,0%). Noventa e um por cento apresentaram tumores avançados ao diagnóstico (49/54). O tratamento predominante foi a quimioterapia a base de platina concomitante à radioterapia, com 61,1% dos pacientes apresentando resposta completa. Oito casos (19,0%) desenvolveram recorrência durante o seguimento e o tempo de seguimento médio foi de 17,75 meses (variação: 5,30 a 52,57 meses).

O resultado do teste de imuno-histoquímica para detecção da proteína p16 foi utilizado como um marcador alternativo para a infecção por HPV de alto risco^{71, 86, 87}. Foi observado que 19/52 amostras (37,3%) foram consideradas positivas para a infecção pelo HPV.

Tabela 4 - Características clinicopatológicas dos pacientes com câncer de orofaringe (n=52).

Características	Número de casos	%
Gênero		
Masculino	47	90,4
Feminino	5	9,6
Idade		
≤ 55 anos	25	48,1
>55 anos	27	51,9
Status de tabagismo		
Não	4	7,7
Sim	44	84,6
Ex	4	7,7
Status de etilismo		
Não	4	7,8
Sim	42	82,4
Ex	5	9,8
Estágio		
I/II – inicial	5	9,6
III/IV – avançado	47	90,4
Resposta ao tratamento		
Não-respondedor	21	40,4
Respondedor	31	59,6
Recorrência		
Não	32	8,0
Sim	8	20,0
Status		
Vivo sem doença	23	57,5
Vivo com doença	11	27,5
Morte por cancer	6	15,0
HPV status		
Negativo	32	62,7
Positivo	19	37,3

A quantificação da metilação na região promotora dos genes *CCNA1*, *CDH8*, *DAPK* e *TIMP3*, através da técnica de ddPCR foi avaliada nas amostras de DNA provenientes dos tumores dos 52 pacientes: 71% (37/52) delas apresentaram metilação em pelo menos um dos genes avaliados, 48,1% (25/52) no *CCNA1*,

40,4% (21/52) no *DAPK*, 40,4% (21/52) no *CDH8* e 32,7% (17/52) no *TIMP3* (Tabela 5). A figura 13 ilustra a distribuição das amostras de acordo com o valor de PMR para os genes testados.

Tabela 5- Status de metilação dos genes *CCNA1*, *CDH8*, *DAPK* e *TIMP3* avaliados nas amostras de DNA tumoral de 52 pacientes por ddPCR.

Status de metilação	N	%
Status de metilação (qualquer gene)		
Não metilado	15	28,9
Metilado	37	71,1
Status de metilação <i>CCNA1</i>		
Não metilado	27	51,9
Metilado	25	48,1
Status de metilação <i>CDH8</i>		
Não metilado	31	59,7
Metilado	21	40,3
Status de metilação <i>DAPK</i>		
Não metilado	31	59,7
Metilado	21	40,3
Status de metilação <i>TIMP3</i>		
Não metilado	35	67,4
Metilado	17	32,6

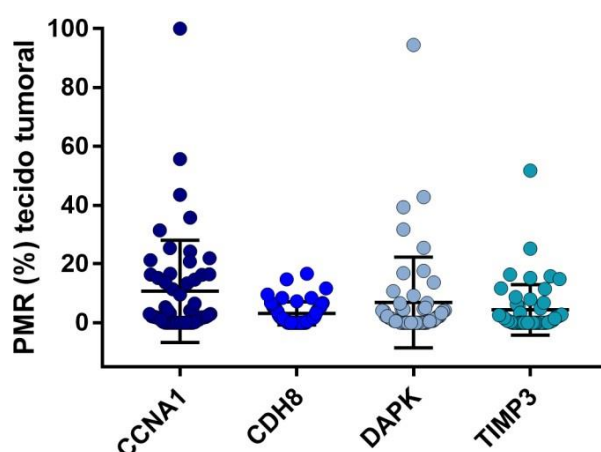


Figura 13 - Porcentagem de metilação na região promotora dos genes avaliados nas amostras de FFPE, PMR: porcentagem de referência metilada.

Outro objetivo desta etapa do estudo foi avaliar se existe associação entre o perfil de metilação encontrado nas amostras tumorais e as características clínicas e anatomopatológicas dos pacientes incluídos (Tabela 6). Foi possível verificar que todos os pacientes que não relataram histórico de consumo de álcool apresentaram metilação em *DAPK* (teste exato de Fisher: $p = 0,019$) e *CCNA1* (teste exato de Fisher: $p = 0,043$), enquanto todos os casos não metilados em *TIMP3* apresentaram linfonodos clinicamente negativos ao diagnóstico (teste exato de Fisher; $p = 0,005$) (Tabela 6).

Tabela 6 - Associação entre dados clínicos e moleculares dos pacientes com carcinoma de orofaringe incluídos no estudo.

Características	Metilação de CCNA1			Metilação de CDH8			Metilação de DAPK			Metilação de TIMP3		
	Negativo	Positivo	P	Negativo	Positivo	P	Negativo	Positivo	P	Negativo	Positivo	P
Status de HPV												
Negativo	17 (53,1)	15 (46,9)	0,973	19 (59,4)	13 (40,6)	0,917	20 (62,5)	12 (37,5)	0,489	22 (68,8)	10 (31,2)	0,682
Positivo	10 (52,6)	9 (47,4)		11 (57,9)	8 (42,1)		10 (52,6)	9 (47,4)		12 (63,2)	7 (36,8)	
Idade ao diagnóstico												
≤ 55 anos	12 (48,0)	13 (52,0)	0,586	15 (60,0)	10 (40,0)	0,957	15 (64,0)	10 (40,0)	0,957	17 (68,0)	8 (32,0)	0,918
> 55 anos	15 (55,6)	12 (44,4)		16 (59,3)	11 (40,7)		16 (59,3)	11 (40,7)		18 (66,7)	9 (32,0)	
Estágio T												
T1/T2	8 (47,1)	9 (52,9)	0,625	13 (76,5)	4 (23,5)	0,84	10 (58,8)	7 (41,2)	0,935	12 (70,6)	5 (29,4)	0,725
T3/T4	19 (54,3)	16 (45,7)		18 (51,4)	17 (48,6)		21 (60,0)	14 (40,0)		23 (65,7)	12 (34,3)	
Estágio N												
N0	6 (50,0)	6 (50,0)	0,879	10 (83,3)	2 (16,7)	0,093	9 (75,0)	3 (25,0)	0,318	12 (100,0)	0 (0,0)	0,005
N+	21 (52,5)	19 (47,5)		21 (52,5)	19 (47,5)		22 (55,0)	18 (45,0)		23 (57,5)	17 (42,5)	
Estadiamento clínico												
I/II	2 (40,0)	3 (60,0)	0,662	5 (100,0)	0 (0,0)	0,073	3 (60,0)	2 (40,0)	1,000	5 (100,0)	0 (0,0)	0,159
III/IV	25 (53,2)	22 (46,8)		26 (51,4)	21 (44,7)		28 (59,6)	19 (40,4)		30 (63,8)	17 (36,2)	
Tabagismo												
Não	1 (25,0)	3 (75,0)	0,341	2 (50,0)	2 (50,0)	1,000	1 (25,0)	3 (75,0)	0,291	2 (50,0)	2 (50,0)	0,589
Sim/Ex	26 (54,2)	22 (45,8)		29 (60,4)	19 (39,6)		30 (62,5)	18 (37,5)		33 (68,8)	15 (31,2)	
Etilismo												
Não	0 (0,0)	4 (100,0)	0,043	2 (50,0)	2 (50,0)	0,64	0 (0,0)	4 (100,0)	0,019	2 (50,0)	2 (50,0)	0,581
Sim/Ex	27 (57,4)	20 (42,6)		29 (61,7)	18 (38,3)		31 (66,0)	16 (34,0)		33 (70,2)	14 (29,8)	
Resposta ao tratamento												
Não respondedor	13 (61,9)	8 (38,1)	0,236	13 (61,9)	8 (38,1)	0,782	14 (66,7)	7 (33,3)	0,394	13 (61,9)	8 (38,1)	0,494
Respondedor	14 (45,2)	17 (54,8)		18 (58,1)	13 (41,9)		17 (54,8)	14 (45,2)		22 (71,0)	9 (38,1)	

Conforme citado anteriormente, o tempo de seguimento dos pacientes incluídos nessa análise variou de 5,30 a 52,57 meses. A presença de metilação no gene *CCNA1* foi associada a uma menor sobrevida livre de recorrência em 5 anos quando comparada às amostras não metiladas (45,8% versus 91,3%; teste exato de Fisher: $p = 0,041$; Figura 14 A). O status de metilação dos demais genes não apresentou associação estatisticamente significativa com a sobrevida livre de recorrência (Figura 14 B, C e D).

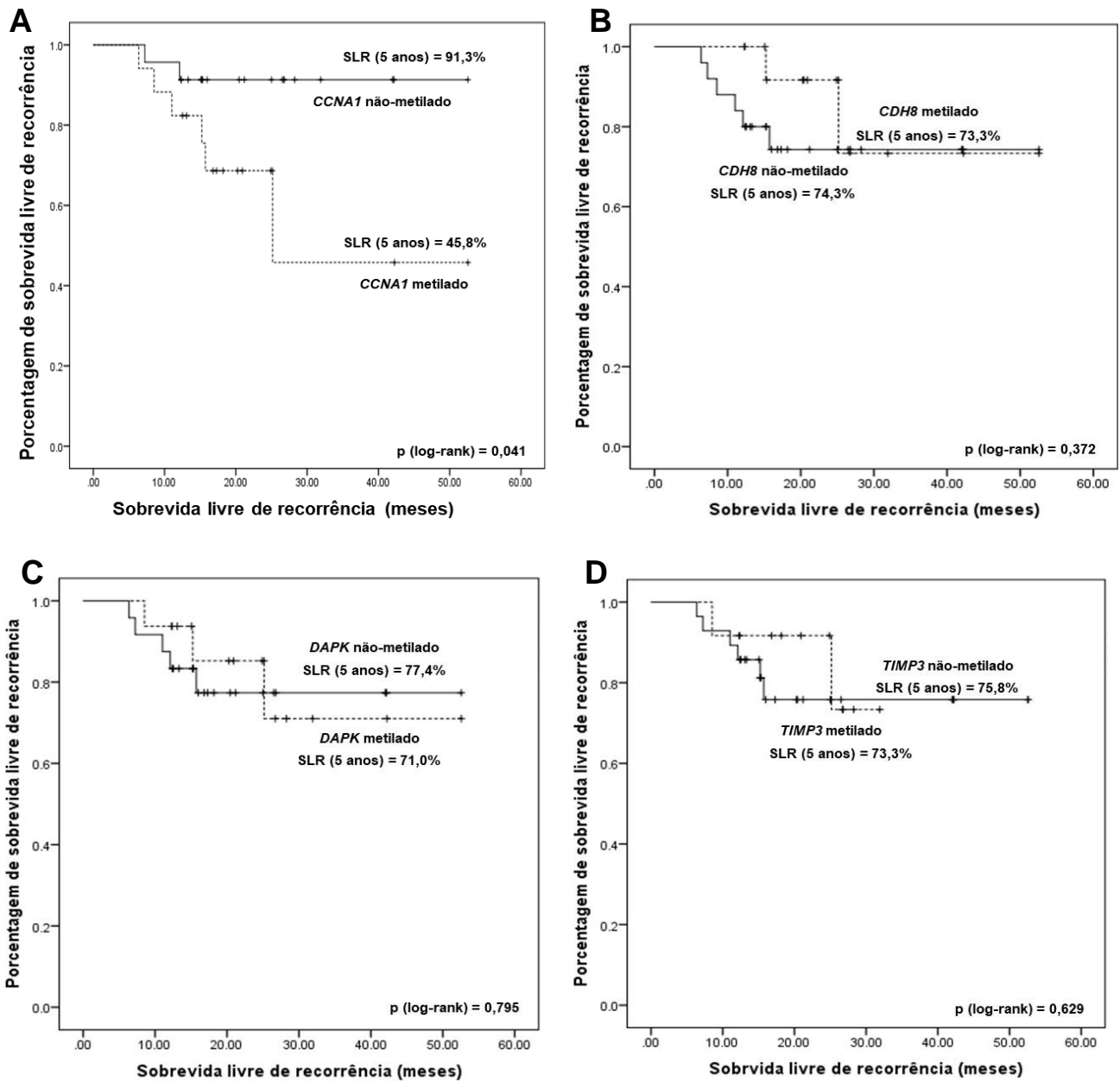


Figura 14 - Curvas de sobrevida livre de recorrência entre amostras metiladas e não metiladas para os genes *CCNA1* (A), *CDH8* (B), *DAPK* (C) e *TIMP3* (D).

b) Amostras de plasma de pacientes com CEC de orofaringe

Após avaliação do status de metilação dos genes de interesse nas amostras de tecido tumoral, foi avaliada a viabilidade de detecção desta alteração em amostras de plasma.

Para testar a especificidade dos marcadores para detecção no plasma de DNA metilado específico do tecido tumoral, foram analisadas amostras de plasma de 10 indivíduos saudáveis utilizados como controles. Foram detectados níveis de metilação no intervalo de 0 e 9,4% para *CCNA1*, 0 e 9,0% para *DAPK* e 0 e 0,1% para *CDH8* e *TIMP3* (Figura 15). Tendo como base o nível mais alto de porcentagem de referência metilada (PMR) detectado na reação com DNA dos controles, foi determinado um valor de corte $\geq 10\%$ para classificar as amostras como positivas para a metilação de *CCNA1* e *DAPK* e $\geq 0,1\%$ para a metilação de *CDH8* e *TIMP3*.

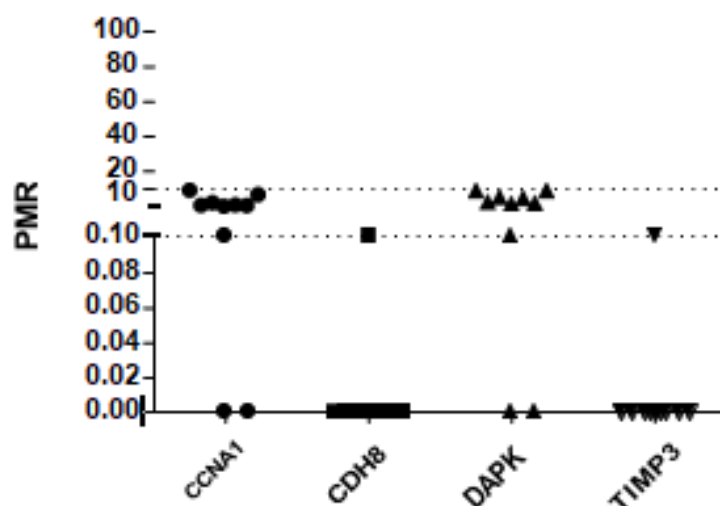


Figura 15 - Representação da porcentagem de referência metilada para os genes *CCNA1*, *CDH8*, *DAPK* e *TIMP3* nas amostras de plasma dos indivíduos sem câncer de cabeça e pescoço selecionados como controles do estudo.

Dos 52 casos testados para metilação em amostras de biópsia de tecido tumoral, 20 tinham amostras de plasma pré-tratamento disponíveis para serem avaliadas. A Figura 16 mostra os resultados pareados do nível de metilação detectado dos genes testados em amostras de tumor e plasma. Cinco dessas amostras de plasma eram de pacientes para os quais não encontramos metilação dos genes testados no tecido tumoral, e nenhuma metilação foi observada nas amostras de plasma. As 15 amostras remanescentes de plasma pré-tratamento

foram de casos portando metilação no tecido tumoral. O cfDNA metilado foi detectado em 11/15 (73,3%) destas amostras: 7/11 apresentaram metilação em *CCNA1*, 2/11 com metilação em *TIMP3*, 1 caso com metilação em *CDH8* e 1 em *DAPK*.

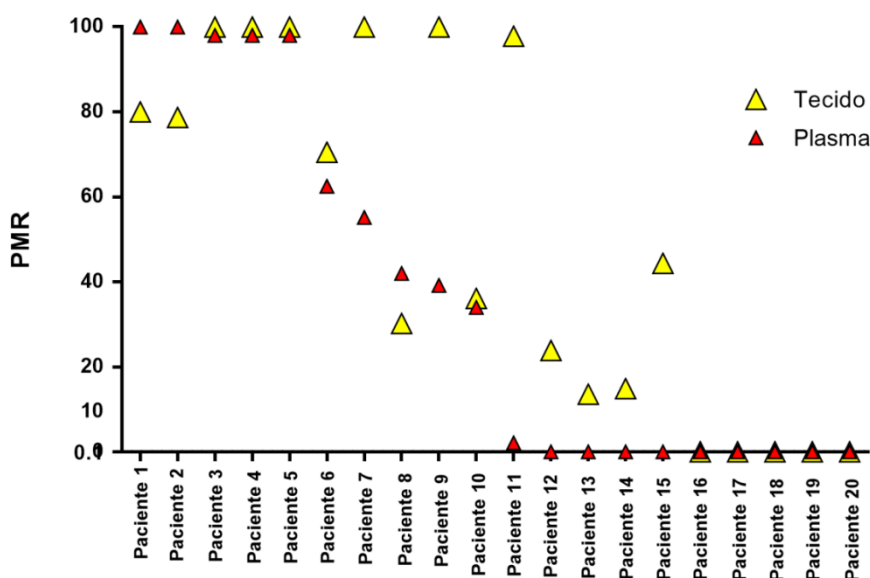


Figura 16 - Comparação entre os níveis de metilação aberrante do DNA em biópsias de tecido pré-tratamento pareadas com amostras de plasma de pacientes com câncer de orofaringe. Os triângulos vermelhos representam as amostras de plasma, enquanto os amarelos representam as amostras de tecido. PMR: porcentagem de referência metilada.

A taxa de concordância entre os resultados dos pares de amostras de tumor e plasma foi de 80%, com 16 dos 20 resultados concordantes para o status de metilação nos dois tipos de amostra: 11/15 casos positivos e 5/5 casos negativos nos dois tipos de amostra (Cohen's Kappa = 0,579; $p = 0,004$). Embora níveis diferentes de metilação tenham sido observados nas amostras de tecido tumoral e plasma pareados, refletindo diferentes frequências de alelos metilados para os genes testados, foi observada uma correlação positiva entre esses níveis e os tipos de amostras (coeficiente de correlação de Spearman = 0,801; IC95% = 0,506 a 0,920; $p < 0,0001$). Finalmente, a detecção de cfDNA metilado mostrou um bom poder discriminatório ao classificar amostras de plasma de pacientes (com sensibilidade de 73,3%) e controles (com especificidade de 100%), com uma AUC de 0,867 (IC 95% = 0,720 a 1,000) (Figura 17).

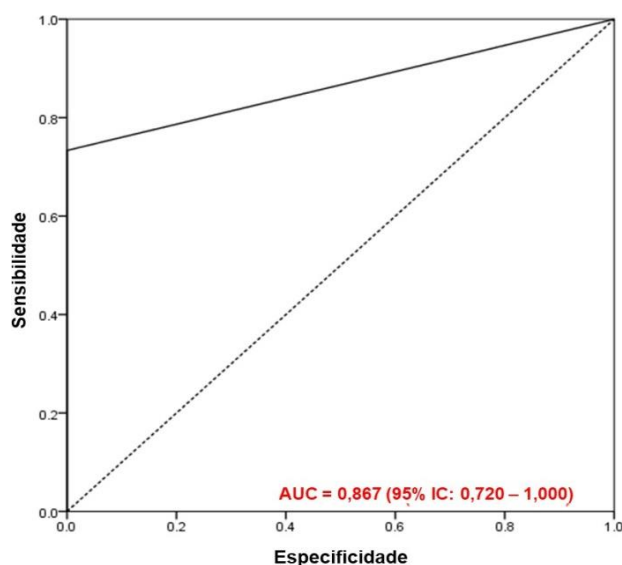


Figura 17 - Curva ROC (*Receiver Operating Characteristic*) mostrando a boa precisão da detecção de cfDNA metilado em discriminar amostras de plasma de casos e controles.

Para 3 amostras de plasma pré-tratamento que apresentaram metilação detectável no gene *CCNA1*, amostras de plasma pós-tratamento também estavam disponíveis (Figura 18):

Paciente 3 (T2N2cM0; positivo para HPV)

- **20/09/2017:** Coleta realizada antes do tratamento com quimiorradiação concomitante. O nível de *CCNA1* metilado no plasma estava elevado, com um PMR de 100%.
- **08/11/2018:** Coleta de plasma foi realizada nesta data, 414 dias após a primeira coleta e pós-tratamento, o qual teve resposta completa. Entretanto, o paciente está atualmente realizando testes para avaliação de um aumento suspeito na dimensão de um linfonodo cervical nível II, o que pode indicar a presença de metástase no pescoço. Os níveis de metilação no cfDNA permaneceram elevados (100%).

Paciente 6 (T4aN2bM0; positivo para HPV)

- **13/04/2017:** Coleta realizada antes do tratamento curativo. O nível de *CCNA1* metilado no plasma foi de 62%.
- **25/10/2017:** Coleta realizada após o paciente ter realizado tratamento curativo (radioterapia como primeira linha e, após a progressão da doença, quimioterapia e

imunoterapia como segunda linha de tratamento). O nível de metilação em *CCNA1* no plasma foi de 27%, detectado aos 195 dias de acompanhamento.

- **17/05/2018:** Coleta realizada aos 399 dias pós-primeira coleta e durante a segunda linha de tratamento. O nível de *CCNA1* metilado no plasma continuou a reduzir, com um PMR de 10%.

Paciente 7 (T4aN0M0; negativo para HPV)

- **28/04/2017:** Coleta realizada antes do tratamento curativo. O nível de *CCNA1* metilado no plasma foi de 55%.
- **09/11/2017:** Coleta realizada após o período de tratamento do paciente com quimiorradiação concomitante com resposta completa. O nível de *CCNA1* metilado após 195 dias do tratamento subiu para 100%. O paciente apresentou recorrência local 518 dias após a primeira coleta.

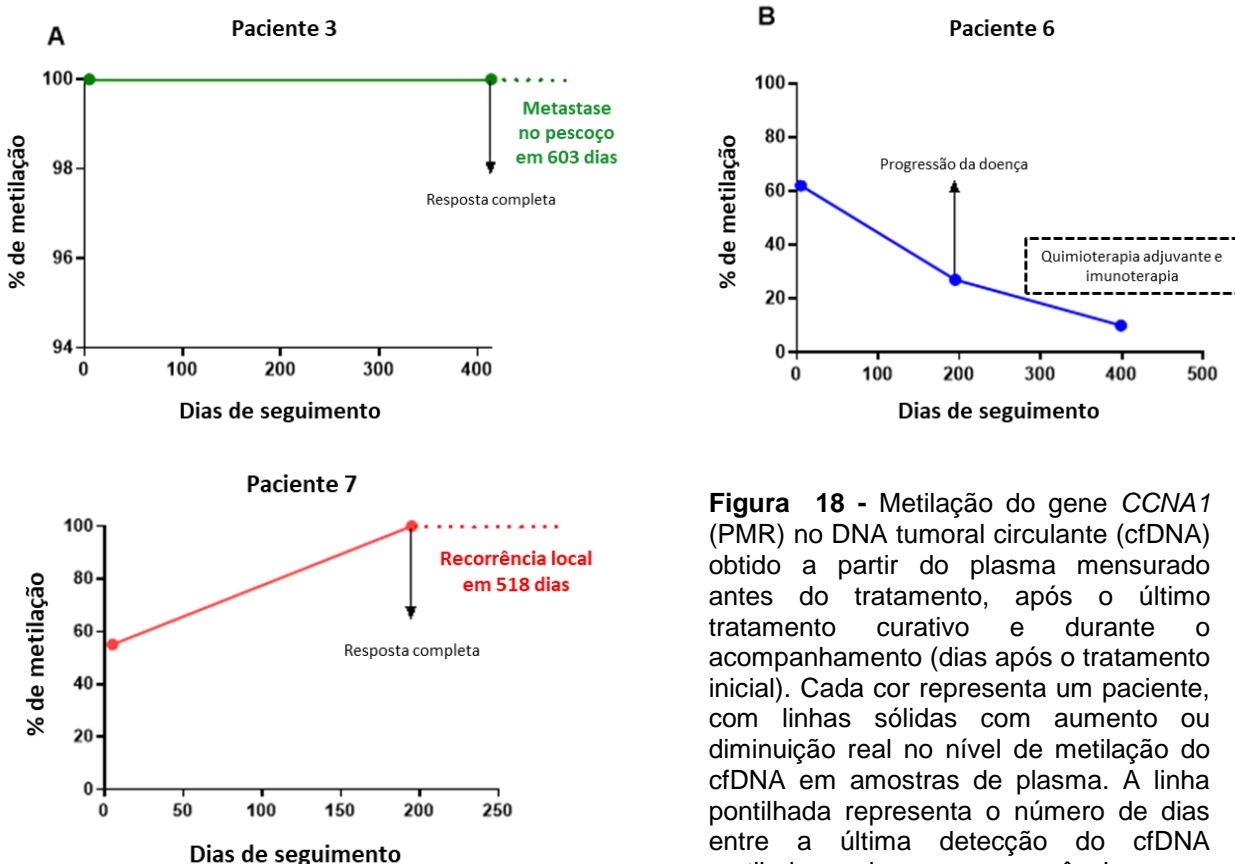


Figura 18 - Metilação do gene *CCNA1* (PMR) no DNA tumoral circulante (cfDNA) obtido a partir do plasma mensurado antes do tratamento, após o último tratamento curativo e durante o acompanhamento (dias após o tratamento inicial). Cada cor representa um paciente, com linhas sólidas com aumento ou diminuição real no nível de metilação do cfDNA em amostras de plasma. A linha pontilhada representa o número de dias entre a última detecção do cfDNA metilado no plasma e a recorrência.

5.3 Avaliação da presença de mutação em amostras de CEC de cavidade oral

5.3.1 Caracterização da população

Foram selecionados 12 pacientes com carcinoma de cavidade oral para a realização da análise de mutações. A tabela 7 apresenta as características clínicopatológicas dos indivíduos incluídos nesse estudo, sendo a maioria deles do sexo masculino (11/12; 91,7%), com idade variando de 44 a 79 anos (mediana = 61,5 anos). Destes pacientes, 91,7% (11/12) eram tabagistas e 83,3% (10/12) eram etilistas.

Aproximadamente 67% dos pacientes apresentaram doença avançada ao diagnóstico e realizaram tratamento adjuvante após a ressecção cirúrgica. Quando avaliadas as características histopatológicas, verificou-se que 66,7% dos pacientes tinham margens livres, 58,3% não tinham infiltração perineural e 83,3% não apresentaram invasão vascular. O seguimento médio desses pacientes foi de 30,1 meses (variando de 2 a 69 meses) e 47,6% dos indivíduos estavam vivos em 5 anos. Quatro pacientes (33,3%) desenvolveram recidivas durante o seguimento.

Tabela 7 - Características clínicas e patológicas dos pacientes com CEC de cavidade oral avaliados nesta etapa do estudo (n=12).

Características		Número de casos	%
Gênero	Masculino	11	91,7
	Feminino	1	8,3
Idade	≤ 55 anos	3	25,0
	> 55 anos	9	75,0
Status de tabagismo	Não	1	8,3
	Sim ou ex	11	91,7
Status de etilismo	Não	2	16,7
	Sim ou ex	10	83,3
Estadio T	T1/T2	6	50,0
	T3/T4	6	50,0
Estadio N	N0	8	66,7
	N+	4	33,3
Estadiamento	I/II – inicial	4	33,3
	III/IV – avançado	8	66,7
Margens cirúrgicas comprometidas	Não	8	66,7
	Sim	4	33,3
Infiltração perineural	Não	7	58,3
	Sim	5	41,7
Infiltração vascular	Não	10	83,3
	Sim	2	16,7
Tratamento adjuvante	Não	4	33,3
	Radioterapia	4	33,3
	Quimioterapia + Radioterapia	4	33,3
Recorrência	Não	8	66,7
	Sim	4	33,3
Status	Vivo sem doença	5	41,7
	Vivo com doença	1	8,3
	Morte por câncer	5	41,7
	Morte por outras Causas	1	8,3

a) Amostras de tecido de CEC de cavidade oral

Foi realizada a busca por variantes genéticas em toda a região codificadora do genoma das 12 amostras de tecido congelado de pacientes diagnosticados com câncer de cavidade oral submetidos à cirurgia como tratamento através da técnica de exoma pela plataforma *Illumina HiSeq 2500™*

System (Illumina Technologies, EUA), realizada pela empresa *Sophia Genetics*. Os dados de sequenciamento foram analisados pela empresa e disponibilizados na plataforma *SOPHiA DDM (version 5.2.0)*, que gerou automaticamente uma lista das variantes germinativas e somáticas encontradas, após aplicação de filtros de qualidade. Como o foco deste trabalho é descrever as variantes somáticas presentes em cada amostra tumoral e ausentes nas amostras de *buffy coat* (que representam o tecido normal), todas as variantes encontradas nas amostras normais de cada caso foram desconsideradas.

Das variantes presentes exclusivamente nas amostras de tumor foram consideradas apenas variantes não sinônimas e com VAF > 5%, resultando em 83 variantes em 52 genes (Anexo D), com uma média de 6,92 variantes por amostra (variando de 1 a 18). Das 83 variantes, 46 (55,4%) eram missense, 13 (15,6%) eram nonsense, 23 (27,7%) eram frameshift e 1 (1,2%) era em sítio de splice. Encontramos uma média de 6,25 (variando de 1 a 17) genes mutados por amostra e todos os pacientes (n=12) sofreram mutação em pelo menos um gene testado: 1/12 (8,3%) teve apenas um gene mutado, 6/12 (50,0%) tiveram entre 2 e 5 genes mutados e 5/12 (41,7%) tiveram mais de 5 genes mutados. A tabela 8 mostra a frequência de mutação nos genes que estavam mutados em pelo menos 1 amostra. Doze genes apresentaram-se mutados em 2 amostras ou mais: *TP53* em 75,0% (9/12); *KMT2D* em 33,3% (4/12); *FAT1* em 25,0% (3/12), *H3F3A* em 25,0% (3/12); e *ASXL1*; *CDKN2A*; *CHD6*; *CLOCK*; *HLA-A*; *HNF1A*; *KMT2C* e *NOTCH1* em 16,7% (2/12).

Tabela 8 - Lista dos 52 genes que apresentaram mutação aberrante em pelo menos 2 amostras da população deste estudo.

Gene	Frequência (%)
<i>TP53</i>	75,0
<i>KMT2D</i>	33,3
<i>FAT1, H3F3A</i>	25,0
<i>ASXL1, CDKN2A, CHD6</i>	16,7
<i>CLOCK, HLA-A, HNF1A, KMT2C, NOTCH1</i>	
<i>ACVR1B, ALK, APC, BCL10, CASP8, CCND1</i>	8,3
<i>CDK4, CHD2, CHD8, CLTC, CSDE1, CTCF</i>	
<i>CYLD, DAXX, EP300, FAT2, FBXO11, FRG1, HSPA8</i>	
<i>INPP4B, KCNJ5, LATS1, MACF1, MAGI2</i>	
<i>MAP3K13, MCC, MGA, MYC, NFE2L2, NOTCH2</i>	
<i>PIK3CA, POLR2B, PRKAA1, PTCH1</i>	
<i>RASA1, SETD2, STAT3, SYK, WHSC1, WRN</i>	

Em relação aos genes encontrados mutados na nossa população, *TP53*, *KMT2D*, *FAT1*, *H3F3A*, *CDKN2A*, *NOTCH1*, *KMT2C*, *CDH6*, *HLA-A* e *ALSX* foram os 10 mais frequentemente mutados com frequências entre 16,7% e 75,0%. O *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) realizou o exoma de um grande número de amostras em seu estudo e registrou os genes *TP53*, *FAT1*, *CDKN2A*, *PIK3CA*, *NOTCH1*, *KMT2D*, *NSD1*, *CASP8*, *AJUBA* e *NFE2L2* como os 10 mais frequentemente mutados em sua população. Destes 10 genes, 9 também estavam comumente mutados em nosso estudo. A partir da lista de genes mais frequentemente mutados na nossa casuística e no estudo do TCGA, criamos uma lista de 15 genes mutados nas duas casuísticas.

A figura 19 representa os tipos e as frequências de mutações encontradas para estes 15 genes na nossa casuística. Das 12 amostras avaliadas, 11 (91,7%) tiveram mutação em pelo menos 1 destes genes.

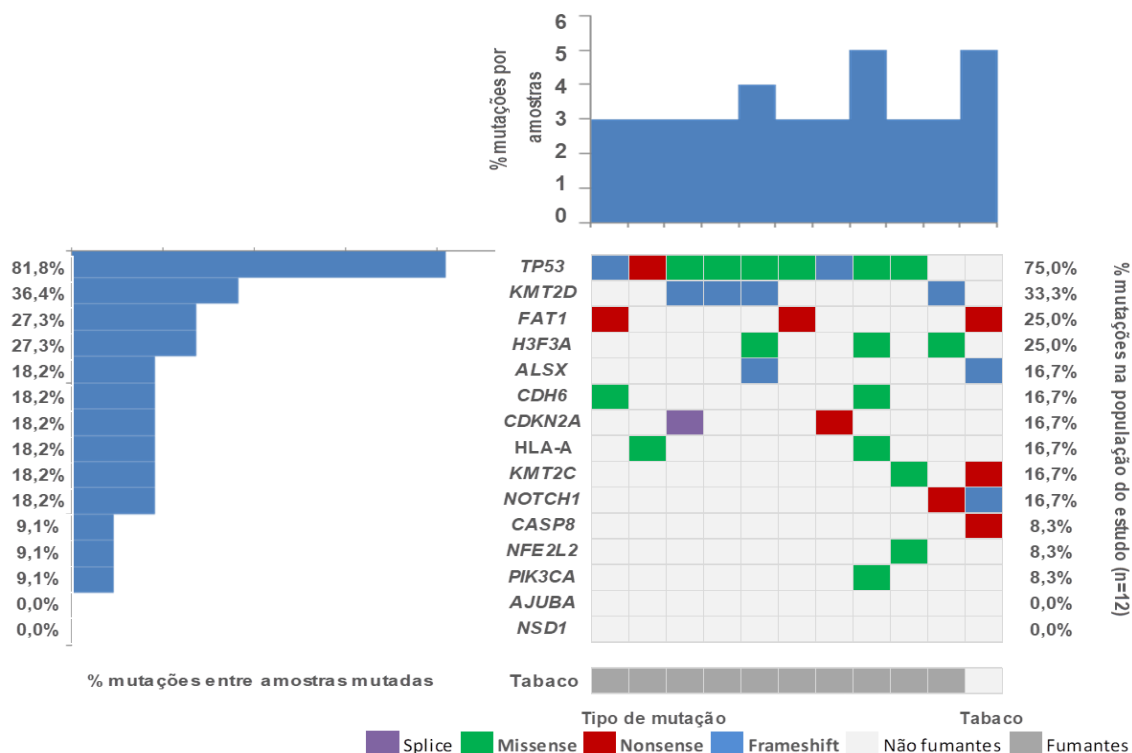


Figura 19 - Diagrama representando os diferentes tipos de mutações e suas frequências observados no CEC de cavidade oral. Os genes (localizadas nas linhas) são classificados de acordo com a frequência de mutações em amostras mutadas (n=11; representadas no painel esquerdo) e em toda a população do estudo (n=12; painel direito). As amostras (localizadas nas colunas) são classificadas de acordo com o uso do tabaco. Acima há o número de mutações por amostra. As cores indicam o tipo de mutação e status de tabagismo.

Além disso, foram comparadas as taxas de mutações dos genes mais frequentemente mutados nos dois estudos em pacientes diagnosticados com CEC de cavidade oral da nossa população (n = 12; barra de cor azul claro) com indivíduos diagnosticados apenas com CEC de cavidade oral (n = 239; barra de cor azul escuro) do TCGA, conforme apresentado na tabela 9 e na figura 20. Os dados mutacionais das amostras de CEC de cavidade oral avaliadas no Atlas do Genoma do Câncer (TCGA) foram acessados através da ferramenta Xena Browser online (<https://xenabrowser.net>). As frequências de mutação dos genes testados neste estudo foram comparadas entre as duas coortes.

Tabela 9 - Análise comparativa das frequências das mutações nos genes selecionados entre as casuísticas de CEC de cavidade oral desse estudo e do TCGA.

Nome do gene	TCGA n = 239	Este estudo n = 12
<i>AJUBA</i>	5,02%	0,00%
<i>ALSX</i>	2,93%	16,70%
<i>CASP8</i>	14,64%	8,30%
<i>CDH6</i>	2,51%	16,70%
<i>CDKN2A</i>	24,27%	16,70%
<i>FAT1</i>	24,27%	25,00%
<i>H3F3A</i>	0,00%	25,00%
<i>HLA-A</i>	3,35%	16,70%
<i>KMT2C</i>	5,86%	16,70%
<i>KMT2D</i>	10,46%	33,30%
<i>NFE2L2</i>	5,02%	8,30%
<i>NOTCH1</i>	17,99%	16,70%
<i>NSD1</i>	6,69%	0,00%
<i>PIK3CA</i>	16,32%	8,30%
<i>TP53</i>	76,57%	75,00%

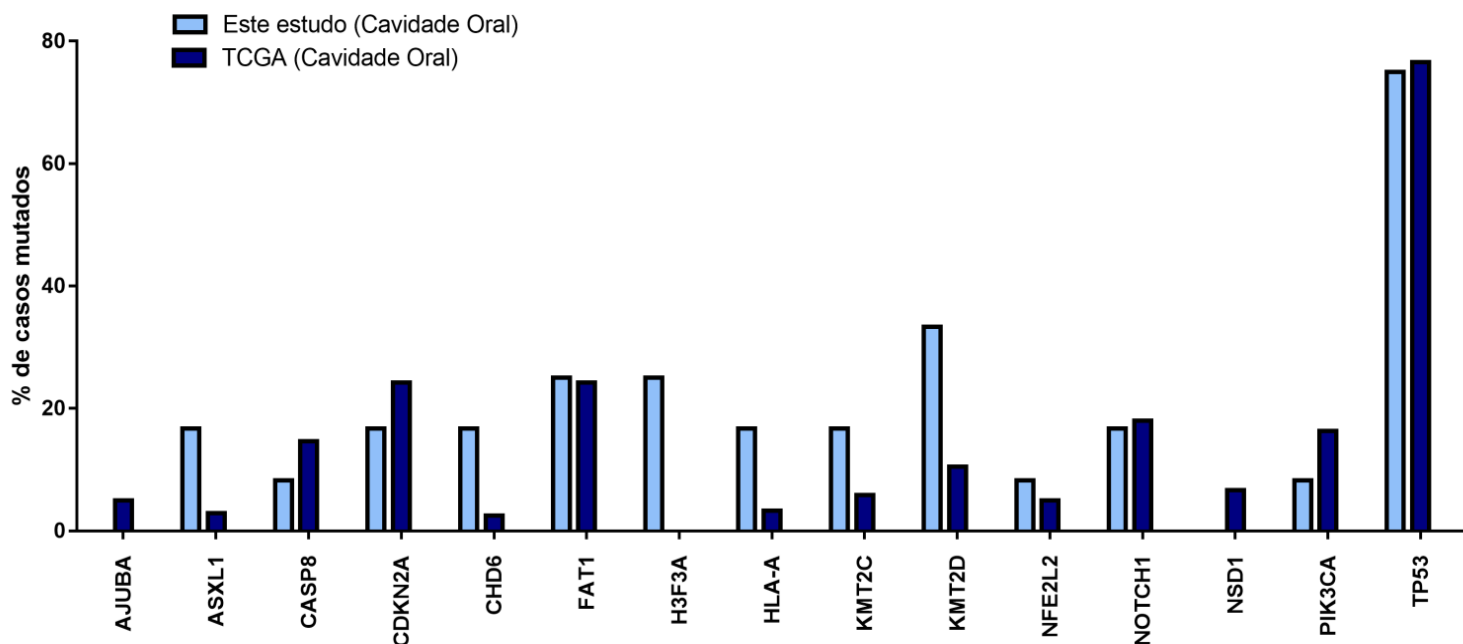


Figura 20 - Comparação da frequência das mutações encontradas em 15 genes em indivíduos com CEC de cavidade oral incluídos nesse estudo (n= 12) e na casuística estendida do TCGA (n=239) De acordo com o gráfico, as barras de cor azul claro indicam as frequências de mutações nos pacientes desse estudo e as barras de cor azul escuro indicam as frequência de mutações nos pacientes do TCGA

Os resultados mostram frequências similares de mutação para os genes classicamente relacionados com a via de carcinogênese oral induzida por tabaco quando comparamos as duas casuísticas: *TP53*, 75,0% (9/12) neste estudo e 76,6% (183/239) no TCGA, *NOTCH1* 16,7% (2/12) versus 18,0% (43/239), *FAT1* 25,0% (3/12) versus 24,3% (58/239) e *CDKN2A* 16,7% (2/12) versus 24,3% (58/239), respectivamente. Para os demais genes, diferenças no número amostral avaliado nos dois grupos e da composição dos pacientes em relação a hábitos e exposições de risco ainda desconhecidos podem explicar as diferenças de frequência observadas.

Apesar do pequeno número de amostras avaliadas nesta etapa do estudo, com o intuito de descrever melhor os achados, realizamos a análise de associação entre a presença de mutações apenas nos 9 genes mutados tanto na nossa casuística quanto na coorte do TCGA e as características demográficas e clínicas a seguir: idade ao diagnóstico, sexo, uso do tabaco, status de etilismo, estágio T, estágio N e estadiamento clínico (Tabela 10 e 11). Apesar de não ter sido observada significância estatística, verificou-se que a maioria dos casos de pacientes fumantes ou ex-fumantes tinham mutação em qualquer um dos genes considerados (10/11, 90,9%; Teste Exato de Fisher p valor = 1,000) e que o gene *TP53*, candidato mais frequentemente mutado nessa população de estudo, estava mutado em 81,8% dos pacientes tabagistas enquanto que nenhum paciente não tabagista apresentou mutação nesse gene (9/11, 81,8% versus 1/0, 100,0%; Teste Exato de Fisher p valor = 0,250).

Tabela 10 - Resultados da associação entre o status do consumo de tabaco com o status de mutações genéticas somáticas (genes *CASP8*, *CDKN2A*, *FAT1* e *HLA-A*) nos pacientes com CEC de cavidade oral.

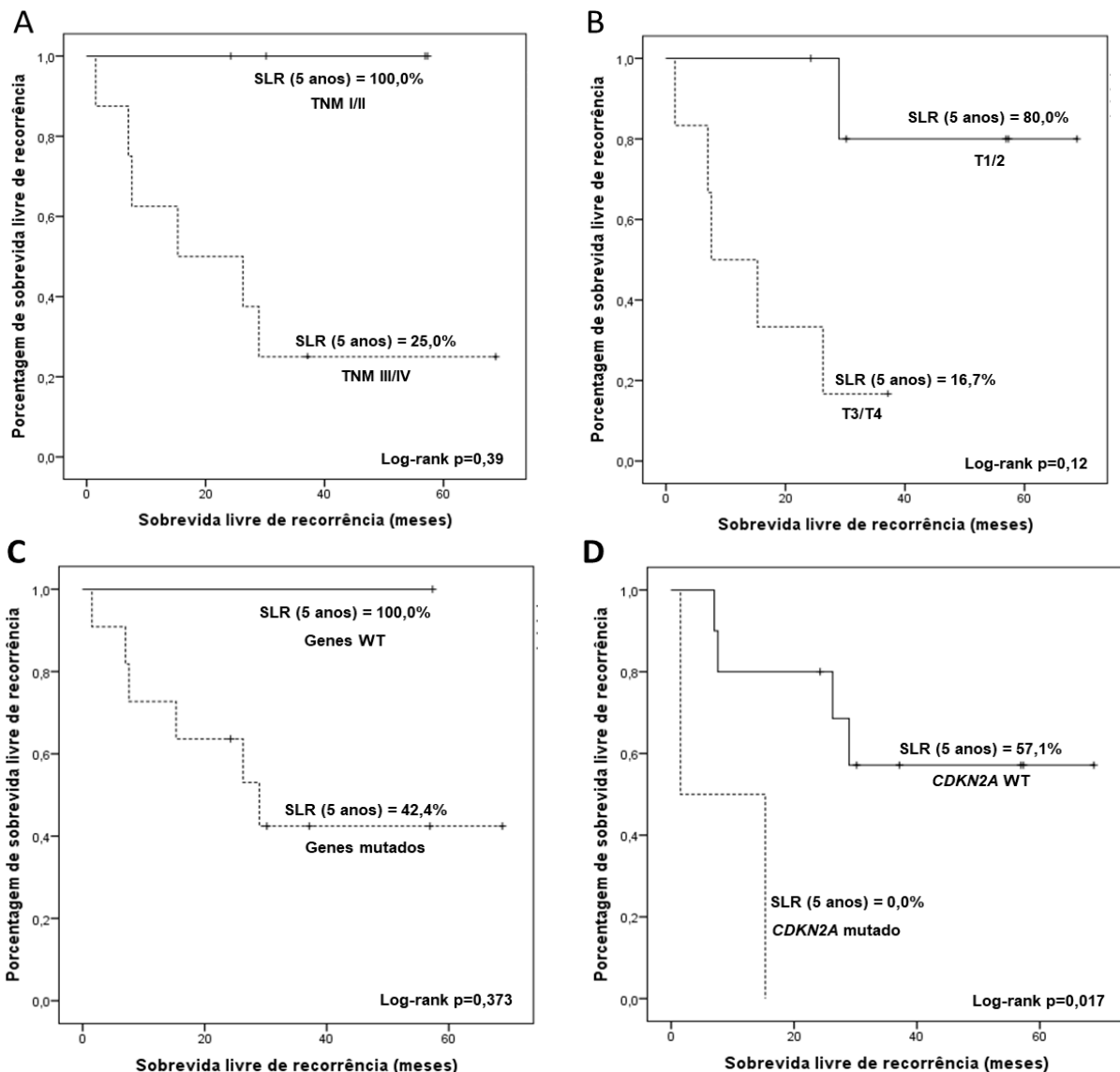
Características		Mutação de qualquer gene			Mutação de <i>CASP8</i>			Mutação de <i>CDKN2A</i>			Mutação de <i>FAT1</i>			Mutação de <i>HLA-A</i>		
		WT	Mutado	P	WT	Mutado	P	WT	Mutado	P	WT	Mutado	P	WT	Mutado	P
Idade ao diagnóstico	≤ 55 anos	0 (0,0%)	3 (100%)	1,000	3 (100,0%)	0 (0,0%)	1,000	3 (100,0%)	0 (0,0%)	1,000	3 (100,0%)	0 (0,0%)	0,509	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,455
	> 55 anos	1 (11,10%)	8 (88,90%)		8 (88,9%)	1 (11,1%)		7 (77,8%)	2 (22,2%)		6 (66,7%)	3 (33,3%)		8 (88,9%)	1 (11,1%)	
Estágio T	T1/T2	1 (16,7%)	5 (83,3%)	1,000	5 (83,3%)	1 (16,7%)	1,000	6 (100,0%)	0 (0,0%)	0,455	5 (83,3%)	1 (16,7%)	1,000	4 (66,7%)	2 (33,3%)	0,455
	T3/T4	0 (0,0%)	6 (100,0%)		6 (100,0%)	0 (0,0%)		4 (66,7%)	2 (33,3%)		4 (66,7%)	2 (33,3%)		6 (100,0%)	0 (0,0%)	
Estágio N	N0	1 (12,5%)	7 (87,5%)	1,000	7 (87,5%)	1 (12,5%)	1,000	7 (87,5%)	1 (12,5%)	1,000	5 (62,5%)	3 (37,5%)	0,491	6 (75,0%)	2 (25,0%)	0,515
	N+	0 (0,0%)	4 (100,0%)		4 (100,0%)	0 (0,0%)		3 (75,0%)	1 (25,0%)		4 (100,0%)	0 (0,0%)		4 (100,0%)	0 (0,0%)	
Estadiamento clínico	I/II	1 (25,0%)	3 (75,0%)	0,333	3 (75,0%)	1 (25,0%)	0,333	4 (100,0%)	0 (0,0%)	0,515	3 (75,0%)	1 (25,0%)	1,000	2 (50,0%)	2 (50,0%)	0,091
	III/IV	0 (0,0%)	8 (100,0%)		8 (100,0%)	0 (0,0%)		6 (75,0%)	2 (25,0%)		6 (75,0%)	2 (25,0%)		8 (100,0%)	0 (0,0%)	
Margens cirúrgicas comprometidas	Não	1 (12,5%)	7 (87,5%)	1,000	7 (87,5%)	1 (12,5%)	1,000	7 (87,5%)	1 (12,5%)	1,000	6 (75,0%)	2 (25,0%)	1,000	6 (75,0%)	2 (25,0%)	0,515
	Sim	0 (0,0%)	4 (100,0%)		4 (100,0%)	0 (0,0%)		3 (75,0%)	1 (25,0%)		3 (75,0%)	1 (25,0%)		4 (100,0%)	0 (0,0%)	
Infiltração perineural	Não	0 (0,0%)	7 (100,0%)	0,417	6 (85,7%)	1 (14,3%)	1,000	6 (85,7%)	1 (14,3%)	1,000	5 (71,4%)	2 (28,6%)	1,000	5 (71,4%)	2 (28,6%)	0,470
	Sim	1 (20,0%)	4 (80,0%)		5 (100,0%)	0 (0,0%)		4 (80,0%)	1 (20,0%)		4 (80,0%)	1 (20,0%)		5 (100,0%)	0 (0,0%)	
Invasão vascular	Não	1 (10,0%)	9 (90,0%)	1,000	9 (90,0%)	1 (10,0%)	1,000	8 (80,0%)	2 (20,0%)	1,000	7 (70,0%)	3 (30,0%)	1,000	8 (80,0%)	2 (20,0%)	1,000
	Sim	0 (0,0%)	2 (100,0%)		2 (100,0%)	0 (0,0%)		2 (100,0%)	0 (0,0%)		2 (100,0%)	0 (0,0%)		2 (100,0%)	0 (0,0%)	
Tabagismo	Não	0 (0,0)	1 (100,0)	1,000	0 (0,0)	1 (100,0)	0,083	1 (100,0)	0 (0,0)	1,000	0 (0,0)	1 (100,0)	0,250	1 (100,0)	0 (0,0)	1,000
	Sim/Ex	1 (9,1)	10 (90,9)		11 (100,0)	0 (0,0)		9 (81,8)	2 (18,2)		9 (81,8)	2 (18,2)		9 (81,8)	2 (18,2)	
Alcoolismo	Não	0 (0,0%)	2 (100,0%)	1,000	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0,167	2 (100,0%)	0 (0,0%)	1,000	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0,455	2 (100,0%)	0 (0,0%)	1,000
	Sim/Ex	1 (10,0%)	9 (90,0%)		10 (100,0%)	0 (0,0%)		8 (80,0%)	2 (20,0%)		8 (80,0%)	2 (20,0%)		8 (80,0%)	2 (20,0%)	
Recorrência	Não	1 (12,5%)	7 (87,5%)	1,000	7 (87,5%)	1 (12,5%)	1,000	7 (87,5%)	1 (12,5%)	1,000	6 (75,0%)	2 (25,0%)	1,000	6 (75,0%)	2 (25,0%)	0,515
	Sim	0 (0,0%)	4 (100,0%)		4 (100,0%)	0 (0,0%)		3 (75,0%)	1 (25,0%)		3 (75,0%)	1 (25,0%)		4 (100,0%)	0 (0,0%)	

Tabela 11 – Resultados da associação entre o status do consumo de tabaco com o status de mutações genéticas somáticas (genes *KMT2D*, *NFE2L2*, *NOTCH1*, *PIK3CA* e *TP53*) nos pacientes com CEC de cavidade oral.

Características		Mutação de <i>KMT2D</i>			Mutação de <i>NFE2L2</i>			Mutação de <i>NOTCH1</i>			Mutação de <i>PIK3CA</i>			Mutação de <i>TP53</i>		
		WT	Mutado	P	WT	Mutado	P	WT	Mutado	P	WT	Mutado	P	WT	Mutado	P
Idade ao diagnóstico	≤ 55 anos	1 (33,3%)	2 (66,7%)	0,236	3 (100,0%)	0 (0,0%)	1	2 (66,7%)	1 (33,3%)	0,455	3 (100,0%)	0 (0,0%)	1	1 (33,3%)	2 (66,7%)	1
	> 55 anos	7 (77,8%)	2 (22,2%)		8 (88,9%)	1 (11,1%)		8 (88,9%)	1 (11,1%)		8 (89,9%)	1 (11,1%)		2 (22,20%)	7 (77,80%)	
Estágio T	T1/T2	4 (66,7%)	2 (33,3%)	1	6 (100,0%)	0 (0,0%)	1	4 (66,7%)	2 (33,3%)	0,455	5 (83,3%)	1 (16,7%)	1	3 (50,0%)	3 (50,0%)	0,182
	T3/T4	4 (66,7%)	2 (33,3%)		5 (83,3%)	1 (16,7%)		6 (100,0%)	0 (0,0%)		6 (100,0%)	0 (0,0%)		0 (0,0%)	6 (100,0%)	
Estágio N	N0	6 (75,0%)	2 (25,0%)	0,547	8 (100,0%)	0 (0,0%)	0,333	7 (87,5%)	1 (12,5%)	1	7 (87,5%)	1 (12,5%)	1	2 (25,0%)	6 (75,0%)	1
	N+	2 (50,0%)	2 (50,0%)		3 (75,0%)	1 (25,0%)		3 (75,0%)	1 (25,0%)		3 (75,0%)	1 (25,0%)		1 (25,0%)	3 (75,0%)	
Estadiamento clínico	I/II	4 (100,0%)	0 (0,0%)	0,208	4 (100,0%)	0 (0,0%)	1	3 (75,0%)	1 (25,0%)	1	3 (75,0%)	1 (25,0%)	0,333	2 (50,0%)	2 (50,0%)	0,236
	III/IV	4 (50,0%)	4 (50,0%)		7 (87,5%)	1 (12,5%)		7 (87,5%)	1 (12,5%)		8 (100,0%)	0 (0,0%)		1 (12,5%)	7 (87,5%)	
Margens cirúrgicas comprometidas	Não	6 (75,0%)	2 (25,0%)	0,547	8 (100,0%)	0 (0,0%)	0,333	6 (75,0%)	2 (25,0%)	0,515	7 (87,5%)	1 (12,5%)	1	3 (37,5%)	5 (62,5%)	0,491
	Sim	2 (50,0%)	2 (50,0%)		3 (75,0%)	1 (25,0%)		4 (100,0%)	0 (0,0%)		4 (100,0%)	0 (0,0%)		0 (0,0%)	4 (100,0%)	
Infiltração perineural	Não	4 (57,1%)	3 (42,9%)	0,576	7 (100,0%)	0 (0,0%)	0,417	5 (71,4%)	2 (28,6%)	0,47	6 (85,7%)	1 (14,3%)	1	2 (28,6%)	5 (71,4%)	1
	Sim	4 (80,0%)	1 (20,0%)		4 (80,0%)	1 (20,0%)		5 (100,0%)	0 (0,0%)		5 (100,0%)	0 (0,0%)		1 (20,0%)	4 (80,0%)	
Invasão vascular	Não	7 (70,0%)	3 (30,0%)	1	10 (100,0%)	0 (0,0%)	0,167	8 (80,0%)	2 (20,0%)	1	9 (90,0%)	1 (10,0%)	1	3 (30,0%)	7 (70,0%)	1
	Sim	1 (50,0%)	1 (50,0%)		1 (50,0%)	1 (50,0%)		2 (100,0%)	0 (0,0%)		2 (100,0%)	0 (0,0%)		0 (0,0%)	2 (100,0%)	
Tabagismo	Não	1 (100,0)	0 (0,0)	1	1 (100,0)	0 (0,0)	1	0 (0,0)	1 (100,0)	0,167	1 (100,0)	0 (0,0)	1	1 (100,0)	0 (0,0)	0,25
	Sim/Ex	7 (63,6)	4(36,4)		10 (90,9)	1 (9,1)		10 (90,9)	1 (9,1)		10 (90,9)	1 (9,1)		2 (18,2)	9 (81,8)	
Alcoolismo	Não	2 (100,0%)	0 (0,0%)	0,515	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0,167	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0,318	2 (100,0%)	0 (0,0%)	1	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0,455
	Sim/Ex	6 (60,0%)	4 (40,0%)		1 (100,0%)	0 (0,0%)		9 (90,0%)	1 (10,0%)		9 (90,0%)	1 (10,0%)		2 (20,0%)	8 (80,0%)	
Recorrência	Não	6 (75,0%)	2 (25,0%)	0,547	8 (100,0%)	0 (0,0%)	0,333	6 (75,0%)	2 (25,0%)	0,515	7 (87,5%)	1 (12,5%)	1	3 (37,5%)	5 (62,5%)	0,491
	Sim	2 (50,0%)	2 (50,0%)		3 (75,%)	1 (25,0%)		4 (100,0%)	0 (0,0%)		4 (100,0%)	0 (0,0%)		0 (0,0%)	4 (100,0%)	

Foram construídas curvas de Kaplan-Meier para avaliar o impacto das mutações genéticas na sobrevida livre de recorrência (SLR) dos pacientes analisados. Dentre as características clínicas, somente o estadiamento TNM e o estadiamento T tiveram impacto na sobrevida livre de recorrência (Figura 21 A e B). Em relação às características moleculares, pacientes com mutação em qualquer um dos genes demonstraram uma diminuição na taxa de sobrevida (42,4% versus 100,0% para WT; log rank valor $p = 0,373$) (Figura 21 C). Mutações nos genes *CDKN2A* (0,0% versus 57,1% para WT; log rank valor $p = 0,017$) e *NFE2L2* (0,0% versus 51,9% para WT; log rank valor $p = 0,038$) tiveram uma associação clínica estatisticamente significativa com redução da sobrevida, *TP53* apresentou uma significância limítrofe (27,8% versus 100,0% para WT; log rank valor $p = 0,069$) e *NOTCH1*, (100,0% versus 36,0% para WT; log rank valor $p = 0,174$) (Figura 21 D, E, E, F e G).

Por conta do tamanho amostral, não foi possível realizar a análise multivariada da taxa de risco para recorrência.



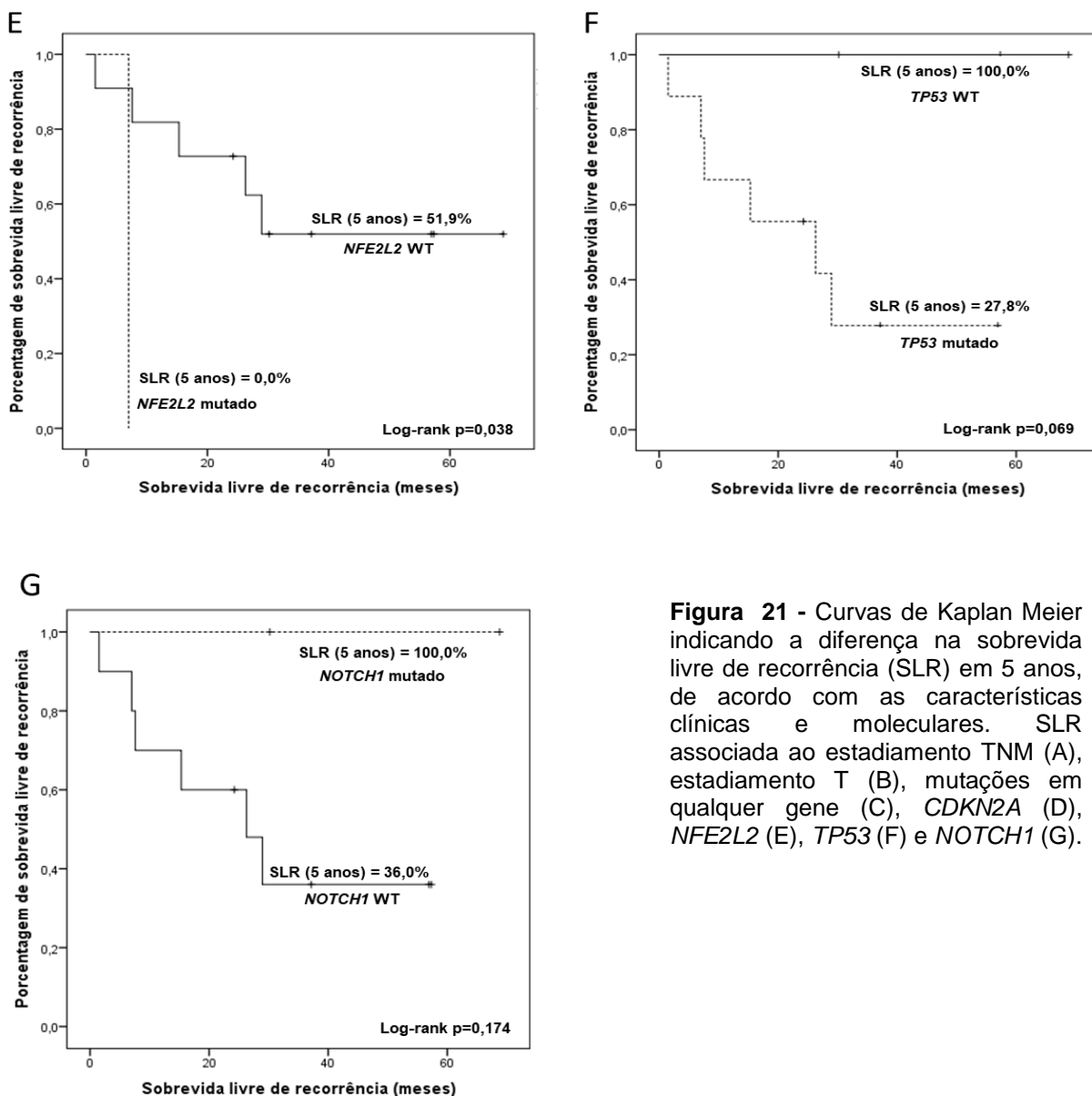


Figura 21 - Curvas de Kaplan Meier indicando a diferença na sobrevida livre de recorrência (SLR) em 5 anos, de acordo com as características clínicas e moleculares. SLR associada ao estadiamento TNM (A), estadiamento T (B), mutações em qualquer gene (C), *CDKN2A* (D), *NFE2L2* (E), *TP53* (F) e *NOTCH1* (G).

b) Amostras de lavado bucal de pacientes com CEC de cavidade oral

De todas as amostras mutadas na casuística desse estudo (n=12), 9 apresentaram mutações em dois genes incluídos no painel *TruSight Tumor 15* (Illumina Technologies, EUA), 9 tiveram mutações no gene *TP53* e uma apresentou mutação no gene *PIK3CA*. Sendo assim, selecionamos 4 destes casos para os testes de validação e detecção de variantes através da plataforma *Illumina MiSeq* (Illumina Technologies, EUA). Primeiramente foi realizada a validação do exoma nas amostras de tecido tumoral congelado e todas as variantes encontradas previamente foram identificadas através desse painel. Após a validação, também foi avaliada a possibilidade de detecção dessas variantes nas amostras de lavado bucal desses mesmos pacientes, entretanto conseguimos detectar apenas a variante somática de

uma amostra de fluido conforme indicado na tabela 12.

Tabela 12 – Resultado da validação do exoma e detecção de mutação em amostras de pacientes com CEC de cavidade oral (n=4).

Amostra	Gene	Variante	T	N	M	Validação em tecido	Deteção em saliva
ESO-03	TP53	c.524G>A	T4a	N0	M0	Sim	Sim
ESO-04	TP53	c.832C>A	T3	N0	M0	Sim	Não
ESO-05	TP53	c.658_660delTAT c.659A>G	T4a	N1	M0	Sim	Não
ESO-08	TP53	c.730G>T	T2	N2c	M0	Sim	Não

Diante desses resultados, em que não foi possível a detecção das variantes em 3 das 4 amostras de lavado bucal testadas, decidimos não prosseguir com o teste utilizando as 5 amostras restantes, visto que a performance do painel foi insatisfatória quando utilizada com esta finalidade.

5.4 Avaliação da presença de mutação em amostras de CEC de orofaringe

5.4.1 Caracterização da população

Foram selecionados 51 pacientes com câncer de orofaringe para esta etapa do estudo. De acordo com a tabela 13, é possível observar que a maioria dos indivíduos era do sexo masculino (98,0%), com idade variando de 35 a 76 anos (mediana = 55 anos). Aproximadamente 86% dos pacientes eram tabagistas e 96% eram etilistas. O status de HPV foi determinado pela detecção da expressão da proteína p16, sendo 35,3% dos pacientes considerados positivos para a infecção do vírus do papiloma humano.

A maioria dos pacientes apresentou doença avançada ao diagnóstico (96,1%), tumores com maior profundidade de invasão (T3 / T4; 37/51, 72,5%) e linfonodos clinicamente positivos ao diagnóstico (N +; 45/51, 88,2%). A maioria dos pacientes foi tratada com quimioterapia à base de platina concomitante à radioterapia entre os anos de 2009 e 2017. O seguimento médio desses pacientes foi de 26 meses (variando de 1 a 86 meses) e 44,3% dos indivíduos estavam vivos em 5 anos. A

presença de recorrência ocorreu em 14 pacientes (27,5%).

Tabela 13 - Características clínicas e patológicas dos pacientes com CEC de orofaringe avaliados nesta etapa do estudo (n=51).

Características	Número de casos	%
Gênero		
Masculino	50	98,0
Feminino	1	2,0
Idade		
≤ 55 anos	26	51,0
> 55 anos	25	49,0
Status de tabagismo		
Não	7	13,7
Sim ou ex	44	86,3
Status de etilismo		
Não	2	4,0
Sim ou ex	48	96,0
HPV status		
Negativo	33	64,7
Positivo	18	35,3
T estágio		
T1/T2	14	27,5
T3/T4	37	72,5
N estágio		
N0	6	11,8
N+	45	88,2
Estadiamento		
I/II – inicial	2	3,9
III/IV – avançado	49	96,1
Resposta ao tratamento		
Respondedor	19	38,8
Não-respondedor	30	61,2
Recorrência		
Não	37	72,5
Sim	14	27,5
Status		
Vivo sem doença	25	49,0
Vivo com doença	3	5,9
Morte por câncer	23	45,1

a) Amostras de tecido de CEC de orofaringe

Foi realizada a busca por mutações somáticas na região codificadora de genes através de um painel de 15 genes pela técnica de sequenciamento de nova geração na plataforma *Ion Torrent PGM* (Life Technologies, EUA) nas amostras FFPE.

Os resultados do sequenciamento foram processados no *Ion PGM Torrent Server*. Após checagem dos parâmetros de qualidade do sequenciamento, e etapas de filtragem, conforme descrito no tópico de métodos, foram consideradas apenas variantes não sinônimas, com VAF > 10%, e previamente relatadas pelo TCGA em tumores de cabeça e pescoço e/ou no COSMIC.

Foi identificado um total de 132 variantes (Anexo E), com uma média de 2,59 variantes por amostra (variando de 1 a 30). A maioria das variantes foi classificada como missense (113/132; 88,6%), seguida por variantes *nonsense* (16/132; 12,1%) e frameshift (3/132; 2,3%). Encontramos uma média de 2,64 (variando de 1 a 11) genes mutados por amostra e a maioria dos pacientes (31/51; 61%) sofreram mutação em pelo menos um dos genes testados: 16/31 (51,6%) tiveram apenas um gene mutado, 10/31 (32,3%) tiveram entre 2 e 5 genes mutados e 5/31 (16,1%) tiveram mais de 5 genes mutados. A frequência de amostras mutadas por gene foi a seguinte: 45,1% (23/51) para *TP53*, 21,6% (11/51) para *NOTCH1*, 17,6% (9/51) para *FAT1*, 13,7% (7/51) para *NSD1*, 11,8% (6/51) para *CDKN2A*, 9,8% (5/51) para *RB1*, 7,8% (4/51) para *KMT2D*, *PTEN* e *PIK3CA*, 5,9% (3/51) para *HRAS*, 3,9% (2 / 51) para *IRF6* e *FBXW7* e 2,0% (1/51) para *EZH2* (Figura 22). Nenhum dos pacientes apresentou mutações para *CASP8* e *TP63*.

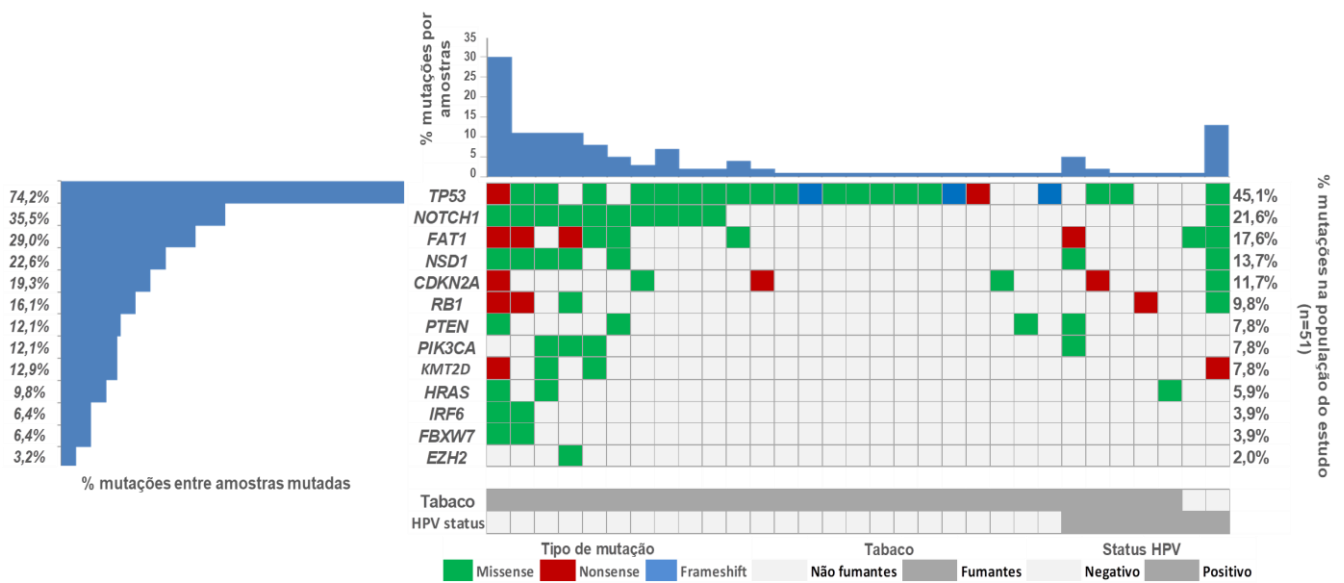


Figura 22 - Diagrama descrevendo os diferentes tipos de mutações e suas frequências observadas nas amostras de CEC de orofaringe avaliadas. Os genes (localizados nas linhas) são classificados de acordo com a frequência de mutações nas amostras mutadas (n=31; representadas no painel esquerdo) e em toda a população do estudo (n=51; painel direito). As amostras (localizadas nas colunas) são classificadas de acordo com o uso do tabaco e o status do HPV. As barras acima do gráfico representam o número de mutações por amostra. As cores indicam o tipo de mutação, status de tabagismo e status de infecção pelo HPV.

Pôde-se observar que o número médio de variantes foi maior nas amostras HPV-negativas do que nas amostras HPV-positivas ($3,27 \pm 5,854$ versus $1,33 \pm 3,162$; p valor = 0,105) (Figura 23). Além disso, a maioria dos casos mutados foram negativos para HPV (24/33, 77,4% versus 7/18, 22,6% para HPV - positivos; qui-quadrado p valor = 0,018).

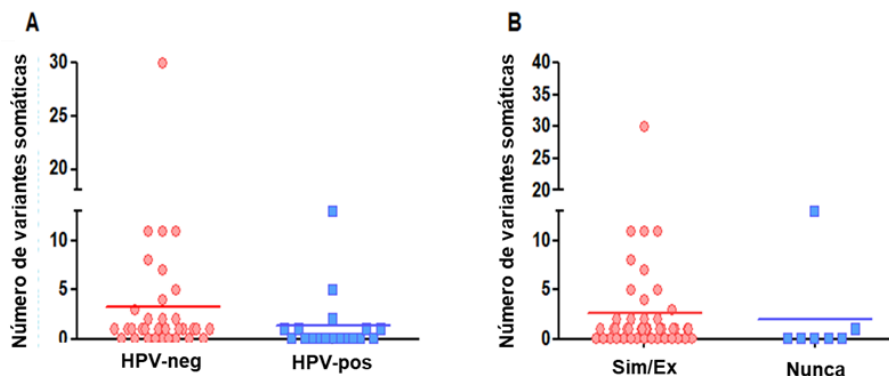


Figura 23 - Número de variantes somáticas identificadas nas amostras testadas de acordo com o status do HPV (A) e o uso do tabaco (B).

Os genes frequentemente associados à carcinogênese dos tumores de cabeça

e pescoço induzida pelo uso do tabaco apresentaram uma menor frequência de mutações nos casos HPV - positivos (Tabela 14): 1/11 (10,0%; p valor = 0,077) para *NOTCH1*, 2/6 (33,3%, p valor = 1.000) para *CDKN2A*, 3/9 (33,3%; p valor = 1.000) para *FAT1* e 3/23 (13,0%; p valor = 0,003) para *TP53* (Figura 20). Dos sete casos HPV - positivos que apresentaram mutações, cinco eram fumantes ou ex-fumantes, e apenas 1/18 (5,6%) apresentou mutação no gene *PIK3CA*, que normalmente se apresenta mutado nesse tipo tumoral induzido pelo HPV (Figura 22).

Quando analisada a associação entre a presença de mutações e o status de tabagismo, o número médio de variantes foi maior nos fumantes ou ex-fumantes, quando comparado aos que nunca fumaram ($2,68 \pm 5,206$ versus $2,00 \pm 4,668$ para os que nunca fumaram; p valor = 0,979) (Figura 23). A maioria dos casos que sofreram mutação em pelo menos um dos genes testados era fumante ou ex-fumante (29/31, 93,5% versus 2/31, 6,5% para nunca fumantes; Teste Exato de Fisher p valor = 0,096). Os genes comumente associados à carcinogênese dos CECP induzida pelo uso do tabaco foram mais frequentemente mutados em fumantes ou ex-fumantes (Tabela 14): 7/9 (77,8%; p valor = 1.000) para *FAT1*, 5/6 (83,3%; p valor = 1.000) para *CDKN2A*, 10/11 (90,9%; p valor = 0,592) para *NOTCH1* e 22/23 (95,7%; p valor = 0,112) para *TP53* (Figura 22).

Tabela 14 - Resultados da associação entre o status do HPV e o uso do tabaco com o status de mutações genéticas somáticas nos pacientes com CEC de orofaringe.

Genes		HPV status			Consumo de tabaco		
		Negativo	Positivo	p-valor	Não	Sim/Ex	p-valor
Qualquer gene	WT	9 (45,0)	11 (55,0)	0,018*	5 (25,0)	15 (75,0)	0,096
	Mutado	24 (77,4)	7 (22,6)		2 (6,5)	29 (93,5)	
CDKN2A	WT	29 (64,4)	16 (35,6)	1,000	6 (13,3)	39 (86,7)	1,000
	Mutado	4 (66,7)	2 (33,3)		1 (16,7)	5 (83,3)	
FAT1	WT	27 (64,3)	11 (57,9)	1,000	5 (11,9)	37 (88,1)	0,592
	Mutado	6 (66,7)	3 (33,3)		2 (22,2)	7 (77,8)	
NOTCH1	WT	23 (78,5)	17 (42,5)	0,072	6 (15,0)	34 (85,0)	1,000
	Mutado	10 (90,9)	1 (9,1)		1 (9,1)	10 (90,9)	
PIK3CA	WT	30 (63,8)	17 (36,2)	1,000	7 (14,9)	40 (85,1)	1,000
	Mutado	3 (75,0)	1 (25,0)		0 (0,0)	4 (100,0)	
TP53	WT	13 (46,4)	15 (53,6)	0,003*	6 (21,4)	22 (78,6)	0,112
	Mutado	20 (87,0)	3 (13,0)		1 (4,3)	22 (95,7)	

* Resultados obtidos pelo teste exato de Fisher, exceto * que foram obtidos com o teste do qui-quadrado.

A associação entre a presença de mutações nos genes avaliados e as seguintes características demográficas e clínicas também foi avaliada: idade ao diagnóstico, sexo, status de etilismo, estágio T, estágio N e estadiamento clínico. De acordo com os resultados, a única associação estatisticamente significativa encontrada foi entre a presença de mutação no gene *NOTCH1* e o tamanho do tumor: todos os tumores com mutação em *NOTCH1* (11/11; p valor = 0,023) apresentaram maior profundidade de invasão (T3/T4).

Curvas de Kaplan-Meier foram construídas com o objetivo de avaliar o impacto das mutações genéticas na sobrevida livre de recorrência dos pacientes analisados. Apesar da ausência de significância estatística, a presença de mutação em pelo menos um dos genes testados mostrou uma diminuição na sobrevida livre de recorrência (47,8% versus 80,5%; log rank p valor = 0,144), que também foi identificada na presença de mutações no gene *TP53* (42,6% versus 75,9% para WT; log rank valor p = 0,137)

As mutações no gene *PTEN* diminuíram significativamente a sobrevida livre de recorrência (25,0% versus 64,5% no WT; log rank p valor = 0,045), mas o risco estimado pela regressão de Cox não foi estatisticamente significante (HR 95% IC =

0,936-12,630; Regressão de Cox $p = 0,063$) (Figura 24 e 25, Tabela 15).

Com relação ao gene *NOTCH1*, a presença de mutação levou a uma diminuição significativa da sobrevida livre de recorrência (SLR) (25,1% versus 68,2% para WT; log rank p valor = 0,032), além de apresentar um risco de recorrência de 2,982 para os casos mutados (HR 95% IC = 1,029-8,644; Regressão de Cox $p = 0,044$) (Tabela 15, Figura 24 e 25).

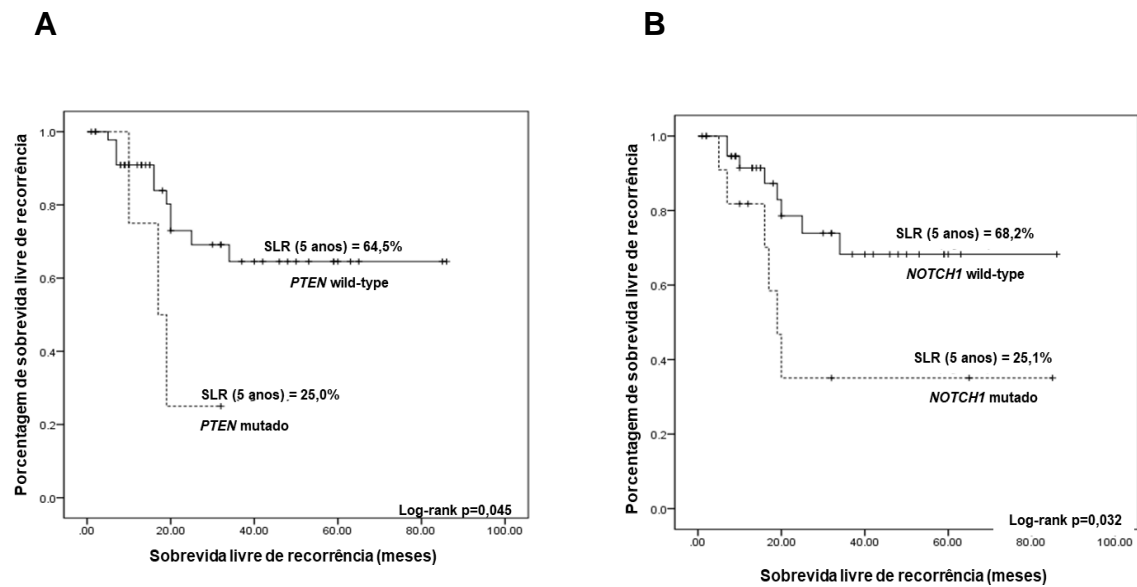


Figura 24 - Curvas de Kaplan Meier indicando a diferença na sobrevida livre de recorrência (SLR) em 5 anos, de acordo com o status da mutação no gene *PTEN* e *NOTCH1*.

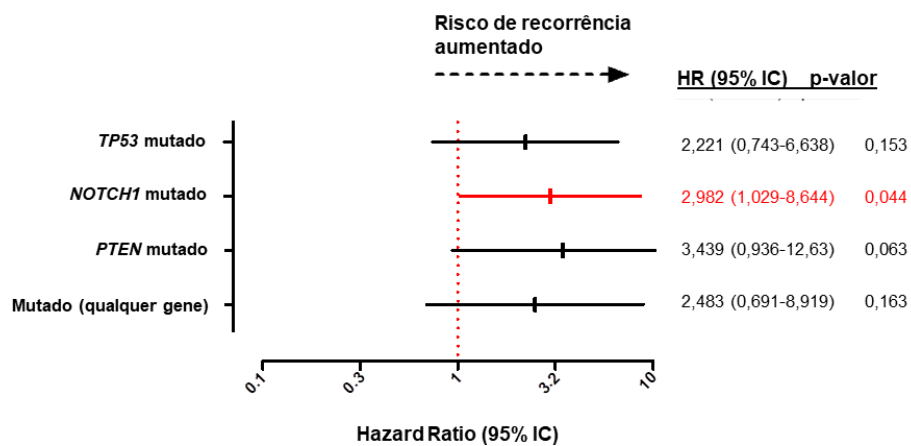


Figura 25 - *Forest plot* com os valores do Hazard Ratio e IC 95% para as alterações moleculares selecionadas (p -valor foi obtido através do teste de regressão de Cox).

Tabela 15 - Relação entre a taxa de sobrevida livre de recorrência em 5 anos e as características clínicas e moleculares dos pacientes com CEC de orofaringe.

Características	Número de casos	Número de eventos	Sobrevida livre de recorrência em 5 anos	p-valor (log-rank)
HPV status				
Negativo	33	11	48,8%	0,082
Positivo	18	3	75,5%	
Status de Tabagismo				
Não	7	0	100,0%	0,045
Sim/ex	44	14	50,2%	
Status de mutação (qualquer gene)				
WT	20	3	80,5%	0,144
Mutado	31	11	47,8%	
Status <i>PTEN</i>				
WT	47	11	64,5%	0,045
Mutado	4	3	25,0%	
Status <i>NOTCH1</i>				
WT	40	8	25,1%	0,032
Mutado	11	6	68,2%	
Status <i>TP53</i>				
WT	28	5	75,9%	0,137
Mutado	23	9	42,6%	

A tabela 16 e a figura 26 representam a comparação das frequências de mutações dos 15 genes entre as 51 amostras de CEC de orofaringe avaliadas neste estudo e 39 amostras de CEC de orofaringe analisadas pelo TCGA. Os dados referentes aos status de HPV (por p16-IHC e/ou hibridização in situ), tabagismo e de mutação das amostras do TCGA foram obtidos a partir do banco de dados Xena, assim como foi feito com os dados sobre mutações em CEC de cavidade oral desse estudo. Dos 39 casos de CEC de orofaringe do TCGA, 79,5% (31/39) eram HPV-positivos e 69,2% (26/39) eram fumantes. Portanto, nossa coorte teve uma taxa consideravelmente menor de casos positivos (35,3%, 18/51) para HPV em

comparação com esse conjunto de pacientes do estudo TCGA, porém obtivemos uma maior prevalência de indivíduos fumantes na nossa casuística (86,3%, 44/51).

No conjunto de pacientes do TCGA, 64,1% (25/39) das amostras apresentaram mutação em pelo menos 1 dos genes testados, sendo uma taxa muito semelhante à que observamos em nossa coorte (31/51; 61,0%). Dentre os 15 genes avaliados, *TP53* foi o mais frequentemente mutado (9/39; 23,1%) seguido por *PIK3CA* (8/39; 20,5%), *RB1* (5/39; 12,8%), *KMT2D* (4/39; 10,3%), *NOTCH1* e *NSD1* (3/39; 7,7%), *FAT1*, *FBXW7* e *PTEN* (2/39; 5,1), e *CDKN2A* (1/39; 2,6%). Não foram observadas mutações em *CASP8*, *EZH2*, *HRAS*, *IRF6* e *TP63* (Tabela 16 e Figura 26).

Sendo assim, verificamos que a frequência das amostras mutadas foi semelhante nas duas coortes para alguns genes, conforme descrito anteriormente, porém foram observadas diferenças significativas nas frequências de mutação para alguns genes específicos. Os genes comumente associados à carcinogênese dos CECIP induzida por tabaco (*TP53*, *NOTCH1*, *FAT1* e *CDKN2A*) foram menos frequentemente mutados nas amostras de TCGA, enquanto que o gene *PIK3CA*, geralmente associado a carcinogênese induzida pelo HPV, obteve uma taxa de mutação consideravelmente maior no estudo do TCGA do que no presente estudo. Isso parece concordar com a maior prevalência de casos positivos para HPV na coorte de TCGA. Não observamos diferenças significativas entre as duas coortes quanto às frequências de mutação nos outros genes, exceto para os genes *EZH2*, *HRAS* e *IRF6*, mutados apenas na nossa casuística, mas em frequência baixa.

Tabela 16 - Análise comparativa das frequências das mutações nos 15 genes do painel entre as casuísticas de CEC de orofaringe desse estudo e do TCGA (coorte estendida).

Nome do gene	TCGA	Este estudo	TCGA	Este estudo	TCGA	Este estudo
	n = 39	n = 51	(HPV+) n= 31	(HPV+) n = 18	(HPV-) n= 8	(HPV-) n = 33
<i>CASP8</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%
<i>CDKN2A</i>	2,56%	11,76%	0,00%	11,11%	12,50%	12,12%
<i>EZH2</i>	0,00%	1,96%	0,00%	0,00%	0,00%	6,06%
<i>FAT1</i>	5,13%	17,65%	0,00%	16,67%	25,00%	18,18%
<i>FBXW7</i>	5,13%	3,92%	6,45%	0,00%	0,00%	6,06%
<i>HRAS</i>	0,00%	5,88%	0,00%	5,56%	0,00%	6,06%
<i>IRF6</i>	0,00%	3,92%	0,00%	0,00%	0,00%	6,06%
<i>KMT2D</i>	10,26%	7,84%	12,90%	5,56%	0,00%	9,09%
<i>NOTCH1</i>	7,69%	21,57%	6,45%	5,56%	12,50%	30,30%
<i>NSD1</i>	7,69%	13,73%	3,23%	11,11%	25,00%	15,15%
<i>PIK3CA</i>	20,51%	7,84%	16,13%	5,56%	37,50%	9,09%
<i>PTEN</i>	5,13%	7,84%	6,45%	5,56%	0,00%	9,09%
<i>RB1</i>	12,82%	9,80%	12,90%	11,11%	12,50%	9,09%
<i>TP53</i>	23,08%	45,10%	3,23%	16,67%	100,00%	60,61%
<i>TP63</i>	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

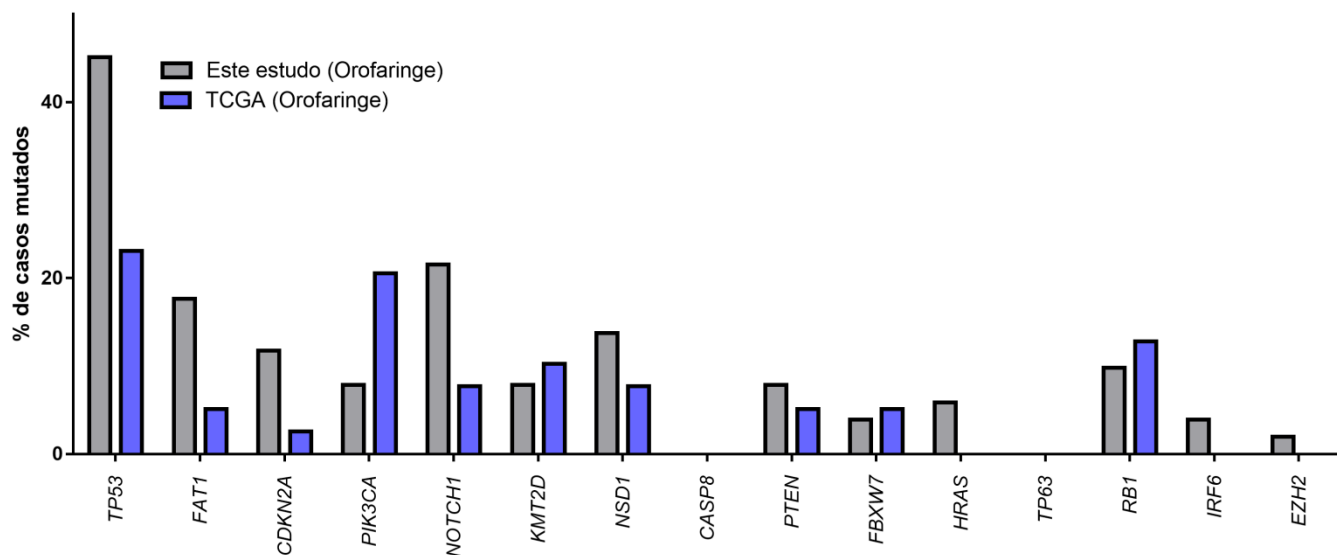


Figura 26 - Comparação da frequência das mutações encontradas nos 15 genes do painel em indivíduos com CEC de orofaringe do TCGA (n= 39) e desse estudo (n= 51), independente do status de HPV. De acordo com o gráfico, a barra de cor cinza indica as frequências de mutações nos pacientes desse estudo e a barra de cor azul indica as frequência de mutações nos pacientes do TCGA.

As figuras 27 e 28 representam as frequências de mutação dos mesmos 15 genes nos pacientes com CEC de orofaringe HPV-negativos (Este estudo n = 33;

TCGA n = 8; Figura 28) e HPV-positivos (Este estudo n = 18; TCGA n = 31; Figura 27) separadamente. A comparação das amostras HPV-positivas mostram que os genes associados à via de carcinogênese do tabaco estavam mais frequentemente mutados nos casos avaliados neste estudo: *TP53*, 16,7% versus 3,2%; *FAT1*, 16,7% versus 0,0%; e *CDKN2A* 11,1% versus 0,0%. Por outro lado, a frequência de mutações em *PIK3CA* foi maior nos casos do TCGA (5,6% versus 16,1%). Este resultado corrobora com a maior prevalência de tumores associados ao tabaco nas amostras avaliadas neste estudo. Quando avaliamos os casos HPV-negativos, exceto pelo gene *TP53*, que estava mutado em todos os casos do TCGA (8/8) e apresentou uma frequência de mutação de 60,6% nos casos de Barretos, os genes *FAT1* e *CDKN2A* apresentaram frequências de mutação muito similares nas duas coortes. Diferenças nos números de casos entre as coortes podem explicar a diferente taxa de casos mutados para *TP53* e para os outros genes observados.

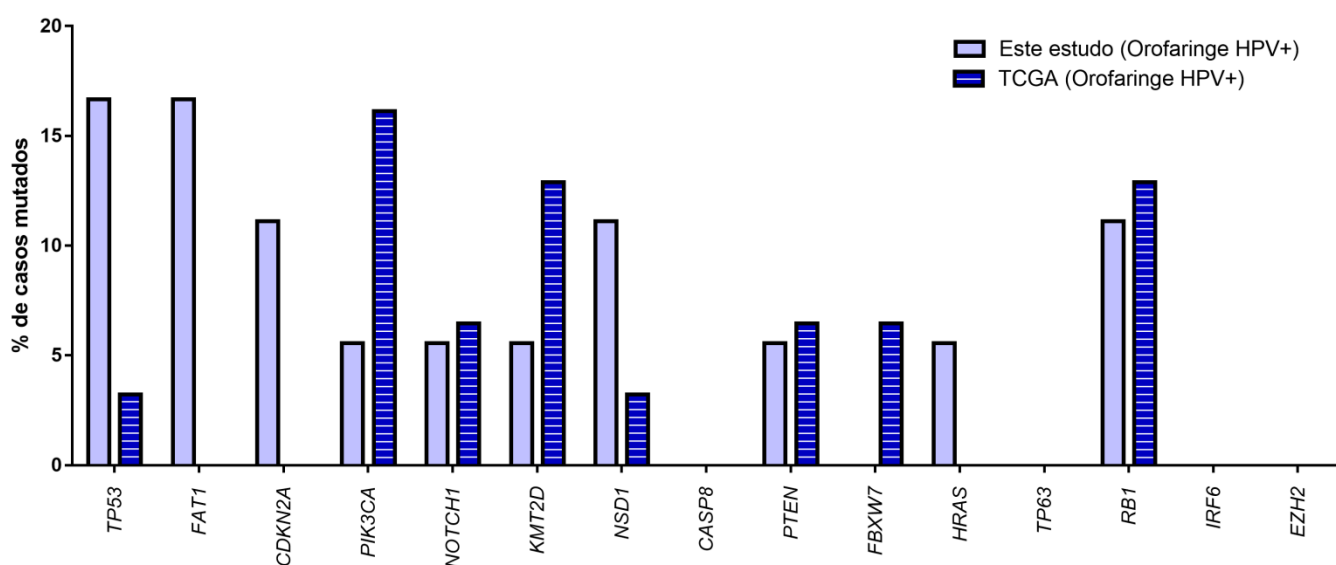


Figura 27 - Comparação da frequência das mutações encontradas nos 15 genes do painel apenas em indivíduos com CEC de orofaringe HPV-positivos incluídos na casuística estendida do TCGA (n = 31) e desse estudo (n = 18). As barras de cor azul claro correspondem a este estudo e as barras listradas de cor azul escuro equivalem a casuística estendida do TCGA.

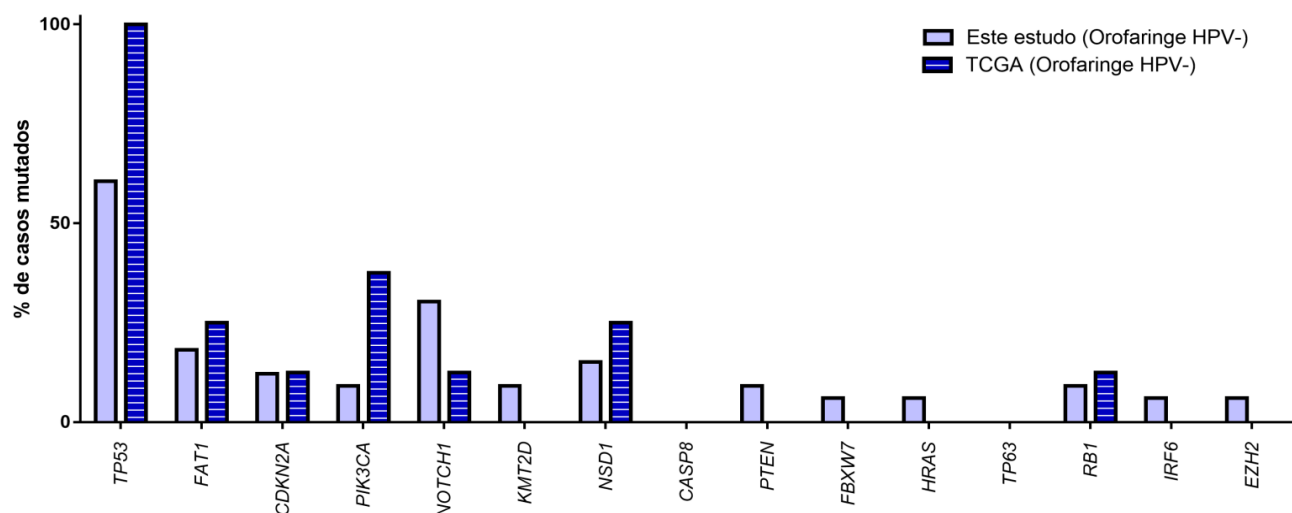


Figura 28 - Comparação da frequência das mutações encontradas nos 15 genes do painel apenas em indivíduos com CEC de orofaringe HPV-negativos incluídos na casuística estendida do TCGA (n = 8) e desse estudo (n = 33). As barras de cor azul claro correspondem a este estudo e as barras listradas de cor azul escuro equivalem a casuística estendida do TCGA.

Ao verificar se as mutações no oncogene *PIK3CA* detectadas em ambas as coortes de pacientes com CEC de orofaringe ocorreram no domínio helical (Tabela 17), frequentemente alvo na carcinogênese induzida por HPV, observamos que dos quatro pacientes deste estudo que tiveram mutações em *PIK3CA*, apenas o único caso HPV-positivo apresentou mutação neste domínio. Quanto à casuística do TCGA, dos 8 pacientes mutados para *PIK3CA*, 5 tinham mutação no domínio helical, 4 eram HPV-positivos e 1 era HPV negativo.

Tabela 17 – Descrição dos tipos de mutações no gene *PIK3CA* detectadas nas amostras HPV-positivas e HPV-negativas dos pacientes com CEC de orofaringe deste estudo (HCB) (HPV-positivas n = 1; HPV=negativas n = 3) e do estudo do TCGA (TCGA) (HPV-positivas n = 5; HPV=negativas n = 3).

Estudo	ID da amostra	Status HPV	Mutação em <i>PIK3CA</i>	Domínio Helical
TCGA	TCGA-BA-A8YP-01	Negativo	C420R	NÃO
TCGA	TCGA-BA-A8YP-01	Negativo	E418K	NÃO
TCGA	TCGA-BA-A4IF-01	Negativo	V71L	NÃO
TCGA	TCGA-T2-A6WZ-01	Negativo	E545K	SIM
TCGA	TCGA-TN-A7HI-01	Positivo	E542K	SIM
TCGA	TCGA-CR-7404-01	Positivo	E545K	SIM
TCGA	TCGA-CR-6487-01	Positivo	E545K	SIM
TCGA	TCGA-CN-A6V1-01	Positivo	E81K	NÃO
TCGA	TCGA-MZ-A6I9-01	Positivo	E545K	SIM
HCB	BO-22	Negativo	R916H	NÃO
HCB	BO-22	Negativo	R108C	NÃO
HCB	BO-13	Negativo	G1049S	NÃO
HCB	BO-06	Negativo	N345K	NÃO
HCB	BO-06	Negativo	G1049S	NÃO
HCB	ORO-13	Positivo	E545K	SIM

a) Amostras de plasma de pacientes com CEC de orofaringe

Apesar de a caracterização genética das amostras de tecido tumoral de CEC de orofaringe ter sido realizada em amostras provenientes de pacientes tratados no Hospital de Câncer de Barretos, não foi possível realizar a análise de detecção das variantes encontradas nestas amostras.

Sendo assim, o teste de detecção no plasma foi realizado em uma coorte de amostras disponibilizadas pelo Grupo de Pesquisa de Tumores de Cabeça e Pescoço, liderado pelo Dr. Stefan Martin Willems da *University Medical Center* (UMC, Utrecht - Holanda), onde realizei o estágio com Bolsa de Pesquisa no Exterior (BEPE) disponibilizada pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Para este teste, foram selecionadas as variantes mais representativas do gene *TP53* encontradas em amostras tumorais de pacientes com CEC de cabeça e pescoço tratados no UMC em Utrecht. Para essa seleção, o status de patogenicidade de todas as variantes foi confirmado manualmente na base de dados ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) e IARC (<http://p53.iarc.fr/>), sendo que somente as variantes classificadas como patogênicas foram selecionadas. Além disso, apenas as variantes com frequência alélica acima de 5% foram selecionadas. Desta forma, foram selecionados 3 pacientes com mutações no gene *TP53* (variantes c.527G>T, c.527G>A e c.919+1G>T) identificadas no Departamento de Diagnóstico do UMC através da técnica de NGS, e com amostras de plasma coletadas no seguimento disponíveis.

Inicialmente, foi realizada uma etapa de otimização dos ensaios de detecção de mutação das 3 variantes através da utilização de amostras de FFPE sabidamente positivas (controles positivos - CP) e negativas (controles negativos – NC) para estas variantes do gene *TP53*. Foi realizado um ensaio de gradiente de temperatura para a determinação das temperaturas de anelamento, utilizando 10 ng de DNA de amostras com mutação para cada variante como controle positivo da reação, e água como controle negativo (NTC; *No Template Control*).

Foram incluídas quatro amostras positivas para a primeira variante, 3 amostras positivas para a segunda variante e 1 amostra positiva para a terceira variante. Uma amostra positiva para cada variante foi selecionada para realizar a etapa de seleção de temperatura. A temperatura ótima escolhida para os 3 genes foi 55 °C, pois possuía uma quantidade significativa de droplets e também uma melhor separação

entre elas, capaz de diferenciar entre gotículas negativas e positivas (Figura 29).

Em seguida, foi realizado o teste de especificidade para cada ensaio utilizando as mesmas amostras de FFPE com mutação no gene *TP53* (Figura 30), mostrando a alta capacidade do ensaio em detectar apenas o DNA mutado para cada variante específica. Vale destacar que as variantes dos ensaios 1 e 2 ocorrem na mesma região do gene, apresentando diferença apenas entre as trocas de nucleotídeos, por isso observa-se a presença de algumas droplets falso-positivas.

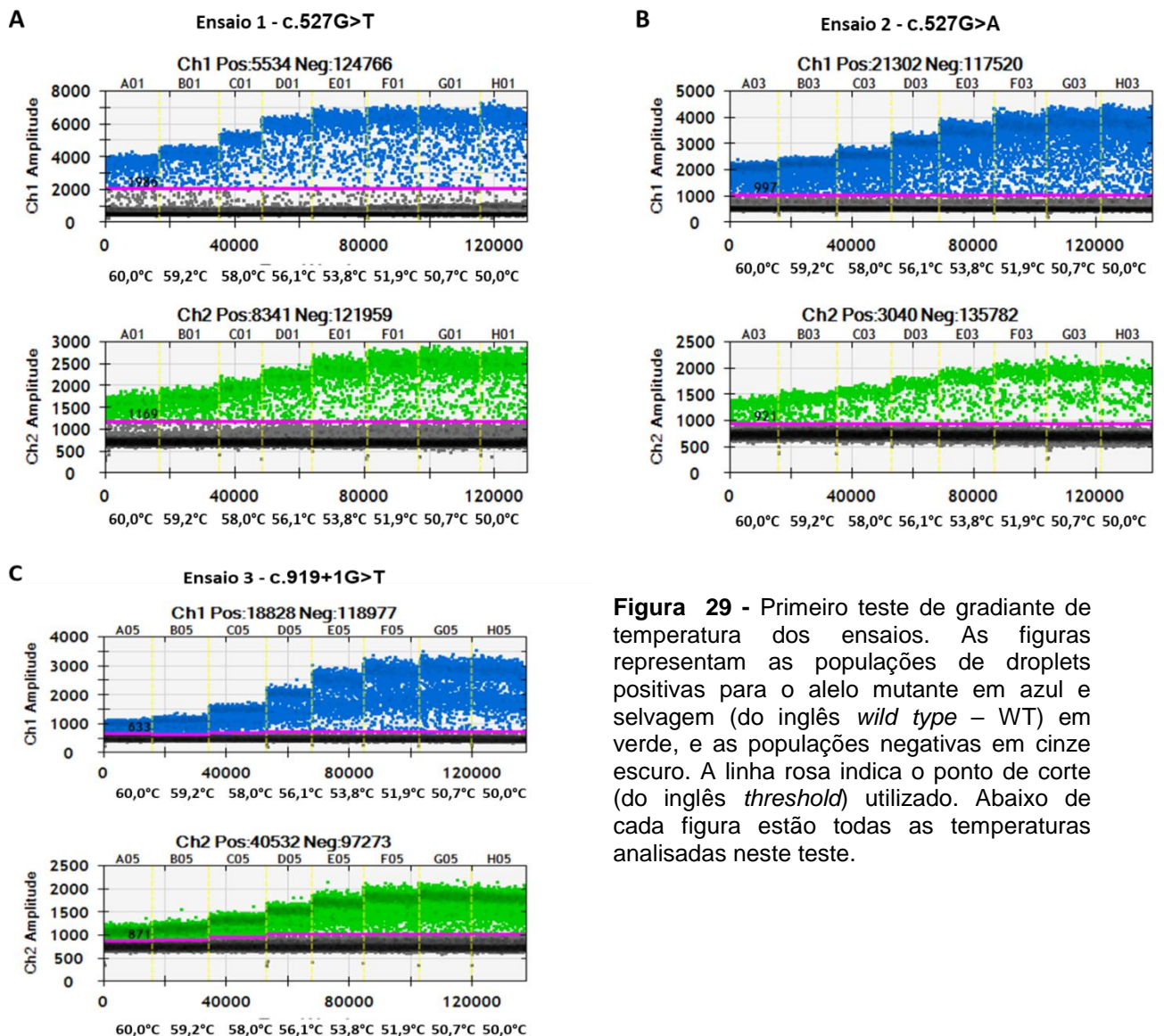


Figura 29 - Primeiro teste de gradiente de temperatura dos ensaios. As figuras representam as populações de droplets positivas para o alelo mutante em azul e selvagem (do inglês *wild type* – WT) em verde, e as populações negativas em cinze escuro. A linha rosa indica o ponto de corte (do inglês *threshold*) utilizado. Abaixo de cada figura estão todas as temperaturas analisadas neste teste.

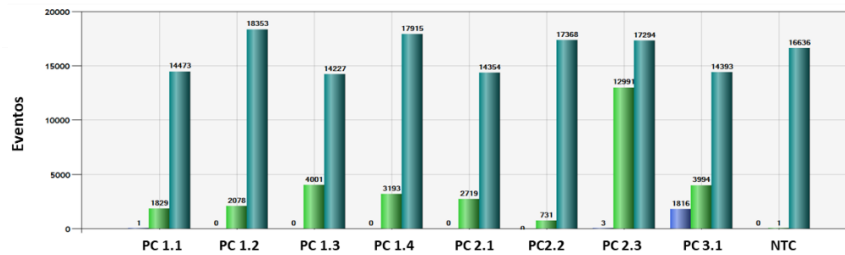
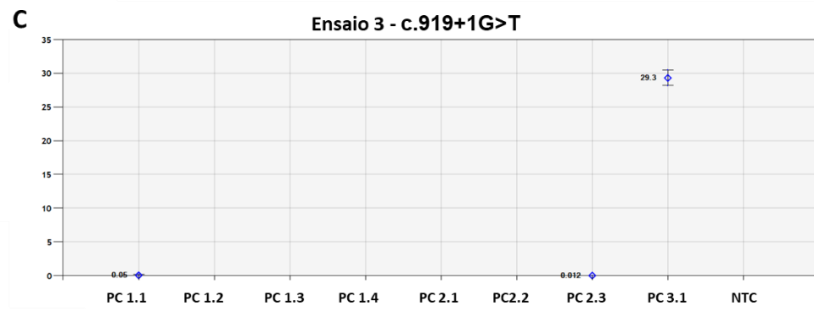
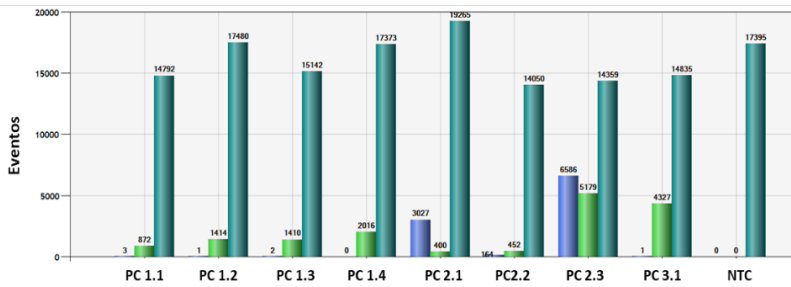
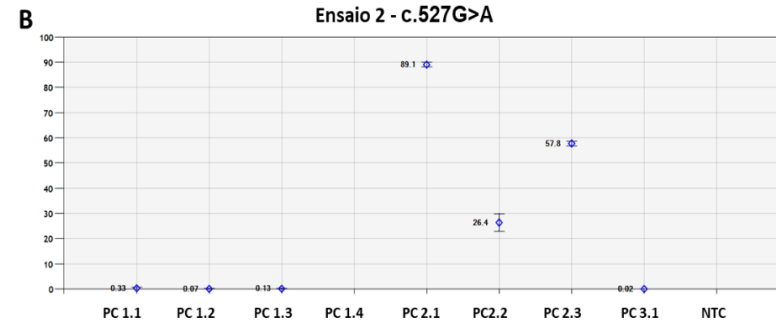
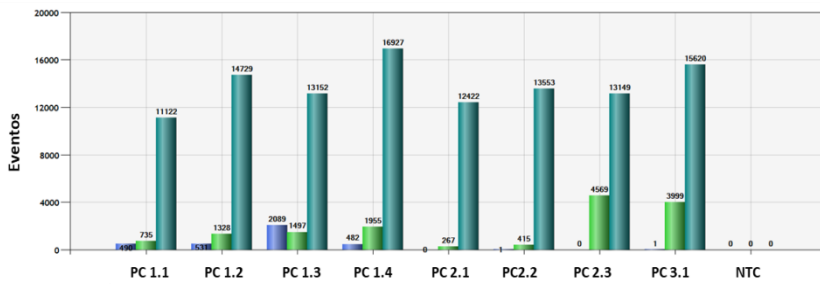
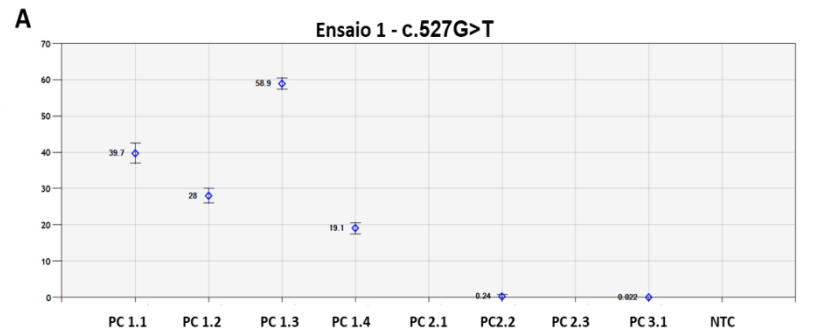


Figura 30 - Primeiro teste de especificidade dos ensaios. As figuras indicam a frequência alélica das variantes testadas por amostra, assim como os números de droplets detectadas em cada reação. As barras com colaração verde escura representam as droplets totais, verde clara são as droplets positivas para o alelo selvagem (do inglês *wild type* – WT) e azul são as droplets com mutação TP53 de variantes c.527G>T (A), c.527G>A (B) e c.919+1G>T (C). PC: controle positivo da reação). As amostras cujo nome é iniciado por PCR seguido pelo número 1, antes do ponto final, indica o número do ensaio o qual a amostra é positiva para a variante (ensaio 1), o mesmo para os números 2 e 3 (ensaio 2 e 3). Já o segundo número representa o número da amostra positiva para o ensaio correspondente (amostra 1, 2 3 e 4).

A frequência alélica das variantes (VAF) detectadas no DNA mutante das amostras de FFPE avaliadas pela metodologia *Droplet Digital PCR* (Bio- Rad, EUA) estava muito similar à VAF das variantes equivalentes detectadas no DNA mutante das mesmas amostras avaliadas previamente por NGS, indicando que os resultados obtidos pela ddPCR são robustos (Tabela 18).

Tabela 18 - Frequência alélica das variantes (VAF) no gene *TP53* detectadas por NGS e ddPCR.

Amostra	Variante	VAF (%) NGS	VAF (%) ddPCR
1.1	c.527G>T	35,3%	39,7%
1.2	c.527G>T	26,0%	28,0%
1.3	c.527G>T	56,0%	58,9%
1.4	c.527G>T	19,0%	19,1%
2.1	c.527G>A	87,5%	89,1%
2.2	c.527G>A	41,0%	41,0%
2.3	c.527G>A	55,4%	55,4%
3.1	c.919+1G>T	29,9%	29,9%

Após padronização dos ensaios para as três variantes selecionadas, foram iniciados os testes de detecção nas amostras de plasma dos três pacientes. Cada paciente possuía entre 5 e 8 amostras de seguimento disponíveis. As amostras de cfDNA foram obtidas a partir de um volume de 180 a 1130 microlitros de plasma. Uma massa total entre 6,76 nanogramas totais e 49,79 nanogramas totais foi obtida a partir das amostras processadas pela quantificação no Qubit. Todos os testes foram realizados em duplicatas contendo 4 µL e 8 µL de cada amostra, controle positivo (PC) a 10 ng totais e água como controle negativo de reação (NTC). Dos 3 pacientes incluídos, 2 tiveram uma quantidade significativa de cfDNA mutado nas amostras de plasma coletadas em algum momento durante o acompanhamento (Figura 31):

Paciente 1

O paciente 1 estava em quimioterapia paliativa de novembro de 2018 a fevereiro de 2019, mas apresentou progressão da doença e iniciou imunoterapia entre maio e agosto. O tratamento foi interrompido devido à recorrência local. Uma baixa recuperação de cfDNA a partir da amostra de plasma pode explicar a falta de

correlação entre os resultados da mutação e a ausência de mutação no cfDNA desde a primeira coleta.

Paciente 2

O paciente 2 estava recebendo quimioterapia paliativa (iniciou dia 17/10/2018) e teve uma boa resposta. A coleta 2PB do dia 28/11/2018 mostrou um aumento de cfDNA (2,38%). Esse evento pode ser explicado pela lise de muitas células tumorais devido a esse tratamento. Posteriormente, as duas coletas seguintes apresentaram uma porcentagem de cfDNA mutado inferior (0,92% e 0,09% consecutivamente). Em janeiro de 2019 a doença progrediu, levando o paciente a óbito. De acordo com a coleta 2PE do dia 12/02/2019, houve um aumento do nível de cfDNA mutado (2,02%), coincidindo com a progressão da doença e óbito do paciente.

Paciente 3

O paciente 3 estava em tratamento radioterápico entre março e abril de 2019. Nesse período, os níveis de cfDNA mutado das coletas 18/03/2019 e 25/03/2019 estavam baixos com 3,34% e 1,05%. Em abril, o paciente apresentou falha na resposta ao tratamento primário, e um aumento do nível de cfDNA mutado na amostra de plasma coletada no dia 29/04/2019 foi observado (20,94%) que pode ser associado com a resposta clínica. Devido a falha na resposta ao tratamento, o paciente iniciou uma segunda linha terapêutica com imunoterapia e teve uma resposta mista. De acordo com o nível de cfDNA detectado nas coletas subsequentes, foi possível observar uma diminuição do nível de cfDNA mutado no plasma durante o seguimento, sugerindo associação a resposta mista ao segundo tratamento. O paciente 3 encerrou o tratamento e se encontra em acompanhamento clínico e cuidados paliativos.

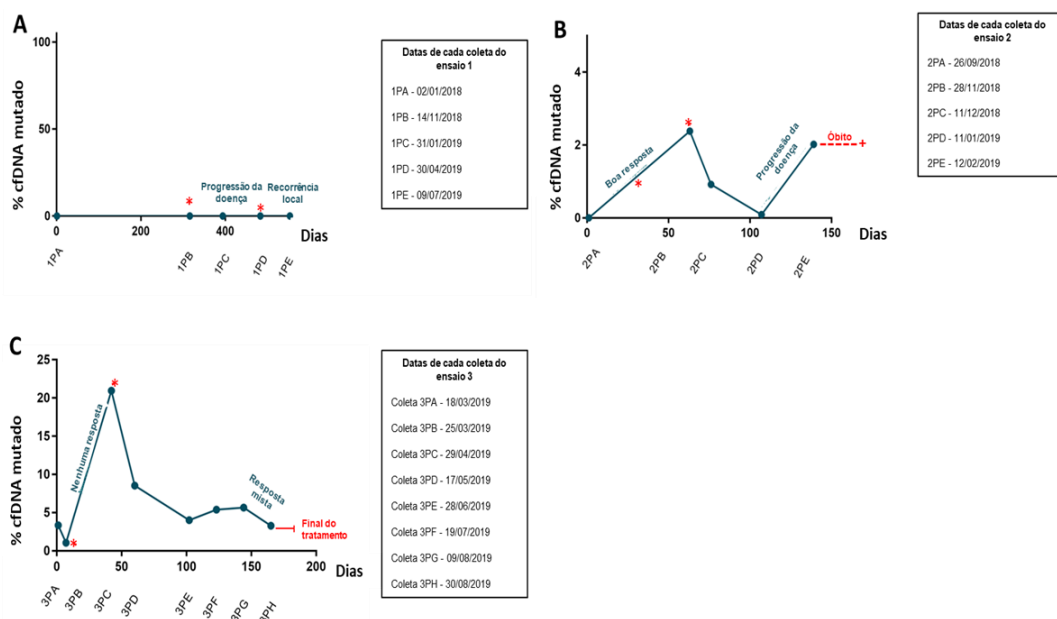


Figura 31 - Porcentagem de cfDNA no plasma com presença de mutação no gene *TP53* nos pacientes 1 (A), 2 (B) e 3 (C). Porcentagem de cfDNA mutante em amostras de plasma dos pacientes 1 (A), 2 (B) e 3 (C), coletadas em diferentes momentos durante o acompanhamento. O eixo y representa o valor percentual de cfDNA mutado no gene *TP53*. O eixo x representa o número de dias durante o acompanhamento. Cada círculo representa o momento de uma nova coleta e, conseqüentemente, uma nova amostra. O asterisco indica o início de um tratamento, a linha vermelha sólida é o fim do tratamento e a linha vermelha pontilhada significa o óbito. A caixa de texto ao lado de cada figura mostra as datas exatas das coletas, bem como a identificação de cada amostra.

6 DISCUSSÃO

O carcinoma escamocelular de cabeça e pescoço (CECP) é o conjunto de neoplasias que tem origem nas células epiteliais que revestem a mucosa do trato aerodigestivo superior¹. Esses tumores são provenientes do mesmo tipo celular, porém, sua característica heterogênea é consequência das diferenças quanto ao sítio, à etiologia e às alterações moleculares envolvidas no início do processo de malignização celular e proliferação da linhagem tumoral⁵⁵.

Nosso estudo avaliou pacientes da população brasileira, conhecida por ser altamente miscigenada e com particularidades distintas em relação a outras regiões do mundo⁸⁸⁻⁹⁰. Os pacientes avaliados incluem indivíduos tratados no Hospital de Câncer de Barretos, frequentemente tabagistas, etilistas e diagnosticados com tumores em estadiamento avançado. Também incluímos na etapa de comparação dos dados de mutação entre diferentes populações, amostras de CECP de cabeça e pescoço de uma coorte estendida do *The Cancer Genome Atlas*, onde comparamos as frequências de mutações de 239 amostras de CEC de cavidade oral e 39 amostras de CEC de orofaringe que apresentavam informações sobre o status mutacional para todos os genes avaliados e também informações sobre status de tabagismo e de infecção pelo HPV.

Também incluímos uma outra casuística composta por 3 indivíduos tratados no *University Medical Center*, da cidade de Utrecht na Holanda, na etapa de detecção de mutações em amostras de plasma.

Em nossa coorte de pacientes com CEC de orofaringe (n=51), a etapa de detecção de mutação foi realizada utilizando um painel de 15 genes, customizado previamente pelo grupo de Biologia dos Tumores de Cabeça e Pescoço, cujos genes incluídos foram frequentemente descritos como mutados em tumores de cabeça e pescoço de acordo com a literatura⁸³. Desses pacientes, 35,3% (18/51) pertenciam ao subgrupo dos tumores HPV - positivos. Entretanto, os casos HPV-negativos tiveram 2,5 vezes mais variantes do que os casos HPV- positivos ($3,27 \pm 5,854$ versus $1,33 \pm 3,162$, respectivamente). Este dado é condizente com o observado em outros estudos que também demonstraram uma maior taxa de mutação em tumores HPV-negativos em relação aos HPV- positivos^{51, 55}. Provavelmente, os tumores associados ao tabaco apresentam um acúmulo de alterações genéticas necessárias para que ocorra o processo de carcinogênese, já que nestes casos, não há o efeito oncogênico do vírus nessas células^{51, 55}. Além disso, CEC de orofaringe positivos

para HPV apresentam frequentemente mutações em *PIK3CA* e o gene *TP53*, além de outros relacionados à via de carcinogênese induzida por tabaco, é selvagem^{54, 57, 58}. Na nossa população, embora a maioria dos casos HPV - positivos fossem fumantes (12/18; 66,7%), a frequência da mutação nos genes relacionados ao tabagismo *TP53*, *NOTCH1*, *CDKN2A* e *FAT1* nesse subgrupo foi menor, como esperado. Quando comparamos nossos dados com as frequências de mutação observadas nos casos do TCGA, observamos uma maior frequência de mutações nestes genes na casuística do nosso estudo condizente com diferenças na prevalência de tabagismo e positividade para HPV.

Quanto às mutações no *PIK3CA*, gene que atua sobre o controle do crescimento celular, a proliferação, a motilidade, a sobrevivência, a diferenciação e o tráfego intracelular, encontramos apenas 1 caso positivo para HPV com a alteração nesse gene (1/18; 5,6%)⁹¹. Tumores de cabeça e pescoço induzidos pela infecção pelo HPV apresentam uma taxa de mutação no gene *PIK3CA* entre 22-56%⁹². Os dados referentes às amostras de orofaringe explorados pelo TCGA também mostram uma frequência de mutações maior do que a observada em nosso estudo nos casos de orofaringe HPV-positivos (16,1% versus 5,6%). Contudo, nosso estudo avaliou apenas mutações somáticas, diferentemente de Hayes e colaboradores, que abordaram alterações no número de cópias (CNAs). Acreditamos que esse fato pode explicar a menor frequência de mutações em *PIK3CA* em comparação com outros estudos que relacionam essa ativação tanto à mutação quanto à amplificação em casos positivos para HPV⁹². Além disso, a prevalência de tumores HPV-positivos também pode influenciar nas taxas de mutação deste gene. De acordo com a literatura, a malignização celular causada pelas enzimas APOBEC pode conduzir a mutações que são frequentemente relacionadas a tumores cervicais causados pelo papilomavírus humano (HPV). Segundo Henderson e colaboradores, mutações em *PIK3CA* foram associadas a ação de APOBEC em tumores de cabeça e pescoço HPV – positivos⁹³. Mutações do tipo E542K (c.1624G> A) e E545K (c.1633G> A), localizadas no éxon 9 no domínio helicase de *PIK3CA*, são as mais comumente estudadas e correlacionadas à infecção pelo HPV^{57 93}. Nenhum dos pacientes HPV-negativos incluídos no nosso estudo com mutações em *PIK3CA* tiveram mutações no domínio helical (n = 3; 3/3) e o único HPV - positivo mutado para este gene apresentou mutação E545K (n = 1; 1/1). Nas amostras do TCGA, apesar de a maioria das amostras mutadas neste domínio serem HPV-positivas, elas não foram

exclusivas deste subgrupo. Para ambos os grupos avaliados, o status de HPV foi considerado utilizando principalmente o teste de IHQ para p16 e, para alguns casos do TCGA, a técnica de hibridização *in situ*. A confirmação do status de infecção por HPV por um segundo método tem sido recomendada devido à baixa especificidade do p16 e a baixa sensibilidade da ISH⁹⁴.

A frequência de mutações em *TP53* e *CDKN2A* na nossa população de indivíduos com CEC de orofaringe foi de 45,1% e 11,8%, respectivamente. O gene *TP53*, considerado um fator de transcrição nuclear que leva a ativação de vários genes-alvo envolvidos na interrupção do ciclo celular e apoptose, e o gene *CDKN2A*, conhecido por atuar na regulação da progressão do ciclo celular, são genes que caracterizam o segundo subgrupo dos tumores de cabeça e pescoço na revisão por Leemans e colaboradores^{58, 95, 96}. Em comparação com estudos anteriores, era esperado que essas taxas fossem maiores, talvez pelo fato de que nossa coorte consistiu apenas em pacientes com tumores na região da orofaringe, alguns positivos para HPV e selvagens para estes genes.

Contudo, dentre os casos mutados, os genes *CDKN2A* e *TP53* apresentaram uma maior frequência em indivíduos fumantes atuais/ex-fumantes, conforme esperado, com taxas de 83,3% e 95,7%, respectivamente. Além disso, nosso estudo testou apenas a inativação de *CDKN2A* por mutação e não chegamos a realizar testes da inativação desse gene pela deleção ou hipermetilação.

Nos casos negativos para HPV e tabagistas, alterações adicionais à perda de função de *TP53* e *CDKN2A* podem acontecer durante a progressão do tumor⁵⁸. Dez a 21% dos CECP apresentam mutações com perda de função em *NOTCH1*, o que afeta a diferenciação escamosa e a polaridade celular, enquanto 5 a 23% dos casos tem mutações em *FAT1*, um componente importante da sinalização WNT⁹². Essa via parece impactar a sinalização da beta-catenina e a transformação de queratinócitos, e o tabagismo é um fator de risco conhecido⁵⁸. Nossos resultados mostram taxas similares de casos com alteração para estes genes em nossa coorte de pacientes com carcinoma de orofaringe: 21,6% (11/51) para o *NOTCH1* e 17,6% (9/51) para o *FAT1*.

Observamos também que os casos com mutação em *NOTCH1* tinham um estágio T maior (T3 / T4; p = 0,045) e que a presença de mutações em *NOTCH1* afetou significativamente a sobrevida livre de recorrência. Esta associação entre a mutação de *NOTCH1* e um pior prognóstico já foi relatada previamente por Lim e

colaboradores que encontraram a mutação *NOTCH1* como preditora de pior sobrevida em pacientes com CEC tratados com terapia alvo-molecular⁹⁷. O estudo de Vettore e colaboradores também encontrou uma associação entre a presença de mutações nos genes da via Notch e uma menor sobrevida livre de doença em pacientes com carcinoma de língua oral⁹⁸. Song e colaboradores, analisando uma coorte de carcinomas de esôfago de indivíduos chineses, descobriram que pacientes com mutações no gene *NOTCH1* tiveram uma menor sobrevida e não responderam ao tratamento a base de quimioterapia⁹⁹. Esses resultados concordam com nossos achados de que o status de mutação em *NOTCH1* é um marcador preditivo promissor para a evolução do paciente e para a resposta ao tratamento no CEC de orofaringe.

O gene *PTEN* tem a função de supressor tumoral, e sua proteína fosfatase está envolvida na regulação do ciclo celular. Estudos tem encontrado este gene mutado em 9-23% dos CEC de cabeça e pescoço negativos para o HPV^{58, 100}. Já de acordo com o TCGA, esse gene encontrou-se mutado em 2,4%-dos casos de CEC (n = 507) e em 5,13% dos casos de tumores de orofaringe (n = 39). Nosso estudo encontrou mutações em *PTEN* em 7,8% dos casos testados de pacientes com CEC de orofaringe; sendo que, novamente, essa taxa não incluiu CNAs, o que poderia explicar a menor frequência observada em nossa casuística. Também observamos uma diminuição significativa na sobrevida livre de recorrência na presença de mutação do gene *PTEN* (25% versus 64,5% no WT; log-teste p de log = 0,045). Um estudo recente observou que pacientes com alta expressão de *PTEN* tiveram uma sobrevida livre de progressão da doença melhorada em resposta ao cetuximabe, em comparação com pacientes com baixa expressão desse gene¹⁰¹. Condizente com esse achado, um estudo brasileiro semelhante analisou pacientes com CEC tratados com cetuximabe e verificou que a perda de expressão de *PTEN* foi associada a uma pior sobrevida livre de progressão e sobrevida global¹⁰².

As diferenças observadas em relação a presença e a frequência de mutações de alguns genes (*TP53*, *NOTCH1*, *FAT1*, *CDKN2A*, *PIK3CA*, *EZH2*, *HRAS* e *IRF6*) dentre as casuísticas podem ser justificadas por quatro fatores. O primeiro fator é o tamanho amostral. Tanto nosso estudo quanto os dados disponíveis do TCGA avaliaram um número pequeno de pacientes e, além disso, a prevalência de pacientes de acordo com o status de HPV foi bastante variável, com apenas 8/39 (20,5%) dos pacientes do TCGA sendo HPV-negativos (n=8). Nós estudamos o perfil

genético de uma população com características étnicas, estilo de vida e exposição a fatores de risco diferentes. A composição étnica da população brasileira é caracterizada por ser fortemente miscigenada e, de acordo com a literatura, como consequência dessa heterogeneidade pode-se observar algumas diferenças genéticas em comparação com outras populações mundiais^{103, 104}. Por fim, os pacientes incluídos nessa casuística com CEC de orofaringe tratados no HCB ainda tem como o principal fator de risco o tabaco, onde a maioria dos casos positivos para HPV são tabagistas. Sendo assim, essa particularidade também pode ter influenciado essas diferenças observadas entre as frequências de mutações de alguns genes nas duas casuísticas.

Em nossa coorte de pacientes com CEC de cavidade oral (n=12) incluídas na etapa de busca por variantes genéticas através da técnica de exoma, a maioria dos pacientes avaliados era tabagista (11/12; 91,7%) e etilista (10/12; 83,3%). Selecionamos os genes mais frequentemente mutados na nossa casuística e na casuística avaliada no artigo publicado pelo TCGA e comparamos a frequência de mutações entre a nossa população nos indivíduos com câncer de cavidade oral de uma casuística estendida do *The Cancer Genome Atlas* cujos dados foram obtidos a partir da plataforma Xena Browser online. Foi verificado que alguns dos genes avaliados apresentaram frequências de mutações muito semelhantes entre as duas coortes, sobretudo os genes associados a via de carcinogênese do tabaco, fortemente relacionada aos tumores de cabeça e pescoço localizados na cavidade oral: *TP53*, *NOTCH1*, *FAT1* e *CDKN2A*, que obteve uma frequência ligeiramente maior nos casos do TCGA provavelmente por termos avaliado apenas dados de mutações pontuais, diferentemente do TCGA que também considerou alterações no número de cópias. Entretanto, também observamos divergências entre as frequências de alguns genes entre a coorte deste estudo e do TCGA, como a presença de mutação no gene *H3F3A* (25,0% versus 0,0%) em nosso estudo, o que não foi encontrado na população do TCGA, além de uma maior frequência de mutações nos genes *ASLX* (16,7% versus 2,9%), *CDH6* (16,7% versus 2,5%), *HLA-A* (16,7% versus 3,4%), *KMT2D* (33,3% versus 10,5%) e *KMT2C* (16,7% versus 5,9%) também na casuística de Barretos. Tais divergências destacadas podem ser justificadas pela diferença entre o pipeline de seleção de variantes utilizados em ambos os estudos, sendo que nós utilizamos apenas o software *Wannovar* e a plataforma CGI para realizar a anotação e filtragem das mesmas, já o TCGA

certamente utilizou um planejamento de seleção de maior complexidade do que o nosso estudo. Essa filtragem mais apurada provavelmente permitiu a exclusão de muitas variantes dos genes avaliados no TCGA. Por sua vez, o nosso estudo, que não utilizou ferramentas de filtragem de tamanho rigor, pode ter incluído essas variantes nos nossos resultados. Conseqüentemente, isso impactou na diferença das frequências de mutações dos genes entre as duas coortes, sendo que na maioria das vezes eles estavam com uma maior taxa de mutações na coorte desse estudo. Além disso, elas podem ser justificadas pelas diferenças no número de amostras analisadas entre os grupos, bem como pela diferença da composição dos pacientes quanto aos hábitos e exposições de risco.

O tabagismo e o etilismo são fatores de risco sinérgicos para os tumores de cabeça e pescoço, seus efeitos sobre o início da carcinogênese dos CCP já estão bem estabelecidos de acordo com a literatura. Além disso, segundo Hashibe e colaboradores, o consumo excessivo do álcool e tabaco é responsável por 64% dos casos de tumores de cavidade oral¹⁰⁵. Quanto às diferentes mutações identificadas nesses pacientes, 12 genes encontraram-se mutados em duas amostras ou mais. O gene *TP53* foi o gene mais frequentemente mutado nesta população (9/12; 75,0%) e entre os pacientes tabagistas ou ex-tabagistas (9/11; 81,8%; Teste Exato de Fisher p valor = 0,250). Estes dados estão de acordo com o modelo de progressão genômica para as neoplasias de cabeça e pescoço relacionado ao tabagismo, com mutações em *TP53* sendo as mais frequentes⁵⁸.

Mesmo com uma coorte pequena de pacientes com CEC de cavidade oral, conseguimos identificar um paciente que se enquadrava no terceiro, e menos frequente, subgrupo dos tumores de cabeça e pescoço. Tumores HPV- negativos com baixo número de cópias que são caracterizados por *TP53* selvagem e mutações nos genes *HRAS* e *CASP8*⁵⁸. Este subgrupo engloba tumores ainda sem fator etiológico determinado, entretanto aparentam estar mais relacionados a mulheres sem histórico de tabagismo e etilismo e com idade mais avançada⁵⁸. Nossa única paciente mulher neste grupo de indivíduos com CEC de cavidade oral tinha >55 anos, sem histórico de consumo de álcool e tabaco e foi a única candidata que apresentou mutação em *CASP8*, gene com atuação importante na morte celular programada induzida por receptor de morte e que, após ativado, irá liberar uma cascata de sinalização resultando na apoptose^{106, 107}. Com o objetivo de caracterizar os carcinomas de células escamosas de cavidade oral, Pickering e colaboradores

detectaram mutações em *CASP8* em 10% (4/40) dos tumores avaliados e encontrou associação com menor frequência de alterações no número de cópias, resultado também observado no estudo do TCGA para pacientes com mutações em *CASP8*^{53, 57}.

A análise da sobrevida livre de recorrência (SLR), apesar do baixo número de casos incluídos, mostrou que os pacientes com CEC de cavidade oral com mutação no gene *CDKN2A* foram associados a uma diminuição significativa da sobrevida livre de recorrência (0,0% versus 57,1% para WT; log rank valor p = 0,017), o que também foi observado quando o gene *NFE2L2* estava mutado (0,0% versus 51,9% para WT; log rank valor p = 0,038). Ambos os genes estão correlacionados com as alterações frequentes no segundo subgrupo dos tumores de cabeça e pescoço HPV-negativos com alto número de cópias⁵⁸. O gene *NFE2L2* é conhecido por atuar na resposta ao estresse oxidativo por meio da regulação de genes citoprotetores muitas vezes envolvidos com a resposta a lesões e inflamações^{108, 109}. Dois estudos avaliaram as mutações no gene *NFE2L2* e verificaram associação estatisticamente significativa entre *NFE2L2* mutado e uma pior sobrevida global e livre de recorrência em pacientes com carcinoma de células escamosas do pulmão^{110,111}. Mutações em *CDKN2A* são consideravelmente mais raras do que a deleção ou alterações epigenéticas nesse gene¹¹². Na maioria das vezes, *CDKN2A* é inativado devido a eventos de deleções cromossômicas, ocorrendo em 25% a 66% dos tumores de cabeça e pescoço¹¹³. Essa inativação é comumente relacionada com um pior prognóstico e menor sobrevida global nos CEC^{113, 114}. Entretanto, o estudo de Vossen e colaboradores verificou que os pacientes com tumores de cabeça e pescoço HPV-negativos com mutações no gene *CDKN2A*, associadas às mutações no gene *CCNA1*, apresentaram uma menor sobrevida livre de progressão da doença¹¹⁵.

Além do status de mutação, a metilação é outro tipo de alteração molecular que tem sido muito associada à carcinogênese de uma variedade de neoplasias, inclusive o câncer de cabeça e pescoço^{61, 71}. A detecção do DNA metilado tem sido explorada por demonstrar relevância clínica para o processo de carcinogênese do CEC através da técnica de PCR quantitativo (qPCR) em diferentes tipos de amostras^{70, 71, 116}. Contudo, a qPCR não demonstrou uma alta sensibilidade quando aplicada em amostras de plasma de pacientes com CEC¹¹⁷.

A Droplet Digital PCR (ddPCR) é uma metodologia altamente sensível,

precisa e acessível que realiza a quantificação absoluta de material genético, podendo determinar essas quantidades mesmo em baixas concentrações do material ou até mesmo detectar variantes raras com uma alta reprodutibilidade. Essa técnica tem sido empregada tanto no campo da pesquisa científica quanto no ambiente clínico¹¹⁸.

Através desse método, primeiramente nós avaliamos a metilação dos genes *CCNA1*, *CDH8*, *DAPK* e *TIMP3* em amostras de tecido tumoral de pacientes com CEC de orofaringe. Foi observado que 37 dos 52 pacientes da nossa coorte apresentaram pelo menos um desses genes metilados, resultados estes condizentes com os observados em outros estudos realizados com qPCR⁶⁹⁻⁷¹,

Observamos uma associação entre a ausência de metilação do gene *TIMP3* e pacientes com linfonodos clinicamente negativos ao diagnóstico. Esse gene é conhecido como inibidor tecidual das metaloproteinases 3, enzimas proteolíticas que fazem parte da família de inibidores de metaloproteinases da matriz (MMPs). Elas atuam desorganizando e degradando a matriz extracelular (MEC), o que pode ser considerado um evento significativo no contexto de migração, invasão de tecidos vizinhos e metástases tumorais. Nossos resultados se consolidam quando os associamos com a função do *TIMP3*, que impede a invasão tumoral bloqueando a atividade das metaloproteinases e impossibilitando a lise da MEC associada ao tumor^{70, 119-121}. Quando esse gene está hipermetilado, ocorre a inibição da transcrição gênica, prejudicando sua função e contribuindo para a degradação da matriz extracelular e, conseqüentemente, o mecanismo de propagação do tumor para os linfonodos. Portanto, os casos podem ter apresentado linfonodos negativos por estarem sob a influência da função antiproteolítica do gene *TIMP3* não metilado (ativo) em seu DNA. Alguns estudos tem relacionado a inibição da invasão celular, tumorigênese, metástase e angiogênese com aos TIMPs^{70, 119, 121}. A hipermetilação do *TIMP3* nas células tumorais também foi associada anteriormente ao status linfonodal do câncer de cabeça e pescoço positivo para a infecção do HPV e câncer gástrico^{108, 109}. Além do mais, esse evento também foi correlacionado ao desenvolvimento de segundos tumores primários nos tumores de cabeça e pescoço, onde também foi identificado como um fator prognóstico independente para pacientes com CCP^{70, 119}. Sendo assim, conseguimos identificar uma forte correspondência entre as nossas descobertas apresentadas aqui com os resultados da literatura.

Nosso estudo também observou a associação entre a metilação do gene *CCNA1* a uma menor sobrevida livre de recorrência dos pacientes dessa coorte. Esse gene codifica a proteína ciclina-A1, pertencente à família das ciclinas altamente conservadas, caracterizada por uma periodicidade na abundância de proteínas através do ciclo celular e como reguladores das cinases dependentes de ciclinas - CDK. Elas se unem a proteínas importantes na regulação do ciclo celular, como as proteínas das famílias Rb, p21 e ao fator de transcrição E2F-1¹²². *CCNA1* foi identificado por Rivera e colaboradores como um gene induzido por p53, estando a jusante de *TP53* e que pode promover a apoptose e parada do ciclo celular na fase G2 quando regulado em excesso¹²³. Rettori e colaboradores mostram uma associação entre a metilação do gene *CCNA1* com o desenvolvimento de segundos tumores primários. Isso pode ser explicado, pelo silenciamento transcricional da expressão do *CCNA1* através da hipermetilação do promotor em eventos oncogênicos precoces, levando à desregulação da apoptose e, por consequência, a parada do ciclo celular. Isso contribuirá para uma vantagem proliferativa celular, dando origem à expansão de uma população clonal de células progenitoras suscetíveis a novos eventos oncogênicos e ao desenvolvimento de novos tumores¹¹⁹.

Rotineiramente, os CECP são diagnosticados e monitorados por métodos de inspeção visual e exames de imagem, seguidos de biópsias teciduais quando encontrada uma lesão suspeita. Infelizmente isso possibilita apenas a detecção de áreas teciduais que apresentem alterações visíveis macroscopicamente. Além disso, esses métodos possuem uma baixa sensibilidade para a detecção de doença residual mínima durante e após o tratamento, reduzindo a predição correta da resposta ao tratamento e adiando as tentativas de tratamento de resgate. Além disso, biópsia tecidual é um método invasivo que pode gerar desconforto e riscos aos pacientes, bem como aumentar os custos de assistência. A detecção de marcadores moleculares em amostras de biópsia líquida já está sendo utilizada na rotina clínica relacionada a alguns tipos de câncer, como o câncer de pulmão e câncer colorretal^{124, 125}. Muitos estudos têm investigado biomarcadores relacionados a rastreamento, detecção precoce e diagnóstico, prognóstico, avaliação de resposta ao tratamento e monitoramento.

Além de realizar a validação do que foi descrito previamente na literatura sobre o papel dos genes testados na carcinogênese dos CECP, nosso trabalho

também testou a detecção de alterações moleculares no cfDNA em amostras de plasma pré-tratamento de pacientes com CEC de orofaringe.

Em relação aos dados de metilação, dos 37 pacientes da nossa coorte que apresentaram pelo menos um dos genes testados metilados, 11 tinham amostra de plasma pré-tratamento disponível. Aproximadamente 73% (11/15) das amostras apresentaram cfDNA metilado, enquanto nenhuma metilação foi detectada em pacientes com tumores não metilados para os genes testados. Embora não seja ideal, a concordância entre amostras pareadas foi razoável (80%) em comparação com outros estudos semelhantes e a taxa de detecção foi razoável, considerando o baixo número de marcadores testados¹²⁶⁻¹²⁸. Shen e colaboradores desenvolveram com sucesso um protocolo sensível à imunoprecipitação para detectar alterações de metilação do DNA em larga escala específicas de um tumor, capazes de classificar corretamente amostras de plasma de vários tipos de tumor¹²⁹. Essa pode ser uma abordagem interessante para identificar outros alvos que podem ser testados usando ensaios multiplexados baseados em ddPCR e melhorariam as taxas de sensibilidade da detecção de cfDNA metilado em amostras de plasma. Diferentes níveis de metilação foram observados ao comparar amostras de tumor e plasma do mesmo paciente. Essas diferenças podem depender das frequências específicas de alelos metilados no DNA recuperado de tecidos e fluidos, com um enriquecimento no plasma de marcadores mais representativos das células tumorais que liberam os fragmentos de DNA recuperados durante a coleta de sangue. Por outro lado, a heterogeneidade do tumor pode não estar representada no fragmento utilizado para a recuperação do DNA, principalmente quando o tecido disponível é proveniente de biópsias¹²⁷.

Também tivemos a possibilidade de realizar o teste de detecção da metilação em três pacientes que tinham amostras de plasma pós-tratamento disponível, e os resultados para a detecção de cfDNA metilado coincidiram com os resultados de 2 dos 3 pacientes. O paciente com resultados discrepantes entre os níveis de cfDNA metilado e a evolução está em acompanhamento para investigação de uma possível metástase no pescoço, fato este que pode justificar o alto nível de metilação no cfDNA observado na amostra correspondente a última coleta desse indivíduo após o tratamento com resposta completa, sendo que a presença da doença sugere o aumento de cfDNA metilado. Outros estudos sugeriram a possível utilidade clínica da aplicação da biópsia líquida no cenário do monitoramento e vigilância de

doenças, porém nosso grupo de pesquisa é o primeiro a recomendar essa hipótese através da análise de marcadores de metilação com fundamentos em ensaios realizados com a metodologia de Droplet Digital PCR^{15, 70, 130}.

Outro objetivo deste trabalho era avaliar a detecção de variantes nas amostras de plasma de pacientes com CEC de orofaringe por ddPCR. Quando comparamos as frequências alélicas (VAF) do DNA mutado nas amostras de FFPE, verificamos que elas estavam muito similares entre as metodologias de ddPCR e NGS, demonstrando que ambas apresentam resultados robustos e equivalentes. Garcia e colaboradores compararam o desempenho de diferentes plataformas para a detecção de mutações em amostras de cfDNA de pacientes com câncer colorretal e câncer de pulmão de não pequenas células, e verificaram que as frequências alélicas entre a ddPCR e o NGS foram moderadamente correlacionadas (coeficiente R^2 de 0,64 e 0,68 respectivamente)¹³¹.

O estudo desenvolvido pelo grupo da UMC constatou a viabilidade da detecção de mutações no gene *TP53* encontradas no tumor em amostras de ctDNA de pacientes com câncer de cabeça e pescoço através da ddPCR⁸⁰. Em nosso estudo, dos três pacientes incluídos com amostras de plasma disponível, conseguimos detectar uma quantidade significativa de cfDNA mutado em duas delas. Em um deles, verificamos um resultado concordante entre o nível de cfDNA e a evolução. No entanto, para o outro paciente, um aumento de cfDNA foi observado após ele ter tido uma boa resposta ao tratamento. Isso pode ser decorrente a uma resposta exacerbada à quimioterapia, resultando na lise de muitas células tumorais. Um evento já conhecido na literatura que poderia sugerir uma explicação é a síndrome da lise tumoral (SLT). Esse episódio é frequentemente relacionado à neoplasias hematológicas e consiste na destruição de células tumorais com a liberação do seu conteúdo no meio extracelular e pode acontecer espontaneamente ou alguns dias antes ou após o tratamento com agentes quimioterápicos citotóxicos¹³²⁻¹³⁵. Mesmo sendo um fenômeno raro em tumores sólidos, foram verificados diversos casos de tumores que desenvolveram a SLT na literatura, como por exemplo o câncer colorretal, hepático, mama, pulmão, ovário, urológicos e neurológicos¹³³. Portanto, é necessária uma investigação mais detalhada desse paciente para uma mais justificção mais exata sobre esse ocorrido.

Como proposto nos objetivos deste trabalho, nosso último teste realizado foi a análise de detecção de alterações genéticas características do tumor em amostras

pré-tratamento de lavado bucal de 4 pacientes com CEC de cavidade oral. Essa etapa não foi efetuada por meio da metodologia de ddPCR devido a diversidade de variantes detectadas nas amostras e a necessidade da utilização de um ensaio específico para cada uma delas, o que influenciaria diretamente no alto custo da performance. Sendo assim, esse teste foi realizado através plataforma *Illumina MiSeq* (Illumina Technologies, EUA) com o painel *TruSight Tumor 15*, que apresenta dois dos genes identificados como mutados nas amostras desse estudo incluídos nesse painel (*TP53* e *PIK3CA*). Primeiramente realizamos a validação do exoma nas amostras de tecido, onde todas as variantes encontradas previamente também foram identificadas através desse painel, mas ao analisarmos as amostras de lavado bucal, apenas conseguimos detectar a variante de interesse em uma das amostras. A falha na detecção de DNA mutado nas amostras de lavado bucal pode ser explicada por um problema de amostragem. O lavado pode não ter recuperado células tumorais e a maior parte do DNA recuperado pode ser de células normais. Além disso, a técnica de sequenciamento utilizando o painel *TruSight Tumor 15*. não foi otimizada para a detecção de variantes raras com baixa frequência, principalmente em amostras com enriquecimento de células normais, sugerindo que talvez esse não seja o painel mais adequado para detecção de mutações na saliva¹³⁶.

Este estudo realizou a caracterização e a análise de mutações somáticas em amostras de tecido de uma coorte de tumores de carcinoma escamocelular de orofaringe e cavidade oral de pacientes brasileiros. Nossos resultados foram comparáveis às descobertas prévias de outros estudos, porém evidenciamos algumas divergências quanto a frequência de mutações em alguns genes por se tratar de uma população miscigenada com diferenças nos hábitos sociais e nas características socioeconômicas. Nossos resultados também validaram a relevância clínica da metilação aberrante em alguns dos genes testados na carcinogênese dos CEC.

Além disso, também mostramos a viabilidade de detecção de alterações em cfDNA (mutação e metilação) em amostras provenientes de biópsia líquida. A detecção de alterações moleculares câncer-específicas de forma menos invasiva pode aumentar a precisão da detecção do câncer de uma maneira mais automatizada e rápida quando comparada a avaliação histopatológica. A possibilidade de validar esses dados através da análise em série com maior número

de casos, maior tempo de seguimento e coleta de fluidos durante o seguimento, pode impactar em uma melhor estratificação do prognóstico desses pacientes e contribuir para uma abordagem de tratamento personalizado de pacientes brasileiros com CECP. Após validação, os achados também podem ser úteis em uma vigilância não invasiva e mais precisa e no monitoramento da doença.

Nosso estudo apresentou algumas limitações como a análise apenas de mutações e não das alterações no número de cópias (CNAs), o que pode interferir nas comparações com diversos estudos que avaliaram esses eventos. O pequeno número de marcadores testados teve um impacto importante nos níveis de sensibilidade. Os métodos de larga escala aplicados às amostras de plasma permitirão uma triagem mais abrangente para os marcadores serem validados por meio do ddPCR e melhorarão a probabilidade de detecção e uso de met-ctDNA em um ambiente clínico. Além disso, o pequeno número de casos incluídos em nossa coorte de pacientes e as coletas com pouco tempo de acompanhamento foi outra limitação. Portanto, seria interessante a confirmação dos nossos resultados em um número maior de amostras, além de amostragem sistemática de acompanhamento. Apesar disso, essas limitações não influenciaram na relevância dos resultados apresentados.

7 CONCLUSÃO

Este trabalho teve como objetivo caracterizar alterações genéticas e epigenéticas em amostras de tumor e fluidos corpóreos de pacientes com CECP, tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Câncer de Barretos.

Nós concluímos que:

- Foi caracterizado o perfil de mutações somáticas do exoma completo em amostras de CEC de cavidade oral, bem como a detecção de mutações de um painel de genes frequentemente mutados em CECP em amostras de CEC de orofaringe.
- Foi realizada a detecção da metilação dos genes *CCNA1*, *CDH8*, *DAPK* e *TIMP3* em amostras de CEC de orofaringe.
- Nossos resultados indicam que os pacientes brasileiros com câncer de cabeça e pescoço demonstraram um perfil clínico e molecular similar em relação à populações frequentemente avaliadas por outros estudos (predominantemente européia). Os genes mais frequentemente mutados em nossa população foram os genes *TP53* e *CDKN2A*, comumente associados aos tumores de cabeça e pescoço induzidos pelo tabaco, resultado condizente com a alta prevalência de tabaco nos pacientes avaliados.
- Mutações nos genes *NOTCH1* e *PTEN* foram associadas à recorrência tumoral em pacientes com CEC de orofaringe.
- O gene *TP53* foi o mais frequentemente mutado nos tumores de cavidade oral, resultado condizente, mais uma vez com a alta prevalência de pacientes tabagistas avaliados neste estudo, seguido por *KMT2D*.
- Mutações em *CDKN2A* e *NFE2L2* em pacientes com CEC de cavidade oral foram associadas a uma menor sobrevida livre de recorrência.
- Confirmamos a alta frequência de metilação em genes previamente descritos como associados à carcinogênese da cabeça e pescoço utilizando a metodologia de PCR digital.
- Metilação do gene *CCNA1* foi associada à presença de recorrência tumoral em pacientes com câncer de orofaringe e a ausência de metilação do gene *TIMP3* foi

associada à ausência de linfonodos positivos, consentindo com o que foi identificado em estudos anteriores.

- Nossos resultados sugerem a viabilidade de detectar alterações moleculares em amostras de plasma de pacientes com CEC de orofaringe utilizando a metodologia de ddPCR.
- A presença de cfDNA com alterações câncer específicas em amostras de plasma coletadas no seguimento mostraram correlação com a evolução dos pacientes.

Logo, as descobertas moleculares desse estudo podem fornecer informações úteis para a determinação de novas abordagens que tornem o tratamento dos pacientes com tumores de cabeça e pescoço personalizado, levando em consideração a heterogeneidade dessas neoplasias. Sendo assim, podemos observar a possibilidade da aplicação da ddPCR na rotina clínica após validações futuras, contribuindo para um melhor e mais amplo manejo dos pacientes acometidos por esses tumores.

8 REFERÊNCIAS

1. Duvvuri U, Myers JN. *Cancer of the head and neck is the sixth most common cancer worldwide*. **Curr Probl Surg**. 2009;46(2):114-7.
2. Vigneswaran N, Williams MD. *Epidemiologic trends in head and neck cancer and aids in diagnosis*. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**. 2014;26(2):123-41.
3. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. *Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries*. **CA Cancer J Clin**. 2018;68(6):394-424.
4. *Instituto Nacional de Câncer Jose Alencar Gomes da Silva. Estimativa da incidência de câncer no Brasil 2020*. [Internet] Rio de Janeiro 2020.
5. *Registro Hospitalar de Câncer do Hospital de Câncer de Barretos*. . [Internet] 2017; Available from: https://infogram.com/rhc_hcb.
6. Marur S, Forastiere AA. *Head and neck cancer: changing epidemiology, diagnosis, and treatment*. **Mayo Clin Proc**. 2008;83(4):489-501.
7. Shield KD, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R, Chaturvedi AK, Bray F, et al. *The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012*. **CA Cancer J Clin**. 2017;67(1):51-64.
8. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, Sugar E, Xiao W, Begum S, et al. *Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers*. **J Natl Cancer Inst**. 2008;100(6):407-20.
9. Habbous S, Chu KP, Qiu X, La Delfa A, Harland LT, Fadhel E, et al. *The changing incidence of human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer using multiple imputation from 2000 to 2010 at a Comprehensive Cancer Centre*. **Cancer Epidemiol**. 2013;37(6):820-9.

10. Ngan HL, Wang L, Lo KW, Lui VWY. *Genomic Landscapes of EBV-Associated Nasopharyngeal Carcinoma vs. HPV-Associated Head and Neck Cancer*. **Cancers (Basel)**. 2018;10(7).
11. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. *Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States*. **J Clin Oncol**. 2011;29(32):4294-301.
12. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. *The molecular biology of head and neck cancer*. **Nat Rev Cancer**. 2011;11(1):9-22.
13. Saldanha MVdLF. *Expressão imuno-histoquímica do p16 e sua relação com o papilomavírus humano em carcinomas de cabeça e pescoço*. **Dissertação (Mestrado)**. Brasília: Universidade de Brasília; 2012.
14. Conway DI, Brenner DR, McMahon AD, Macpherson LM, Agudo A, Ahrens W, et al. *Estimating and explaining the effect of education and income on head and neck cancer risk: INHANCE consortium pooled analysis of 31 case-control studies from 27 countries*. **Int J Cancer**. 2015;136(5):1125-39.
15. Wang Y, Springer S, Mulvey CL, Silliman N, Schaefer J, Sausen M, et al. *Detection of somatic mutations and HPV in the saliva and plasma of patients with head and neck squamous cell carcinomas*. **Sci Transl Med**. 2015;7(293):293ra104.
16. Sabatini ME, Chiocca S. *Human papillomavirus as a driver of head and neck cancers*. **Br J Cancer**. 2020;122(3):306-14.
17. Marur S, Forastiere AA. *Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment*. **Mayo Clin Proc**. 2016;91(3):386-96.
18. Smith GI, O'Brien CJ, Clark J, Shannon KF, Clifford AR, McNeil EB, et al. *Management of the neck in patients with T1 and T2 cancer in the mouth*. **Br J Oral Maxillofac Surg**. 2004;42(6):494-500.

19. Fakhry C, Zhang Q, Nguyen-Tân PF, Rosenthal DI, Weber RS, Lambert L, et al. *Development and Validation of Nomograms Predictive of Overall and Progression-Free Survival in Patients With Oropharyngeal Cancer.* **J Clin Oncol.** 2017;35(36):4057-65.
20. Haddad R, Annino D, Tishler RB. *Multidisciplinary approach to cancer treatment: focus on head and neck cancer.* **Dent Clin North Am.** 2008;52(1):1-17, vii.
21. Duvvuri U, Simental AA, Jr., D'Angelo G, Johnson JT, Ferris RL, Gooding W, et al. *Elective neck dissection and survival in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx.* **Laryngoscope.** 2004;114(12):2228-34.
22. Dansky Ullmann C, Harlan LC, Shavers VL, Stevens JL. *A population-based study of therapy and survival for patients with head and neck cancer treated in the community.* **Cancer.** 2012;118(18):4452-61.
23. *NCCN Pratic Guideline in Oncology; Head and Neck Cancers* [Internet] 2019; Available from: www.nccn.org/professionals/physician_gls/default.aspx.
24. Board PDQATE. *Laryngeal Cancer Treatment (Adult) (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Cancer Information Summaries.* **Bethesda (MD): National Cancer Institute (US);** 2002.
25. Forastiere AA, Ismaila N, Lewin JS, Nathan CA, Adelstein DJ, Eisbruch A, et al. *Use of Larynx-Preservation Strategies in the Treatment of Laryngeal Cancer: American Society of Clinical Oncology Clinical Practice Guideline Update.* **J Clin Oncol.** 2018;36(11):1143-69.
26. Ling DC, Bakkenist CJ, Ferris RL, Clump DA. *Role of Immunotherapy in Head and Neck Cancer.* **Semin Radiat Oncol.** 2018;28(1):12-6.
27. Oliveira-Silva RJ, Carolina de Carvalho A, de Souza Viana L, Carvalho AL, Reis

RM. *Anti-EGFR Therapy: Strategies in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma*. **Recent Pat Anticancer Drug Discov**. 2016;11(2):170-83.

28. Alshahafi E, Begg K, Amelio I, Raulf N, Lucarelli P, Sauter T, et al. *Clinical update on head and neck cancer: molecular biology and ongoing challenges*. **Cell Death Dis**. 2019;10(8):540.

29. Haque S, Yellu M, Randhawa J, Hashemi-Sadraei N. *Profile of pembrolizumab in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma: design development and place in therapy*. **Drug Des Devel Ther**. 2017;11:2537-49.

30. Abrahão R, Perdomo S, Pinto LFR, Carvalho FNd, Dias FL, Podestá JRvd, et al. *Predictors of Survival After Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in South America: The InterCHANGE Study*. **JCO Global Oncology**. 2020(6):486-99.

31. Gillison EW, Powell DJ, McConkey C, Spychal RT. *Current nature and management of cancer of the oesophagus and cardia*. **Br J Surg**. 2000;87(3):362-73.

32. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, Voogd AC, Schepers M, Bot FJ, et al. *Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas*. **Int J Cancer**. 2008;122(12):2656-64.

33. Goldenberg D, Begum S, Westra WH, Khan Z, Sciubba J, Pai SI, et al. *Cystic lymph node metastasis in patients with head and neck cancer: An HPV-associated phenomenon*. **Head Neck**. 2008;30(7):898-903.

34. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. *Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer*. **N Engl J Med**. 2010;363(1):24-35.

35. Anantharaman D, Abedi-Ardekani B, Beachler DC, Gheit T, Olshan AF, Wisniewski K, et al. *Geographic heterogeneity in the prevalence of human papillomavirus in head and neck cancer*. **Int J Cancer**. 2017;140(9):1968-75.

36. Romagosa C, Simonetti S, López-Vicente L, Mazo A, Lleonart ME, Castellvi J, et al. *p16(Ink4a) overexpression in cancer: a tumor suppressor gene associated with senescence and high-grade tumors.* **Oncogene.** 2011;30(18):2087-97.
37. Castellsagué X, Quintana MJ, Martínez MC, Nieto A, Sánchez MJ, Juan A, et al. *The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis.* **Int J Cancer.** 2004;108(5):741-9.
38. Alazawi W, Pett M, Arch B, Scott L, Freeman T, Stanley MA, et al. *Changes in cervical keratinocyte gene expression associated with integration of human papillomavirus 16.* **Cancer Res.** 2002;62(23):6959-65.
39. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. *Global cancer statistics, 2002.* **CA Cancer J Clin.** 2005;55(2):74-108.
40. Dyson N, Howley PM, Münger K, Harlow E. *The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product.* **Science.** 1989;243(4893):934-7.
41. Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, Jiang B, Pickard R, Kreinbrink P, et al. *Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas.* **Oral Oncol.** 2013;49(1):1-8.
42. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. *Molecular Cell Biology, 4th edition.* 4th ed ed. **New Iork**2000.
43. Mahdieh N, Rabbani B. *An overview of mutation detection methods in genetic disorders.* **Iran J Pediatr.** 2013;23(4):375-88.
44. Haber DA, Settleman J. *Cancer: drivers and passengers.* **Nature.** 2007;446(7132):145-6.
45. Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler

KW. *Cancer genome landscapes*. **Science**. 2013;339(6127):1546-58.

46. Stratton MR, Campbell PJ, Futreal PA. *The cancer genome*. **Nature**. 2009;458(7239):719-24.

47. De S, Ganesan S. *Looking beyond drivers and passengers in cancer genome sequencing data*. **Ann Oncol**. 2017;28(5):938-45.

48. Boyle JO, Hakim J, Koch W, van der Riet P, Hruban RH, Roa RA, et al. *The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer*. **Cancer Res**. 1993;53(19):4477-80.

49. Psyrri A, DiMaio D. *Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer*. **Nat Clin Pract Oncol**. 2008;5(1):24-31.

50. Reed AL, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al. *High frequency of p16 (CDKN2/MTS-1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma*. **Cancer Res**. 1996;56(16):3630-3.

51. Agrawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettegowda C, Chang K, Li RJ, et al. *Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1*. **Science**. 2011;333(6046):1154-7.

52. Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulskis K, Sivachenko A, et al. *The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma*. **Science**. 2011;333(6046):1157-60.

53. Pickering CR, Zhang J, Yoo SY, Bengtsson L, Moorthy S, Neskey DM, et al. *Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers*. **Cancer Discov**. 2013;3(7):770-81.

54. Lui VW, Hedberg ML, Li H, Vangara BS, Pendleton K, Zeng Y, et al. *Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers*. **Cancer Discov**. 2013;3(7):761-9.

55. Mountzios G, Rampias T, Psyrii A. *The mutational spectrum of squamous-cell carcinoma of the head and neck: targetable genetic events and clinical impact*. **Ann Oncol**. 2014;25(10):1889-900.
56. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. *Mutational landscape and significance across 12 major cancer types*. **Nature**. 2013;502(7471):333-9.
57. *Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas*. **Nature**. 2015;517(7536):576-82.
58. Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. *The molecular landscape of head and neck cancer*. **Nat Rev Cancer**. 2018;18(5):269-82.
59. Esteller M. *Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps*. **Nat Rev Genet**. 2007;8(4):286-98.
60. Schuebel KE, Chen W, Cope L, Glöckner SC, Suzuki H, Yi JM, et al. *Comparing the DNA hypermethylome with gene mutations in human colorectal cancer*. **PLoS Genet**. 2007;3(9):1709-23.
61. Baylin SB, Esteller M, Rountree MR, Bachman KE, Schuebel K, Herman JG. *Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer*. **Hum Mol Genet**. 2001;10(7):687-92.
62. Cominetti C, Rogero MM, Horst MA. *Genômica nutricional: Dos fundamentos à nutrição molecular*. 1 ed. **Barueri**2016. 522 p.
63. Fan G, Hutnick L. *Methyl-CpG binding proteins in the nervous system*. **Cell Res**. 2005;15(4):255-61.
64. Portela A, Esteller M. *Epigenetic modifications and human disease*. **Nat Biotechnol**. 2010;28(10):1057-68.

65. Lodi CTdC. *Perfil de metilação das ilhas CpG dos genes CDH1, TIMP3 e MGMT como fatores preditores para recidiva de neoplasia intraepitelial cervical em mulheres infectadas e não infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana. Tese (Doutorado)*. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais; 2016.
66. Almeida LOd. *Análise epigenética e de polimorfismos em tumores extra-axiais do sistema nervoso. Tese (Doutorado)*. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2009.
67. Jimenez-Useche I, Yuan C. *The effect of DNA CpG methylation on the dynamic conformation of a nucleosome*. **Biophys J**. 2012;103(12):2502-12.
68. Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. *A gene hypermethylation profile of human cancer*. **Cancer Res**. 2001;61(8):3225-9.
69. Carvalho AL, Henrique R, Jeronimo C, Nayak CS, Reddy AN, Hoque MO, et al. *Detection of promoter hypermethylation in salivary rinses as a biomarker for head and neck squamous cell carcinoma surveillance*. **Clin Cancer Res**. 2011;17(14):4782-9.
70. Rettori MM, de Carvalho AC, Bomfim Longo AL, de Oliveira CZ, Kowalski LP, Carvalho AL, et al. *Prognostic significance of TIMP3 hypermethylation in post-treatment salivary rinse from head and neck squamous cell carcinoma patients*. **Carcinogenesis**. 2013;34(1):20-7.
71. de Carvalho AC, Melendez ME, da Silva Sabato C, Palmero EI, Arantes L, Neto CS, et al. *Clinical and Molecular Characterization of Surgically Treated Oropharynx Squamous Cell Carcinoma Samples*. **Pathol Oncol Res**. 2019;25(3):1047-58.
72. Wan JCM, Massie C, Garcia-Corbacho J, Mouliere F, Brenton JD, Caldas C, et al. *Liquid biopsies come of age: towards implementation of circulating tumour DNA*. **Nat Rev Cancer**. 2017;17(4):223-38.

73. Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis F, Bardelli A. *Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2013;10(8):472-84.
74. Ribeiro IP, de Melo JB, Carreira IM. *Head and neck cancer: searching for genomic and epigenetic biomarkers in body fluids - the state of art*. **Mol Cytogenet**. 2019;12:33.
75. Siravegna G, Marsoni S, Siena S, Bardelli A. *Integrating liquid biopsies into the management of cancer*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2017;14(9):531-48.
76. Bellairs JA, Hasina R, Agrawal N. *Tumor DNA: an emerging biomarker in head and neck cancer*. **Cancer Metastasis Rev**. 2017;36(3):515-23.
77. Pantel K, Alix-Panabières C. *Liquid biopsy and minimal residual disease - latest advances and implications for cure*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2019;16(7):409-24.
78. Taylor SC, Laperriere G, Germain H. *Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data*. **Sci Rep**. 2017;7(1):2409.
79. van Ginkel JH, Huibers MMH, Noorlag R, de Bree R, van Es RJJ, Willems SM. *Liquid Biopsy: A Future Tool for Posttreatment Surveillance in Head and Neck Cancer?* **Pathobiology**. 2017;84(3):115-20.
80. van Ginkel JH, Huibers MMH, van Es RJJ, de Bree R, Willems SM. *Droplet digital PCR for detection and quantification of circulating tumor DNA in plasma of head and neck cancer patients*. **BMC Cancer**. 2017;17(1):428.
81. Lissa D, Ishigame T, Noro R, Tucker MJ, Bliskovsky V, Shema S, et al. *HOXA9 methylation and blood vessel invasion in FFPE tissues for prognostic stratification of stage I lung adenocarcinoma patients*. **Lung Cancer**. 2018;122:151-9.
82. *Bio-Rad: Droplet Digital PCR Applications Guide*. [Internet] United

States;Available

from:

https://www.biorad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6407.pdf.

83. Perdomo S, Anantharaman D, Foll M, Abedi-Ardekani B, Durand G, Reis Rosa LA, et al. *Genomic analysis of head and neck cancer cases from two high incidence regions*. **PLoS One**. 2018;13(1):e0191701.

84. de Leng WW, Gadellaa-van Hooijdonk CG, Barendregt-Smouter FA, Koudijs MJ, Nijman I, Hinrichs JW, et al. *Targeted Next Generation Sequencing as a Reliable Diagnostic Assay for the Detection of Somatic Mutations in Tumours Using Minimal DNA Amounts from Formalin Fixed Paraffin Embedded Material*. **PLoS One**. 2016;11(2):e0149405.

85. Cottrell CE, Al-Kateb H, Bredemeyer AJ, Duncavage EJ, Spencer DH, Abel HJ, et al. *Validation of a next-generation sequencing assay for clinical molecular oncology*. **J Mol Diagn**. 2014;16(1):89-105.

86. Begum S, Gillison ML, Ansari-Lari MA, Shah K, Westra WH. *Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin*. **Clin Cancer Res**. 2003;9(17):6469-75.

87. Singhi AD, Westra WH. *Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience*. **Cancer**. 2010;116(9):2166-73.

88. Lima-Costa MF, Rodrigues LC, Barreto ML, Gouveia M, Horta BL, Mambrini J, et al. *Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative)*. **Sci Rep**. 2015;5:9812.

89. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, et al. *The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected*. **PLoS One**. 2011;6(2):e17063.

90. Souza AM, Resende SS, Sousa TN, Brito CFA. *A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population.* **Genet Mol Biol.** 2019;42(3):495-508.
91. German S, Aslam HM, Saleem S, Raees A, Anum T, Alvi AA, et al. *Carcinogenesis of PIK3CA.* **Hered Cancer Clin Pract.** 2013;11(1):5.
92. Hayes DN, Van Waes C, Seiwert TY. *Genetic Landscape of Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer and Comparison to Tobacco-Related Tumors.* **J Clin Oncol.** 2015;33(29):3227-34.
93. Henderson S, Chakravarthy A, Su X, Boshoff C, Fenton TR. *APOBEC-mediated cytosine deamination links PIK3CA helical domain mutations to human papillomavirus-driven tumor development.* **Cell Rep.** 2014;7(6):1833-41.
94. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, Haesevoets A, Snijders PJ, Pawlita M, et al. *A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen.* **Int J Cancer.** 2007;121(11):2465-72.
95. Ozaki T, Nakagawara A. *Role of p53 in Cell Death and Human Cancers.* **Cancers (Basel).** 2011;3(1):994-1013.
96. Pal A, Potjer TP, Thomsen SK, Ng HJ, Barrett A, Scharfmann R, et al. *Loss-of-Function Mutations in the Cell-Cycle Control Gene CDKN2A Impact on Glucose Homeostasis in Humans.* **Diabetes.** 2016;65(2):527-33.
97. Lim SM, Cho SH, Hwang IG, Choi JW, Chang H, Ahn MJ, et al. *Investigating the Feasibility of Targeted Next-Generation Sequencing to Guide the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.* **Cancer Res Treat.** 2019;51(1):300-12.
98. Vettore AL, Ramnarayanan K, Poore G, Lim K, Ong CK, Huang KK, et al. *Mutational landscapes of tongue carcinoma reveal recurrent mutations in genes of therapeutic and prognostic relevance.* **Genome Med.** 2015;7(1):98.

99. Song B, Cui H, Li Y, Cheng C, Yang B, Wang F, et al. *Mutually exclusive mutations in NOTCH1 and PIK3CA associated with clinical prognosis and chemotherapy responses of esophageal squamous cell carcinoma in China.* **Oncotarget.** 2016;7(3):3599-613.
100. Papa A, Pandolfi PP. *The PTEN-PI3K Axis in Cancer.* **Biomolecules.** 2019;9(4).
101. Eze N, Lee JW, Yang DH, Zhu F, Neumeister V, Sandoval-Schaefer T, et al. *PTEN loss is associated with resistance to cetuximab in patients with head and neck squamous cell carcinoma.* **Oral Oncol.** 2019;91:69-78.
102. da Costa A, Costa FD, Araújo DV, Camandaroba MPG, de Jesus VHF, Oliveira A, et al. *The roles of PTEN, cMET, and p16 in resistance to cetuximab in head and neck squamous cell carcinoma.* **Med Oncol.** 2018;36(1):8.
103. Piatto VB, Moreira OAV, Silva MAOMd, Maniglia JV, Pereira MC, Sartorato EL. *Correlação entre dados audiométricos e mutação 35delG em dez pacientes.* **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia.** 2007;73:777-83.
104. Garcia DF, Camelo JS, Jr., Molfetta GA, Turcato M, Souza CF, Porta G, et al. *Clinical profile and molecular characterization of Galactosemia in Brazil: identification of seven novel mutations.* **BMC Med Genet.** 2016;17(1):39.
105. Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, Boccia S, Castellsague X, Chen C, et al. *Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium.* **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2009;18(2):541-50.
106. Tummers B, Green DR. *Caspase-8: regulating life and death.* **Immunol Rev.** 2017;277(1):76-89.
107. Gnesutta N, Minden A. *Death receptor-induced activation of initiator caspase 8 is antagonized by serine/threonine kinase PAK4.* **Mol Cell Biol.** 2003;23(21):7838-

48.

108. *Gene Cards. NFE2L2 Gene (Protein Coding)*. [Internet]; Available from: <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=NFE2L2>.

109.

Human Gene NFE2L2 (uc002ulh.5) Description and Page Index [Internet] 2013; Available from: http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGene?db=hg19&hgq_gene=NFE2L2.

110. Choi M, Kadara H, Zhang J, Parra ER, Rodriguez-Canales J, Gaffney SG, et al. *Mutation profiles in early-stage lung squamous cell carcinoma with clinical follow-up and correlation with markers of immune function*. **Ann Oncol**. 2017;28(1):83-9.

111. Sasaki H, Hikosaka Y, Okuda K, Kawano O, Moriyama S, Yano M, et al. *NFE2L2 gene mutation in male Japanese squamous cell carcinoma of the lung*. **J Thorac Oncol**. 2010;5(6):786-9.

112. Rothenberg SM, Ellisen LW. *The molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma*. **J Clin Invest**. 2012;122(6):1951-7.

113. Akervall J, Bockmühl U, Petersen I, Yang K, Carey TE, Kurnit DM. *The gene ratios c-MYC:cyclin-dependent kinase (CDK)N2A and CCND1:CDKN2A correlate with poor prognosis in squamous cell carcinoma of the head and neck*. **Clin Cancer Res**. 2003;9(5):1750-5.

114. Jayasurya R, Francis G, Kannan S, Lekshminarayanan K, Nalinakumari KR, Abraham T, et al. *p53, p16 and cyclin D1: molecular determinants of radiotherapy treatment response in oral carcinoma*. **Int J Cancer**. 2004;109(5):710-6.

115. Vossen DM, Verhagen CVM, van der Heijden M, Essers PBM, Bartelink H, Verheij M, et al. *Genetic Factors Associated with a Poor Outcome in Head and Neck Cancer Patients Receiving Definitive Chemoradiotherapy*. **Cancers (Basel)**. 2019;11(4).

116. Longo AL, Rettori MM, de Carvalho AC, Kowalski LP, Carvalho AL, Vettore AL. *Evaluation of the methylation profile of exfoliated cell samples from patients with head and neck squamous cell carcinoma.* **Head Neck.** 2014;36(5):631-7.
117. Bettegowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. *Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies.* **Sci Transl Med.** 2014;6(224):224ra24.
118. Huggett JF, Foy CA, Benes V, Emslie K, Garson JA, Haynes R, et al. *The digital MIQE guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Digital PCR Experiments.* **Clin Chem.** 2013;59(6):892-902.
119. Rettori MM, de Carvalho AC, Longo AL, de Oliveira CZ, Kowalski LP, Carvalho AL, et al. *TIMP3 and CCNA1 hypermethylation in HNSCC is associated with an increased incidence of second primary tumors.* **J Transl Med.** 2013;11:316.
120. Thomas GT, Lewis MP, Speight PM. *Matrix metalloproteinases and oral cancer.* **Oral Oncol.** 1999;35(3):227-33.
121. Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. *Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions.* **Eur J of Cell Biol.** 1997;74(2):111–22.
122. Girard F, Strausfeld U, Fernandez A, Lamb NJ. *Cyclin A is required for the onset of DNA replication in mammalian fibroblasts.* **Cell.** 1991;67(6):1169-79.
123. Rivera A, Mavila A, Bayless KJ, Davis GE, Maxwell SA. *Cyclin A1 is a p53-induced gene that mediates apoptosis, G2/M arrest, and mitotic catastrophe in renal, ovarian, and lung carcinoma cells.* **Cell Mol Life Sci.** 2006;63(12):1425-39.
124. Issa IA, Nouredine M. *Colorectal cancer screening: An updated review of the available options.* **World J Gastroenterol.** 2017;23(28):5086-96.

125. Fenizia F, De Luca A, Pasquale R, Sacco A, Forgione L, Lambiase M, et al. *EGFR mutations in lung cancer: from tissue testing to liquid biopsy*. **Future Oncol**. 2015;11(11):1611-23.
126. Iyer P, Zekri AR, Hung CW, Schiefelbein E, Ismail K, Hablas A, et al. *Concordance of DNA methylation pattern in plasma and tumor DNA of Egyptian hepatocellular carcinoma patients*. **Exp Mol Pathol**. 2010;88(1):107-11.
127. Danese E, Minicozzi AM, Benati M, Montagnana M, Paviati E, Salvagno GL, et al. *Epigenetic alteration: new insights moving from tissue to plasma - the example of PCDH10 promoter methylation in colorectal cancer*. **Br J Cancer**. 2013;109(3):807-13.
128. Klein EA, Hubbell E, Maddala T, Aravanis A, Beausang JF, Filippova D, et al. *Development of a comprehensive cell-free DNA (cfDNA) assay for early detection of multiple tumor types: The Circulating Cell-free Genome Atlas (CCGA) study*. **Journal of Clinical Oncology**. 2018;36(15_suppl):12021-.
129. Shen SY, Singhania R, Fehringer G, Chakravarthy A, Roehrl MHA, Chadwick D, et al. *Sensitive tumour detection and classification using plasma cell-free DNA methylomes*. **Nature**. 2018;563(7732):579-83.
130. Hanna GJ, Supplee JG, Kuang Y, Mahmood U, Lau CJ, Haddad RI, et al. *Plasma HPV cell-free DNA monitoring in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer*. **Ann Oncol**. 2018;29(9):1980-6.
131. Garcia J, Forestier J, Dusserre E, Wozny AS, Geiguer F, Merle P, et al. *Cross-platform comparison for the detection of RAS mutations in cfDNA (ddPCR Biorad detection assay, BEAMing assay, and NGS strategy)*. **Oncotarget**. 2018;9(30):21122-31.
132. Howard SC, Jones DP, Pui CH. *The tumor lysis syndrome*. **N Engl J Med**. 2011;364(19):1844-54.

133. Mirrakhimov AE, Ali AM, Khan M, Barbaryan A. *Tumor Lysis Syndrome in Solid Tumors: An up to Date Review of the Literature*. **Rare Tumors**. 2014;6(2):5389.
134. Cairo MS, Bishop M. *Tumour lysis syndrome: new therapeutic strategies and classification*. **Br J Haematol**. 2004;127(1):3-11.
135. Darmon M, Malak S, Guichard I, Schlemmer B. *Síndrome de lise tumoral: uma revisão abrangente da literatura*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. 2008;20:278-85.
136. Elazezy M, Joosse SA. *Techniques of using circulating tumor DNA as a liquid biopsy component in cancer management*. **Comput Struct Biotechnol J**. 2018;16:370-8.

ANEXOS

Anexo A

Parecer consubstanciado do Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção e caracterização de alterações moleculares em amostras de tecido e fluidos corpóreos de pacientes com câncer de cabeça e pescoço

Pesquisador: Ana Carolina de Carvalho

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 80287617.2.0000.5437

Instituição Proponente: Fundação Pio XII

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.438.589

Apresentação do Projeto:

RESUMO

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP), também conhecido como carcinoma de células escamosas ou espinocelular (CEC), tem como principal fator de risco o consumo de álcool e tabaco, além de estar associado a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV), sobretudo em tumores de orofaringe. Estes tumores são comumente associados a altas taxas de incidência, morbidade e mortalidade. Além disso, sua heterogeneidade etiológica molecular e clínica atribui grande complexidade no manejo destes pacientes, que podem evoluir de formas diferentes mesmo quando apresentam lesões similares tratadas da mesma forma. Os frequentes episódios de recidivas locais e desenvolvimento de segundos tumores primários agravam ainda mais o quadro da doença, impactando nas taxas de sobrevida e na qualidade de vida destes pacientes. Portanto, a identificação de marcadores moleculares que permitam uma melhor classificação destes pacientes de acordo com a sua evolução clínica e que possam ser avaliados em fluidos corpóreos, diminuindo a necessidade de realização de biópsias diagnósticas invasivas durante o seguimento destes pacientes, pode melhorar a escolha da conduta clínica em relação ao manejo do paciente. Desta forma, o presente estudo tem por objetivo caracterizar alterações genéticas e epigenéticas

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



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.438.589

em genes específicos em amostras de tumor e fluidos corpóreos de pacientes com CECP tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Câncer de Barretos. Espera-se com os resultados encontrados, ser possível identificar alterações em genes específicos importantes para a carcinogênese nestes tumores e avaliá-los como marcadores de resposta ao tratamento e de monitoramento durante o seguimento destes pacientes, como uma estratégia de melhor escolha da conduta a ser adotada na decisão do tratamento e da forma de seguimento, permitindo melhora na qualidade de vida e nas taxas de sobrevida.

INTRODUÇÃO

Os carcinomas de cabeça e pescoço se encontram entre as dez neoplasias humanas mais frequentes, normalmente relacionados a altas taxas de morbidade e mortalidade, com incidência anual mundial de aproximadamente 630.000 casos (Duvvuri and Myers, 2009; Vigneswaran and Williams, 2014). Segundo o estudo de Shield e colaboradores (2017) utilizando dados do GLOBOCAN, foram estimados para 2012, 529.500 (3,8%) novos casos de CECP e 292.300 (3,6%) óbitos no mundo no período de 2012 (Shield et al., 2017). Estes tumores podem se manifestar na cavidade oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe ou laringe, e 95% destes tumores são do tipo histopatológico de carcinoma de células epidemóides, com surgimento no epitélio escamoso que recobre o trato aerodigestivo superior (Duvvuri and Myers, 2009). O desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço envolve fatores ambientais, alimentares e genéticos. Sabe-se que, nos países desenvolvidos, 75% dos tumores de cabeça e pescoço são causados pelo uso do tabaco e do álcool, considerados os principais fatores de risco da doença, e quando associados podem potencializar os efeitos oncogênicos da mucosa (Shield et al., 2017; Duvvuri and Myers, 2009; Vigneswaran and Williams, 2014). Logo, avaliações médicas de rotina são essenciais para a prevenção do câncer, mas ainda assim não substituem os benefícios da suspensão do tabagismo e etilismo (Saldanha, 2012). Enquanto a taxa de tumores de laringe, cavidade oral e hipofaringe têm diminuído, graças a uma tênue redução desses fatores de risco tradicionais, a incidência dos tumores de orofaringe vem crescendo, com um aumento populacional de 225% entre 1984 e 2004 (Chaturvedi et al., 2011); Leemans, 2011; Saldanha, 2012). Estes podem estar associados a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV), com o contato sexual como principal forma de transmissão. Em países em desenvolvimento, a infecção por HPV está presente em 17% a 56% desses tumores, e em 13% dos casos em países subdesenvolvidos. (Gillison et al., 2008; Shield et al., 2017). Desta forma, duas vias distintas de carcinogênese podem ser observadas em tumores

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.438.589

de cabeça e pescoço: a via associada aos efeitos carcinogênicos do tabaco e a via associada com a infecção pelo HPV. Ambas as vias provocam diversas alterações genéticas e epigenéticas nas diferentes etapas de evolução maligna (Romagosa et al., 2011). O tabaco e o etanol apresentam muitas substâncias químicas potencialmente carcinogênicas (como o acetaldeído, N-nitrosaminas e uretano), que podem aumentar a permeabilidade a outros carcinógenos ou lesionar diretamente as células da mucosa (Castellsague et al., 2004). Já o processo de malignização celular relacionada a infecção pelo HPV é mediado pelas oncoproteínas virais E6 e E7. A associação da oncoproteína E6 com a proteína ubiquitina-ligase E3, induz a degradação da proteína supressora tumoral p53, causando a desregulação dos pontos de parada do ciclo celular G1/S e G2/M além de outros eventos que levam a instabilidade genômica como o não recrutamento do sistema de reparo e a inibição da indução de morte celular. Já a oncoproteína E7 promove a degradação por ubiquitinação da proteína retinoblastoma (pRb), que também contribui para o desequilíbrio da fase G1/S, bem como a liberação dos fatores de transcrição E2F com conseguinte transcrição dos genes da fase S e indução da proliferação. A proteína pRb regula negativamente a expressão de p16, proteína inibidora de quinase dependente de citidina. Assim, a inativação de pRb leva ao aumento de p16, observado em tumores HPV positivos (Alazawi et al., 2002; Parkin et al., 2005; Dyson et al., 1989; Lingen et al., 2013). Estudos apontam algumas diferenças clínicas, biológicas e epidemiológicas entre pacientes com CECP HPV positivos e HPV negativos. Epidemiologicamente, os casos HPV negativos geralmente são representados por indivíduos com mais de 60 anos de idade que fazem uso excessivo de tabaco e álcool e com um prognóstico desfavorável. Já os casos positivos para HPV compreendem pacientes do sexo masculino, jovens, não-tabagistas (ou com baixa carga tabágica) e não-etilistas, com tumores com estadiamento entre III ou IV, com T inicial e categoria N avançada, além de possuírem metástases linfonodais e císticas em vários níveis (Chaturvedi et al., 2011; Gillison et al., 2000a; Gillison et al., 2008; Goldenberg et al., 2008; Hafkamp et al., 2008). Parte desses pacientes apresenta melhor resposta ao tratamento e uma boa evolução, entretanto alguns casos podem apontar uma evolução desfavorável, se assemelhando com aqueles indivíduos com negatividade para a infecção viral (Ang et al., 2010). Em geral, CECP HPV positivos estão associados a um perfil molecular caracterizado pela presença de TP53 selvagem, baixos níveis de pRb e aumento da expressão de p16. Já os tumores HPV negativos frequentemente apresentam mutações no gene TP53, níveis aumentados de pRb e p16 hipoexpressa devido às mutações pontuais, metilação e deleção homozigótica deste gene. Gillison et al., através de estudo retrospectivo sobre o papel etiológico do HPV em CECP, verificou que, em uma coorte de 253 pacientes, o gene TP53 se apresentou mutado em 63% dos casos de tumores

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



negativos para o HPV e em apenas 10% dos casos positivos para o vírus, confirmando tal caracterização (Boyle et al., 1993; Gillison et al., 2000; Hafkamp et al., 2008; Psyrris et al., 2011; Reed et al., 1996). Considerando que os CECP são altamente heterogêneos em relação à sua etiologia, evolução clínica e prognóstico, existe um interesse crescente em investigar se tal heterogeneidade pode ser atribuída a diferenças moleculares. A busca por alterações somáticas que influenciam a iniciação, manutenção e progressão de tumores é uma ferramenta útil na identificação de características específicas que auxiliem na definição de subgrupos de pacientes com evoluções clínicas distintas e na identificação de novos alvos terapêuticos. Recentemente, um melhor entendimento da progressão molecular dos CECP tem sido possível através da publicação de estudos que caracterizaram o espectro de mutações de CECP através do sequenciamento completo do exoma de aproximadamente 300 amostras destes tumores (Agrawal et al., 2011; Lui et al., 2013; Pickering et al., 2013; Stransky et al., 2011). Estes estudos mostraram que os CECP são caracterizados por um alto grau de heterogeneidade intertumoral, confirmando sua complexidade biológica, e foram capazes de identificar genes supressores tumorais e oncogenes frequentemente mutados, cuja desregulação afeta vias de sinalização críticas para a integridade genômica e a diferenciação do epitélio, podendo representar eventos genéticos dominantes na carcinogênese dos CECP (Mountzios et al., 2014). Os dados destes trabalhos validaram o papel dominante de alguns genes pertencentes a vias envolvidas no processo de patogênese destes tumores, incluindo P16, PTEN, RB1 e TP53 (supressores tumorais); PIK3CA e HRAS (transdução de sinal); NOTCH1, TP63 e IRF6 (desenvolvimento e manutenção do epitélio estratificado); FBXW7 (ubiquitinação); NSD1, EZH2 e MLL2 (metilação de histonas); CASP8 (apoptose, necrose, inflamação) e FAT1 (polarização e migração celular) (Agrawal et al., 2011; Kandoth et al., 2013; Lui et al., 2013; Pickering et al., 2013; Stransky et al., 2011). Mais recentemente, 279 casos de tumores de cabeça e pescoço foram avaliados pelo The Cancer Genome Atlas (TCGA) e compilados em uma publicação. O TCGA é um consórcio coordenado pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI) e o Instituto Nacional de Pesquisas do Genoma Humano (NHGRI), que tem como objetivo uma melhor caracterização genômica na área oncológica, contendo informações de 33 tipos de câncer até o momento. Em CECP, os resultados confirmam a relevância de muitos dos genes encontrados nos estudos anteriores para o processo de carcinogênese dos tumores de CP (Cancer Genome Atlas, 2015). Além disso, o estudo publicado por Agrawal e colaboradores e o publicado pelo TCGA realizaram a comparação do perfil de mutações entre tumores HPV positivos e negativos e verificaram que a frequência de mutações nos casos positivos para HPV é inferior quando comparada aos HPV negativos. Provavelmente, os tumores associados ao tabaco apresentam um

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



acúmulo de alterações genéticas necessárias para que ocorra o processo de carcinogênese, já que nestes casos, não há o efeito oncogênico do vírus nessas células (Agrawal et al., 2011). Contudo, o estudo de Lui e colaboradores encontrou mutações no gene PIK3CA em 20% dos pacientes com CECP HPV-positivos, enquanto o artigo do TCGA encontrou este gene mutado em 56% dos casos HPV-positivos e em apenas 34% dos casos HPV-negativos (Lui et al., 2013; Cancer Genome Atlas N, 2015). Estes dados sugerem que o processo de malignização celular de uma parcela dos tumores HPV-positivos seja induzido pela atividade das oncoproteínas virais, levando a mutações deste gene e a perda de função de p53 e pRb (Lui et al., 2013). Outra alteração molecular comumente encontrada em tumores de cabeça e pescoço é a metilação aberrante de genes supressores tumorais. A metilação do DNA é uma alteração epigenética que consiste em uma modificação química reversível no material genético que altera a estrutura da cromatina, e, dessa forma, provoca a inibição da transcrição de alguns genes. Esse evento consiste na adição de um radical metil (CH₃) em bases nitrogenadas citosinas (C) localizadas a 5' de guaninas (G), principalmente nas ilhas CpG (regiões com dinucleotídeos "CG", localizadas nas regiões promotoras dos genes), cuja reação é catalisada pelas enzimas DNA metil-transferases (DNMTs) (Schuebel et al., 2007; Baylin et al., 2001; Esteller, 2000). Em tumores, a hipermetilação é mais recorrente do que a hipometilação, bloqueando a transcrição de genes supressores tumorais, além de genes associados à metástase, ao reparo do DNA, ao controle da angiogênese e ao ciclo celular (Esteller et al., 2001). Observou-se recentemente que aproximadamente 5% da região promotora de alguns genes conhecidos se encontravam hipermetilados em tumores sólidos (Oliveira et al., 2010; Schuebel et al., 2007). A análise do status de metilação dos genes CCNA1, TIMP3, DAPK e DCC, relevantes ao processo de carcinogênese tem sido avaliada em CECP por diversos grupos. Os resultados mostram que a metilação destes genes está envolvida com o processo de carcinogênese nestes tumores, inclusive, estando associada com o prognóstico destes pacientes (Carvalho et al., 2006; Carvalho et al., 2011; Rettori et al., 2013). A biópsia líquida é definida pela utilização de fluidos corpóreos (sangue, urina, saliva dentre outros) contendo material genético proveniente da região tumoral e tem sido útil na busca por biomarcadores para uma gama de malignidades, bem como em CECP. Estes trabalhos têm como principal objetivo identificar nestes fluidos, alterações específicas de células tumorais, possibilitando o monitoramento da doença nestes indivíduos, seja para avaliar a resposta ao tratamento proposto ou para identificar, de forma precoce, recidivas e novos tumores primários. A biópsia líquida tem como principal vantagem em relação à biópsia de tecido, a avaliação de marcadores moleculares através de técnicas de alta acurácia em amostras coletadas de forma pouco invasiva durante o seguimento destes pacientes. Sabendo-se que as

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



Continuação do Parecer: 2.438.589

alterações moleculares muitas vezes precedem as alterações detectáveis por métodos histopatológicos, testes moleculares em biópsia líquida tornam possível a detecção de alterações câncer-específicas antes que os pacientes tenham sintomas, aumentando as chances de detecção de novos tumores ainda em fase inicial e reduzindo a necessidade de biópsias teciduais para o estabelecimento de diagnósticos (Wang et al., 2015). Técnicas altamente sensíveis, como PCR digital e sequenciamento de nova geração (NGS), normalmente são empregadas complementarmente para a análise quantitativa de amostras contendo DNA e RNA que se desprenderam das células, exossomas e células tumorais circulantes (CTCs), destacando a alta precisão destas técnicas na detecção de prováveis mutações ou variantes somáticas (Siravegna et al., 2017). Wang e colaboradores exploraram o potencial da detecção de DNA tumor-específico como biomarcador para CECP através da análise de amostras de tumor, saliva e plasma de 93 pacientes. Os autores buscaram nas amostras de fluidos corpóreos a presença de alterações somáticas e de DNA do vírus do papiloma humano e identificaram estas alterações em 96% dos 47 pacientes avaliados, sendo 10 casos com tumores iniciais e 37 avançados. Quando as análises foram segregadas por sítio, o DNA do tumor foi detectado em 100% (n = 15), 91% (n = 22), 100% (n = 7) e 100% (n = 3) de pacientes com tumores de cavidade oral, orofaringe, laringe e hipofaringe, respectivamente. Na saliva, o DNA tumoral foi encontrado em 100% dos pacientes com câncer de cavidade oral e em 47 a 70% dos pacientes com câncer de outros sítios. No plasma, o DNA do tumor foi encontrado em 80% dos pacientes com câncer de cavidade oral e em 86 a 100% dos pacientes com câncer de outros sítios. Além disso, o DNA tumoral na saliva foi encontrado em amostras coletadas pós-cirurgia em três pacientes antes do diagnóstico clínico de recorrência, mas em nenhum dos cinco pacientes sem recorrência (Wang et al., 2015). A identificação de marcadores moleculares que possam classificar estes pacientes de acordo com sua evolução e a possibilidade de seguimento, pode contribuir para o melhor manejo destes indivíduos e possibilitar a detecção precoce de novos tumores. Sendo assim, este estudo se propõe a analisar o perfil de metilação e mutação de genes específicos em amostras tumorais de CECP e associar estas alterações com informações clínicas destes pacientes. Além disso, será avaliada a possibilidade de detecção das alterações moleculares encontradas nos tumores, em amostras de biópsia líquida (plasma e saliva) coletadas antes do tratamento destes mesmos pacientes. Os tumores de cabeça e pescoço são frequentemente associados a altas taxas de morbidade e mortalidade no mundo. Apesar dos recentes avanços no entendimento da epidemiologia e da patogênese e nas modalidades de tratamento dos CECP, as taxas de sobrevida

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hccancerbarretos.com.br



HOSPITAL DO CÂNCER DE BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO XII



Continuação do Parecer: 2.438.589

têm melhorado pouco nos últimos 40 anos (Gupta et al., 2009). O aumento no número de casos de CECP em indivíduos mais jovens, a grande necessidade de terapias com efeitos tóxicos mais agressivos, como a quimio-radioterapia, o comprometimento funcional e estético provocado por procedimentos cirúrgicos complexos e o frequente desenvolvimento de recidivas, muitas vezes fatais, são os fatores determinantes da necessidade de um melhor entendimento das alterações moleculares envolvidas com a carcinogênese destes tumores. Atualmente, os médicos dependem primariamente do estadiamento tumoral para tomar decisões em relação à melhor escolha terapêutica para pacientes com câncer de cabeça e pescoço. No entanto, pacientes com tumores em mesma localização e com o mesmo estadiamento e tratados com um mesmo protocolo podem apresentar evoluções distintas. Além disso, a detecção de recidivas e novos tumores primários durante o seguimento destes pacientes ocorre, muitas vezes, quando estas lesões já se apresentam num estágio muito avançado, diminuindo as chances de tratamento curativo. A heterogeneidade dos CECP quanto à sua biologia, evolução clínica e prognóstico está frequentemente associada às falhas no tratamento e na detecção precoce de novos tumores. Desta forma, a caracterização molecular destes tumores e a identificação de marcadores moleculares que melhor caracterizem estes pacientes em subgrupos de acordo com sua evolução clínica e que possam ser detectados em fluidos corpóreos, sem a necessidade de biópsias teciduais, pode auxiliar no manejo mais adequado destes indivíduos. Além disso, nenhum trabalho realizou a caracterização molecular de uma série de alvos moleculares em amostras de tumor de cabeça e pescoço da população brasileira da forma como é proposta neste estudo. Levando-se em conta que, a população de pacientes brasileiros com tumores de cabeça e pescoço apresenta características distintas de outras populações comumente avaliadas em estudos como este. Pacientes com estadiamento avançado, diminuindo as chances de cura. Além disso, enquanto em outros países tem sido observada uma diminuição no hábito de tabagismo, a maioria dos pacientes tratados no Hospital de Câncer de Barretos são tabagistas. Diante disso, este estudo pretende identificar prováveis biomarcadores moleculares de pacientes portadores de CECP de uma população de pacientes tratados nesta instituição em amostras de tumor e de fluidos corpóreos, visando uma melhor caracterização de subgrupos com diferente prognóstico e a detecção de alterações câncer-específicas em amostras coletadas de forma não-invasiva. Espera-se que os resultados obtidos possam ser utilizados na prática clínica para um melhor delineamento do prognóstico, diagnóstico precoce e seguimento, para que seja possível conceder uma melhor qualidade de vida e sobrevida aos pacientes.

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br



HIPÓTESE

Os tumores de cabeça e pescoço são frequentemente associados a altas taxas de morbidade e mortalidade no mundo. Apesar dos recentes avanços no entendimento da epidemiologia e da patogênese e nas modalidades de tratamento dos CECP, as taxas de sobrevivência têm melhorado pouco nos últimos 40 anos (Gupta et al., 2009). O aumento no número de casos de CECP em indivíduos mais jovens, a grande necessidade de terapias com efeitos tóxicos mais agressivos, como a quimio-radioterapia, o comprometimento funcional e estético provocado por procedimentos cirúrgicos complexos e o frequente desenvolvimento de recidivas, muitas vezes fatais, são os fatores determinantes da necessidade de um melhor entendimento das alterações moleculares envolvidas com a carcinogênese destes tumores. Atualmente, os médicos dependem primariamente do estadiamento tumoral para tomar decisões em relação à melhor escolha terapêutica para pacientes com câncer de cabeça e pescoço. No entanto, pacientes com tumores em mesma localização e com o mesmo estadiamento e tratados com um mesmo protocolo podem apresentar evoluções distintas. Além disso, a detecção de recidivas e novos tumores primários durante o seguimento destes pacientes ocorre, muitas vezes, quando estas lesões já se apresentam num estágio muito avançado, diminuindo as chances de tratamento curativo. A heterogeneidade dos CECP quanto à sua biologia, evolução clínica e prognóstico está frequentemente associada às falhas no tratamento e na detecção precoce de novos tumores. Desta forma, a caracterização molecular destes tumores e a identificação de marcadores moleculares que melhor caracterizem estes pacientes em subgrupos de acordo com sua evolução clínica e que possam ser detectados em fluidos corpóreos, sem a necessidade de biópsias teciduais, pode auxiliar no manejo mais adequado destes indivíduos. Além disso, nenhum trabalho realizou a caracterização molecular de uma série de alvos moleculares em amostras de tumor de cabeça e pescoço da população brasileira da forma como é proposta neste estudo. Levando-se em conta que, a população de pacientes brasileiros com tumores de cabeça e pescoço apresenta características distintas de outras populações comumente avaliadas em estudos como este. Pacientes com tumores de cabeça e pescoço no Brasil geralmente são diagnosticados com tumores em estadiamento avançado, diminuindo as chances de cura. Além disso, enquanto em outros países tem sido observada uma diminuição no hábito de tabagismo, a maioria dos pacientes tratados no Hospital de câncer de Barretos são tabagistas. Diante disso, este estudo pretende identificar prováveis biomarcadores moleculares de pacientes portadores de CECP de uma população de pacientes tratados nesta instituição em amostras de tumor e de fluidos corpóreos, visando uma melhor caracterização de

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



Continuação do Parecer: 2.438.589

subgrupos com diferente prognóstico e a detecção de alterações câncer-específicas em amostras coletadas de forma não-invasiva. Espera-se que os resultados obtidos possam ser utilizados na prática clínica para um melhor delineamento do prognóstico, diagnóstico precoce e seguimento, para que seja possível conceder uma melhor qualidade de vida e sobrevida aos pacientes.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO PRIMÁRIO

Caracterizar alterações genéticas e epigenéticas de genes específicos em amostras de tumor e fluidos corpóreos de pacientes com CECP, tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Câncer de Barretos.

OBJETIVO SECUNDÁRIO

1. Caracterizar alterações moleculares baseadas em metilação e mutação de genes específicos selecionados por sua relevância no processo de carcinogênese em amostras de tumor de pacientes acometidos por CECP.
2. Verificar se existe associação entre o perfil de metilação e de mutações encontrado nas amostras tumorais e as características clínicas destes pacientes.
3. Avaliar a viabilidade de detecção de alterações moleculares encontradas nas amostras de tumor avaliadas em amostras de plasma e saliva coletadas destes mesmos pacientes antes do tratamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS

Sob o ponto de vista ético, o estudo confere risco mínimo, caracterizado pela quebra eventual de sigilo. Contudo os pesquisadores comprometem-se a preservar a privacidade dos participantes de pesquisa, garantindo que os dados coletados serão utilizados única e exclusivamente para a execução do projeto em questão, e que as informações divulgadas, de maneira nenhuma identifiquem o participante de pesquisa.

BENEFÍCIOS

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



Continuação do Parecer: 2.438.589

Não há benefício direto para o paciente participante do estudo. O potencial benefício do estudo para a sociedade é a melhor caracterização das alterações moleculares dos tumores de cavidade oral e orofaringe, sua possível associação com características clínicas dos pacientes e a possibilidade de detectá-las em fluidos corpóreos, podendo viabilizar a utilização das metodologias aqui utilizadas na prática clínica visando um melhor manejo destes pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- Projeto bem escrito e bem embasado cientificamente;

- Trata-se de um estudo observacional com coleta retrospectiva que será desenvolvido no Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM). Será avaliada uma amostra de conveniência composta por 50 amostras de tumor (cavidade oral e orofaringe) submetidos a tratamento de CECP no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital de Câncer de Barretos de 2010 a 2015 (pacientes com idade superior a 18 anos);

- Serão incluídos pacientes com amostras disponíveis no Biobanco desta instituição (tecido tumoral, buffy coat, saliva (somente para os tumores em cavidade oral) e plasma (somente para os tumores de orofaringe).

- Dados clínicos dos pacientes incluídos, assim como levantamento de dados demográficos e de hábitos de vida serão adquiridas por pesquisa em prontuários e preenchimento de uma ficha para coleta de dados clínicos e demográficos;

- Metodologia: painel genico (14 genes) em material germinativo (fins de comparação) e somático; qMSP quantitativa (metilação de 5 genes); PCR digital em saliva e plasma para avaliação de alterações moleculares identificadas no tumor;

- Foi solicitada a dispensa de TCLE sob a seguinte justificativa: "Solicita-se ao Comitê de Ética desta instituição a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em razão desta pesquisa apresentar caráter retrospectivo e ainda representar riscos mínimos para os participantes, sendo estes inerentes a quebra acidental da confidencialidade dos dados, e por tratar de levantamento de dados junto à prontuários e não ser possível o contato com os

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



Continuação do Parecer: 2.438.589

participantes de pesquisa selecionados. Além disso, como descrito anteriormente, as amostras já foram coletadas e encontram-se armazenadas no Biobanco desta instituição."

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram adequadamente apresentados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem óbices éticos.

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP:

1. Relatórios semestrais, sendo o primeiro previsto para 14/06/2018.
2. Comunicar toda e qualquer alteração do Projeto e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Nestas circunstâncias a inclusão de participantes deve ser temporariamente interrompida até a aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.
3. Comunicar imediatamente ao Comitê qualquer Evento Adverso Grave ocorrido durante o desenvolvimento do estudo.
4. Para projetos que utilizam amostras criopreservadas, procurar o BIOBANCO para início do processamento.
5. Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos, após conclusão da pesquisa, para possível auditoria dos órgãos competentes.
6. Este projeto está cadastrado no CEP-HCB sob o número 1506/2017.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

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



HOSPITAL DO CÂNCER DE
BARRETOS / FUNDAÇÃO PIO
XII



Continuação do Parecer: 2.438.589

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1026654.pdf	21/11/2017 15:19:56		Aceito
Declaração de Pesquisadores	declaracaopesquisador.jpg	21/11/2017 15:14:33	Laís Machado de Jesus	Aceito
Outros	CASOSBIOBANCO.xlsx	18/11/2017 18:01:52	Laís Machado de Jesus	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOPLATAFORMABRASIL.pdf	18/11/2017 17:59:37	Laís Machado de Jesus	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	mabinplataforma.pdf	18/11/2017 17:58:31	Laís Machado de Jesus	Aceito
Outros	declaracaocienciaestudo.jpg	14/11/2017 11:44:43	Laís Machado de Jesus	Aceito
Outros	declaracaofinanciamento.jpg	14/11/2017 11:42:56	Laís Machado de Jesus	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	14/11/2017 11:40:32	Laís Machado de Jesus	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BARRETOS, 14 de Dezembro de 2017.

Assinado por:

Maicon Fernando Zanon da Silva
(Coordenador)

Endereço: Rua Antenor Duarte Vilela, 1331

Bairro: Dr. Paulo Prata

CEP: 14.784-400

UF: SP

Município: BARRETOS

Telefone: (17)3321-0347

Fax: (17)3321-6600

E-mail: cep@hcancerbarretos.com.br

Anexo B

Ficha para coleta de dados clínicos e demográficos (CEC orofaringe).

Hospital Câncer Barretos - Cirurgia de Cabeça e Pescoço

1	Registro Hospitalar	1	
2	Nome	2	
3	Data de nascimento	3	
			DD/MM/AA
4	Sexo	4	
			1-Masculino 2-Feminino
5	Raça	5	
			1-Branca 2-Amarela 3-Negra 8-Outro 99-Ignorado
6	Tabagismo	6	
			0-Não 1-Sim 99-Ignorado
7	Etilismo	7	
			0-Não 1-Sim 99-Ignorado
8	Data admissão	8	
			DD/MM/AA
9	Biópsia pré-tratamento	9	
			0-Não fez 1-Sim 99-Ignorado
10	Número AP Biópsia	10	
11	Subtipo Histológico	10	
12	Local do tumor	10	
			CID
13	Estadiamento T	11	
			0-T0 1-T1 2-T2 3-T3 4-T4a 5-T4b 6-TX 99-Ignorado
14	Estadiamento N	12	
			0-N0 1-N1 2-N2a 3-N2b 4-N2c 5-N3 6-NX 99-Ignorado
15	Estadiamento M	13	
			0-M0 1-M1 3-MX 99-Ignorado
16	Tratamento inicial realizado	14	
			0-Não tratou 1-Cirurgia 2- Qt neo ou indução 3- Concomitância (RT/QT) 4- RT exclusiva 99-Ignorado
17	Intenção do tratamento	15	
			1-Curativa 2-Paliativa
18	Data início tratamento	16	
			DD/MM/AA
19	Protocolo de Preservação de órgãos		
			1-Sim 2-Não
20	QT indução	17	
			0-Não Fez 1- CDDP + paclitaxel 2- outro
21	Número de ciclos de Qt indução		

22	Data Início Qt indução		
23	Data Término Qt indução		
24	Resposta RECIST sítio primário 0-RC 1-RP 2- DE 3- PD 88- não se aplica 99-Ignorado		
25	Resposta RECIST pescoço 0-RC 1-RP 2- DE 3- PD 88- não se aplica 99-Ignorado		
25	QT concomitância 0-Não Fez 1- cisplatina 2- carboplatina 3- outro		

Anexo C

Ficha para coleta de dados clínicos e demográficos (CEC cavidade oral).

Hospital Câncer Barretos - Cirurgia de Cabeça e Pescoço

1	Registro Hospitalar		1	
2	Nome		2	
3	Data de nascimento	DD/MM/AA	3	
4	Sexo	1-Masculino 2-Feminino	4	
5	Raça	1-Branca 2-Amarela 3-Negra 8-Outro 99-Ignorado	5	
6	Tabagismo	0-Não 1-Sim 99-Ignorado	6	
7	Etilismo	0-Não 1-Sim 99-Ignorado	7	
8	Data admissão	DD/MM/AA	8	
9	Traqueostomia prévia	0-Não 1-Sim 99-Ignorado	9	
10	Local do tumor	CID	10	
11	Estadiamento T	0-T0 1-T1 2-T2 3-T3 4-T4a 5-T4b 6-TX 99-Ignorado	11	
12	Estadiamento N	0-N0 1-N1 2-N2a 3-N2b 4-N2c 5-N3 6-NX 99-Ignorado	12	
13	Estadiamento M	0-M0 1-M1 3-MX 99-Ignorado	13	
14	Tratamento realizado	0-Não 1-Cirurgia 2-Rxt 3-QT 4-Outro	14	
15	Intenção do tratamento	1-Curativa 2-Paliativa	15	
16	Data início tratamento	DD/MM/AA	16	
17	Radioterapia	0-Não 1-Pré 2-Pós 3 -Exclusiva 88-Não Especificado	17	
18	Dose	cgj	18	

19	Data início Rxt DD/MM/AA	19	
20	Data final Rxt DD/MM/AA	20	
21	Quimioterapia 0-Não 1-Adjuvante 2-Neoadjuvante 3-Concomitante Rxt 4-Exclusiva 88-Não Especificado	21	
22	Cirurgia do tumor primário 0-Não Realizou 1-Ressecção 2- Ressecção + esvaziamento cervical	22	
23	Esvaziamento ipsilateral 0-Não 1-Radical 2-Radical Modificado 3-Seletivo 4-Outro _____	23	
24	Esvaziamento contralateral 0-Não 1-Radical 2-Radical Modificado 3-Seletivo 4- Outro _____	24	
25	Data da cirurgia 88-Não Realizou Cirurgia	25	
26	Margens: 1-Livres 2-Próximas 3-Comprometidas 4-Não Operado	26	
27	Invasão perineural 0-Não 1-Sim 99-Ignorado	27	
28	Invasão vascular 0-Não 1-Sim 99-Ignorado	28	
29	Total de linfonodos posit. IPSI 99-Se Não Esvaziou	29	
30	Total de linfonodos posit. Contral. 99-Se Não Esvaziou	30	
31	Ruptura capsular 0-Nod. Neg. 1-Não 2-Sim 99-Ignorado	31	
32	Número AP	32	
33	Recorrência 0-Não 1-Sim 99-Ignorado	33	
34	Data da recorrência DD/MM/AA	34	
35	Local da recorrência 0-Não 1-Local 2-Pescoço Homo 3-Pescoço Contra 4-Traqueostoma 5-Meta Pulmão 6-Axila 7-Osso 8-Outro 99-Ignorado	35	
36	Tratamento da recorrência 0-Não Teve Rec. 1-RHD 2-Cirurgia resgate 3-Esv. cerv. 4-Ressec. Meta Pulmão 5-Rxt 6-QT 7- Outro 88-Não Especificado	36	
37	Segunda neoplasia 0-Não 1-Sim 99-Ignorado	37	
38	Data da 2ª neoplasia DD/MM/AA	38	
39	Topografia 2ª neoplasia CID.0	39	

40	Tratamento do segundo primário 0- Não; 1- Rxt; 2- Qt; 3- Cirurgia; 4- RHD	40	
41	Data da última informação DD/MM/AA	41	
42	Status nesta data 1- Vivo Sem Doença; 2- Vivo Com Doença; 3- Morte Pós-Op; 4- Morte Por Ca; 5- Morte Por Outras Causas	42	
43	Perdido de vista 0- Não; 1- Sim	43	

Anexo D

Lista de variantes (CEC cavidade oral).

Sample_name	Gene_symbol	Start	Chr	cdna	protein	Change_type
ESO-03	<i>WRN</i>	30982473	8	c.2782G>A	p.G928R	Missense
ESO-10	<i>WHSC1</i>	1976605	4	c.3388G>A	p.A1130T	Missense
ESO-03	<i>TP53</i>	7578406	17	c.524G>A	p.R175H	Missense
ESO-04	<i>TP53</i>	7577106	17	c.832C>A	p.P278T	Missense
ESO-05	<i>TP53</i>	7578188	17	c.658_660delTAT	p.Y220delY	InFrameDeletion
ESO-05	<i>TP53</i>	7578190	17	c.659A>G	p.Y220C	Missense
ESO-08	<i>TP53</i>	7577551	17	c.730G>T	p.G244C	Missense
ESO-09	<i>TP53</i>	7577568	17	c.713G>A	p.C238Y	Missense
ESO-12	<i>TP53</i>	7579538	17	c.148delA	p.I50Lfs*73	Frameshift
ESO-12	<i>TP53</i>	7579414	17	c.273G>A	p.W91*	Nonsense
ESO-16	<i>TP53</i>	7578271	17	c.578A>G	p.H193R	Missense
ESO-23	<i>TP53</i>	7579407	17	c.257_279delCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCCTG	p.A86Vfs*55	Frameshift
ESO-25	<i>TP53</i>	7578190	17	c.659A>G	p.Y220C	Missense
ESO-10	<i>SYK</i>	93639989	9	c.1318G>A	p.E440K	Missense
ESO-10	<i>STAT3</i>	40491346	17	c.454C>T	p.R152W	Missense
ESO-10	<i>SETD2</i>	47144879	3	c.4874G>A	p.R1625H	Missense
ESO-10	<i>RASA1</i>	86685244	5	c.2961_2967dupTAGAACG	p.D990*fs*1	Nonsense
ESO-16	<i>PTCH1</i>	98229650	9	c.2308C>T	p.R770*	Nonsense
ESO-23	<i>PRKAA1</i>	40764619	5	c.1477G>T	p.D493Y	Missense

ESO-09	<i>POLR2B</i>	57860678	4		c.352C>G	p.L118V	Missense
ESO-25	<i>PIK3CA</i>	178936094	3		c.1636C>G	p.Q546E	Missense
ESO-12	<i>NOTCH2</i>	120464968	1		c.5104C>T	p.R1702*	Nonsense
ESO-06	<i>NOTCH1</i>	139396743	9		c.5365G>T	p.E1789*	Nonsense
ESO-10	<i>NOTCH1</i>	139412624	9	c.1204_1219del	ITCGGGGTACACGGGCC	p.S402Rfs*224	Frameshift
ESO-09	<i>NFE2L2</i>	178098944	2		c.101G>C	p.R34P	Missense
ESO-10	<i>MYC</i>	128750945	8		c.482C>T	p.S161L	Missense
ESO-10	<i>MGA</i>	42052659	15		c.7330G>A	p.E2444K	Missense
ESO-10	<i>MCC</i>	112421001	5		c.1405G>C	p.E469Q	Missense
ESO-16	<i>MAP3K13</i>	185146396	3		c.27C>G	p.S9R	Missense
ESO-12	<i>MAGI2</i>	77797415	7		c.2414G>C	p.G805A	Missense
ESO-08	<i>MACF1</i>	39917952	1		c.14366G>A	p.S4789N	Missense
ESO-05	<i>LATS1</i>	150004419	6	c.1801_1805del	GATAG	p.D601Wfs*3	Frameshift
ESO-03	<i>KMT2D</i>	49426771	12	c.11714_11716del	IAGC	p.Q3905delQ	InFrameDeletion
ESO-03	<i>KMT2D</i>	49427265	12	c.11220_11222del	IACA	p.Q3745delQ	InFrameDeletion
ESO-06	<i>KMT2D</i>	49426905	12	c.11580_11582del	IACA	p.Q3863delQ	InFrameDeletion
ESO-08	<i>KMT2D</i>	49426905	12	c.11580_11582del	IACA	p.Q3863delQ	InFrameDeletion
ESO-16	<i>KMT2D</i>	49431290	12	c.9846_9848del	IACA	p.Q3282delQ	InFrameDeletion
ESO-09	<i>KMT2C</i>	151873503	7	c.9020_9034del	GAAAACCTGCAACTC	p.G3007_Q3012delinsE	MultiAAMissense
ESO-10	<i>KMT2C</i>	151877860	7		c.7085C>G	p.S2362*	Nonsense
ESO-04	<i>KCNJ5</i>	128786518	11	c.1153_1154del	ICT	p.L385Afs*6	Frameshift
ESO-04	<i>KCNJ5</i>	128786522	11	c.1156_1157ins	AG	p.L386Qfs*50	Frameshift
ESO-08	<i>INPP4B</i>	143003202	4		c.2624C>T	p.A875V	Missense
ESO-16	<i>HSPA8</i>	122930666	11		c.635T>G	p.I212S	Missense
ESO-16	<i>HSPA8</i>	122930669	11		c.632C>A	p.T211N	Missense
ESO-07	<i>HNF1A</i>	121432116	12		c.863_864insC	p.P289Afs*28	Frameshift

ESO-10	<i>HNF1A</i>	121432116	12		c.863_864insC	p.P289Afs*28	Frameshift
ESO-12	<i>HLA-A</i>	29911320	6		c.619G>T	p.D207Y	Missense
ESO-25	<i>HLA-A</i>	29911267	6		c.566T>A	p.V189E	Missense
ESO-06	<i>H3F3A</i>	226259113	1		c.344C>G	p.A115G	Missense
ESO-08	<i>H3F3A</i>	226259113	1		c.344C>G	p.A115G	Missense
ESO-25	<i>H3F3A</i>	226259113	1		c.344C>G	p.A115G	Missense
ESO-09	<i>FRG1</i>	190878562	4		c.442G>C	p.A148P	Missense
ESO-04	<i>FBXO11</i>	48132660	2	c.179_199delCGCCACCGCCGCCTCCGCCGC		p.P60_P66delPPPPPPP	InFrameDeletion
ESO-10	<i>FAT2</i>	150948075	5		c.418G>C	p.D140H	Missense
ESO-04	<i>FAT1</i>	187532582	4		c.9810_9811insT	p.S3271*fs*1	Nonsense
ESO-04	<i>FAT1</i>	187532584	4		c.9809T>A	p.I3270K	Missense
ESO-10	<i>FAT1</i>	187542474	4		c.5266C>T	p.Q1756*	Nonsense
ESO-23	<i>FAT1</i>	187524687	4		c.10993C>T	p.R3665*	Nonsense
ESO-04	<i>EP300</i>	41560097	22	c.3771_3779delCTGTGTCT		p.C1258_L1260delCVL	InFrameDeletion
ESO-05	<i>DAXX</i>	33287897	6		c.1353_1355delGGA	p.E457delE	InFrameDeletion
ESO-23	<i>CYLD</i>	50783766	16		c.157C>T	p.R53C	Missense
ESO-10	<i>CTCF</i>	67660615	16		c.1516delC	p.Q506Rfs*5	Frameshift
ESO-03	<i>CSDE1</i>	115273168	1		c.1289dupA	p.L431Afs*6	Frameshift
ESO-08	<i>CLTC</i>	57760610	17		c.4028T>A	p.V1343E	Missense
ESO-08	<i>CLOCK</i>	56304529	4	c.2278_2280delCAG		p.Q760delQ	InFrameDeletion
ESO-16	<i>CLOCK</i>	56304529	4	c.2278_2280delCAG		p.Q760delQ	InFrameDeletion
ESO-03	<i>CHD8</i>	21871264	14		c.3626C>T	p.T1209I	Missense
ESO-23	<i>CHD6</i>	40162005	20		c.238A>T	p.N80Y	Missense
ESO-25	<i>CHD6</i>	40162005	20		c.238A>T	p.N80Y	Missense
ESO-09	<i>CHD2</i>	93552514	15		c.4553A>T	p.K1518I	Missense
ESO-05	<i>CDKN2A</i>	21974782	9		c.45G>A	p.W15*	Nonsense

ESO-16	<i>CDKN2A</i>	21970900	9	c.457+1G>A	.	SpliceDonorSNV
ESO-06	<i>CDK4</i>	58145431	12	c.70C>T	p.R24C	Missense
ESO-12	<i>CCND1</i>	69465895	11	c.733C>T	p.R245W	Missense
ESO-10	<i>CASP8</i>	202150039	2	c.1480C>T	p.R494*	Nonsense
ESO-10	<i>BCL10</i>	85736523	1	c.124C>T	p.R42C	Missense
ESO-10	<i>BCL10</i>	85736532	1	c.115G>C	p.D39H	Missense
ESO-08	<i>ASXL1</i>	30946591	20	c.25_27delAAG	p.K9delK	InFrameDeletion
ESO-10	<i>ASXL1</i>	31022441	20	c.1934dupG	p.G646Wfs*12	Frameshift
ESO-25	<i>APC</i>	112173798	5	c.2507C>G	p.S836*	Nonsense
ESO-25	<i>APC</i>	112173801	5	c.2510C>G	p.S837*	Nonsense
ESO-09	<i>ALK</i>	29443595	2	c.3622C>G	p.L1208V	Missense
ESO-25	<i>ACVR1B</i>	52387880	12	c.1627G>A	p.D543N	Missense

Anexo E

Lista de variantes (CEC orofaringe).

Sample_name	Gene_symbol	Start	Chr	cdna	protein	Change_type
BN-02	<i>TP53</i>	7577580	17	c.701A>G	Y234C	Missense
BN-03	<i>PTEN</i>	89692992	10	c.476G>A	p.R159K	Missense
BN-05	<i>TP53</i>	7577516	17	c.764dupT	T256Hfs*8	Frameshift
BN-07	<i>TP53</i>	7577570	17	c.711G>A	M237I	Missense
BN-10	<i>TP53</i>	7577141	17	c.797G>A	G266E	Missense
BN-11	<i>NOTCH1</i>	139390650	9	c.7541C>T	p.P2514L	Missense
BN-11	<i>NOTCH1</i>	139402492	9	c.3425G>A	p.C1142Y	Missense
BN-11	<i>TP53</i>	7577533	17	c.748C>T	P250S	Missense
BN-11	<i>TP53</i>	7577509	17	c.772G>A	E258K	Missense
BN-11	<i>NOTCH1</i>	139412359	9	c.1286G>A	p.C429Y	Missense
BN-11	<i>NOTCH1</i>	139412365	9	c.1280G>A	p.G427D	Missense
BN-11	<i>TP53</i>	7577079	17	c.859G>A	E287K	Missense
BN-12	<i>NOTCH1</i>	139390663	9	c.7528C>T	p.L2510F	Missense
BN-12	<i>TP53</i>	7577559	17	c.722C>T	S241F	Missense
BN-22	<i>CDKN2A</i>	21971114	9	c.244G>A	p.V82M	Missense
BN-22	<i>NOTCH1</i>	139417316	9	c.728G>A	p.C243Y	Missense
BN-22	<i>TP53</i>	7578461	17	c.469G>T	V157F	Missense
BN-24	<i>TP53</i>	7578406	17	c.524G>A	R175H	Missense
BN-25	<i>TP53</i>	7578394	17	c.536A>G	H179R	Missense
BN-31	<i>TP53</i>	7577094	17	c.844C>T	R282W	Missense
BN-36	<i>FAT1</i>	187525110	4	c.10570C>T	p.Q3524*	Nonsense
BN-36	<i>FAT1</i>	187541970	4	c.5770G>A	p.G1924R	Missense
BN-36	<i>NOTCH1</i>	139402765	9	c.3244C>T	p.R1082C	Missense
BN-36	<i>RB1</i>	49039374	13	c.2359C>T	p.R787*	Nonsense
BN-36	<i>TP53</i>	7577127	17	c.811G>A	E271K	Missense
BN-36	<i>FBXW7</i>	153245404	4	c.1787C>T	p.S596F	Missense
BN-36	<i>NSD1</i>	176631141	5	c.1084C>T	p.R362W	Missense
BN-36	<i>NOTCH1</i>	139412255	9	c.1390G>A	p.D464N	Missense
BN-36	<i>FBXW7</i>	153249384	4	c.1394G>A	p.R465H	Missense
BN-36	<i>TP53</i>	7577550	17	c.731G>A	G244D	Missense
BN-36	<i>IRF6</i>	209963884	1	c.1016G>A	p.R339K	Missense
BO-05	<i>FAT1</i>	187524687	4	c.10993C>T	p.R3665*	Nonsense
BO-05	<i>KMT2D</i>	49441797	12	c.4187C>T	p.A1396V	Missense
BO-05	<i>HRAS</i>	534270	11	c.53C>T	p.A18V	Missense

BO-05	<i>NSD1</i>	176678848	5	c.4759C>T	p.R1587C	Missense
BO-05	<i>NSD1</i>	176709530	5	c.5957G>A	p.R1986H	Missense
BO-05	<i>FAT1</i>	187525110	4	c.10570C>T	p.Q3524*	Nonsense
BO-05	<i>FBXW7</i>	153249465	4	c.1313C>T	p.S438F	Missense
BO-05	<i>TP53</i>	7576855	17	c.991C>T	Q331*	Nonsense
BO-05	<i>RB1</i>	48942685	13	c.1072C>T	p.R358*	Nonsense
BO-05	<i>NSD1</i>	176638555	5	c.3155G>A	p.R1052H	Missense
BO-05	<i>NOTCH1</i>	139396317	9	c.5521C>T	p.R1841W	Missense
BO-05	<i>FAT1</i>	187584747	4	c.3286C>T	p.R1096*	Nonsense
BO-05	<i>NSD1</i>	176637325	5	c.1925C>T	p.S642F	Missense
BO-05	<i>KMT2D</i>	49440074	12	c.4552G>A	p.D1518N	Missense
BO-05	<i>FAT1</i>	187534401	4	c.9325G>A	p.A3109T	Missense
BO-05	<i>CDKN2A</i>	21971186	9	c.172C>T	p.R58*	Nonsense
BO-05	<i>NOTCH1</i>	139405153	9	c.2692G>A	p.G898S	Missense
BO-05	<i>KMT2D</i>	49433620	12	c.7933C>T	p.R2645*	Nonsense
BO-05	<i>IRF6</i>	209963884	1	c.1016G>A	p.R339K	Missense
BO-05	<i>PTEN</i>	89717624	10	c.649G>A	p.V217I	Missense
BO-05	<i>NOTCH1</i>	139395132	9	c.5806G>A	p.A1936T	Missense
BO-05	<i>HRAS</i>	533838	11	c.218G>A	p.R73H	Missense
BO-05	<i>NOTCH1</i>	139391937	9	c.6254C>T	p.A2085V	Missense
BO-05	<i>NOTCH1</i>	139396757	9	c.5351G>A	p.R1784Q	Missense
BO-05	<i>NSD1</i>	176637999	5	c.2599C>T	p.L867F	Missense
BO-05	<i>NSD1</i>	176638139	5	c.2739G>A	p.M913I	Missense
BO-05	<i>FAT1</i>	187629157	4	c.1825G>A	p.G609R	Missense
BO-05	<i>NOTCH1</i>	139391077	9	c.7114C>T	p.R2372W	Missense
BO-05	<i>NOTCH1</i>	139412272	9	c.1373C>T	p.S458L	Missense
BO-05	<i>FAT1</i>	187541686	4	c.6054C>A	p.N2018K	Missense
BO-06	<i>TP53</i>	7578458	17	c.472C>G	R158G	Missense
BO-06	<i>NSD1</i>	176694631	5	c.5215C>T	p.P1739S	Missense
BO-06	<i>PIK3CA</i>	178952090	3	c.3145G>A	p.G1049S	Missense
BO-06	<i>NSD1</i>	176684042	5	c.4856G>A	p.C1619Y	Missense
BO-06	<i>NOTCH1</i>	139412240	9	c.1405G>A	p.D469N	Missense
BO-06	<i>KMT2D</i>	49441759	12	c.4225G>A	p.V1409I	Missense
BO-06	<i>HRAS</i>	533515	11	c.388G>A	p.A130T	Missense
BO-06	<i>TP53</i>	7577118	17	c.820G>A	V274I	Missense
BO-06	<i>TP53</i>	7577046	17	c.892G>A	E298K	Missense
BO-06	<i>NOTCH1</i>	139409754	9	c.2002C>T	p.P668S	Missense
BO-06	<i>PIK3CA</i>	178921553	3	c.1035T>A	p.N345K	Missense
BO-09	<i>NOTCH1</i>	139396503	9	c.5422G>T	p.D1808Y	Missense
BO-09	<i>PTEN</i>	89624296	10	c.70G>A	p.D24N	Missense

BO-09	<i>NSD1</i>	176684042	5	c.4856G>A	p.C1619Y	Missense
BO-09	<i>FAT1</i>	187629958	4	c.1024G>A	p.G342R	Missense
BO-09	<i>FAT1</i>	187630312	4	c.670G>A	p.A224T	Missense
BO-11	<i>NOTCH1</i>	139393579	9	c.6067G>A	p.A2023T	Missense
BO-11	<i>TP53</i>	7578190	17	c.659A>G	Y220C	Missense
BO-13	<i>NOTCH1</i>	139412359	9	c.1286G>A	p.C429Y	Missense
BO-13	<i>NOTCH1</i>	139391898	9	c.6293G>A	p.R2098H	Missense
BO-13	<i>TP53</i>	7577547	17	c.734G>A	G245D	Missense
BO-13	<i>PIK3CA</i>	178952090	3	c.3145G>A	p.G1049S	Missense
BO-13	<i>NOTCH1</i>	139390618	9	c.7573C>T	p.P2525S	Missense
BO-13	<i>KMT2D</i>	49440489	12	c.4321C>T	p.R1441C	Missense
BO-13	<i>FAT1</i>	187629456	4	c.1526C>T	p.P509L	Missense
BO-13	<i>NOTCH1</i>	139395186	9	c.5752G>A	p.A1918T	Missense
BO-15	<i>FAT1</i>	187524834	4	c.10846G>A	p.V3616I	Missense
BO-15	<i>TP53</i>	7578448	17	c.482C>T	A161V	Missense
BO-15	<i>TP53</i>	7578409	17	c.521G>A	R174K	Missense
BO-15	<i>TP53</i>	7577120	17	c.818G>A	R273H	Missense
BO-22	<i>PIK3CA</i>	178947872	3	c.2747G>A	p.R916H	Missense
BO-22	<i>NSD1</i>	176687001	5	c.4978C>T	p.R1660C	Missense
BO-22	<i>NSD1</i>	176710828	5	c.6050G>A	p.R2017Q	Missense
BO-22	<i>FAT1</i>	187541322	4	c.6418C>T	p.Q2140*	Nonsense
BO-22	<i>RB1</i>	48947599	13	c.1186C>T	p.P396S	Missense
BO-22	<i>EZH2</i>	148529808	7	c.281A>G	p.Q94R	Missense
BO-22	<i>FAT1</i>	187630453	4	c.529G>A	p.D177N	Missense
BO-22	<i>FAT1</i>	187630410	4	c.572G>A	p.R191Q	Missense
BO-22	<i>PIK3CA</i>	178916935	3	c.322C>T	p.R108C	Missense
BO-22	<i>NSD1</i>	176719067	5	c.6371G>A	p.C2124Y	Missense
BO-22	<i>NOTCH1</i>	139396253	9	c.5585C>T	p.P1862L	Missense
BP-08	<i>NOTCH1</i>	139409944	9	c.1894G>A	p.G632R	Missense
BP-08	<i>NOTCH1</i>	139418238	9	c.334C>T	p.R112C	Missense
BP-08	<i>TP53</i>	7577103	17	c.835G>A	G279R	Missense
BP-08	<i>RB1</i>	49039467	13	c.2452G>A	p.G818S	Missense
BP-08	<i>KMT2D</i>	49434136	12	c.7417C>T	p.Q2473*	Nonsense
BP-08	<i>TP53</i>	7579331	17	c.356C>T	A119V	Missense
BP-08	<i>NOTCH1</i>	139392000	9	c.6191C>T	p.P2064L	Missense
BP-08	<i>TP53</i>	7577099	17	c.839G>A	R280K	Missense
BP-08	<i>CDKN2A</i>	21971098	9	c.260G>A	p.R87Q	Missense
BP-08	<i>TP53</i>	7577097	17	c.841G>A	D281N	Missense
BP-08	<i>NSD1</i>	176721163	5	c.6794C>T	p.S2265F	Missense
BP-08	<i>TP53</i>	7576858	17	c.988C>T	L330F	Missense

BP-08	<i>FAT1</i>	187628218	4	c.2764G>A	p.D922N	Missense
BP-09	<i>RB1</i>	49033967	13	c.2104C>T	p.Q702*	Nonsense
BP-17	<i>FAT1</i>	187549364	4	c.4754C>T	p.T1585M	Missense
BP-29	<i>CDKN2A</i>	21971186	9	c.172C>T	p.R58*	Nonsense
BP-29	<i>TP53</i>	7578394	17	c.536A>G	H179R	Missense
ORO-01	<i>TP53</i>	7579471	17	c.215_216insG	V73Rfs*76	Frameshift
ORO-03	<i>HRAS</i>	534286	11	c.37G>C	p.G13R	Missense
ORO-05	<i>TP53</i>	7578500	17	c.430C>T	Q144*	Nonsense
ORO-13	<i>NSD1</i>	176721025	5	c.6656G>A	p.R2219H	Missense
ORO-13	<i>FAT1</i>	187630386	4	c.596C>T	p.P199L	Missense
ORO-13	<i>FAT1</i>	187518170	4	c.12524G>A	p.W4175*	Nonsense
ORO-13	<i>PIK3CA</i>	178936091	3	c.1633G>A	p.E545K	Missense
ORO-13	<i>PTEN</i>	89624303	10	c.77C>T	p.T26I	Missense
ORO-21	<i>TP53</i>	7577505	17	c.776A>T	D259V	Missense
ORO-21	<i>CDKN2A</i>	21971000	9	c.358G>T	p.E120*	Nonsense
ORO-36	<i>CDKN2A</i>	21974684	9	c.143C>T	p.P48L	Missense
ORO-50	<i>TP53</i>	7577548	17	c.733G>T	G245C	Missense
ORO-51	<i>TP53</i>	7579575	17	c.112delC	Q38Kfs*6	Frameshift



OPEN

Impact of genetic variants in clinical outcome of a cohort of patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma

Ana Carolina de Carvalho¹, Sandra Perdomo^{2,3}, Wellington dos Santos¹, Gabriela Carvalho Fernandes⁴, Lais Machado de Jesus¹, Raiany Santos Carvalho⁵, Cristovam Scapulatempo-Neto^{1,6}, Gisele Caravina de Almeida⁵, Bruna Pereira Sorroche¹, Lidia Maria Rebolho Batista Arantes¹, Matias Eliseo Melendez^{1,7,8}, Pedro De Marchi^{9,10}, Neil Hayes¹¹, Rui Manuel Reis^{1,12,13} & André Lopes Carvalho^{1,3}✉

Tobacco- or human papillomavirus- driven oropharyngeal squamous cell carcinomas (OpSCC) represent distinct clinical, biological and epidemiological entities. The aim of this study was to identify genetic variants based on somatic alterations in OpSCC samples from an admixed population, and to test for association with clinical features. The entire coding region of 15 OpSCC driver genes was sequenced by next-generation sequencing in 51 OpSCC FFPE samples. Thirty-five percent of the patients (18/51) were HPV-positive and current or past tobacco consumption was reported in 86.3% (44/51). The mutation profile identified an average of 2.67 variants per sample. Sixty-three percent of patients (32/51; 62.7%) were mutated for at least one of the genes tested and *TP53* was the most frequently mutated gene. The presence of mutation in *NOTCH1* and *PTEN*, significantly decreased patient's recurrence-free survival, but only *NOTCH1* mutation remained significant after stepwise selection, with a risk of recurrence of 4.5 (HR 95% CI = 1.11–14.57; Cox Regression $p = 0.034$). These results show that Brazilian OpSCC patients exhibit a similar clinical and genetic profile in comparison to other populations. Molecular characterization is a promising tool for the definition of clinical subgroups, aiding in a more precise tailoring of treatment and prognostication.

Head and neck cancers (HNC) are ranked as the 8th most common tumors worldwide, with a total of 834,860 new cases and 431,131 deaths estimated for 2018¹.

The most prevalent site is the oral cavity, followed by the oropharynx and larynx, and more than 95% are squamous cell carcinomas (SCC)². Excessive tobacco and alcohol consumption and high-risk human papillomavirus (HPV) infection (mainly HPV-16 and HPV-18) in the oropharynx are the main risk factors^{3–6}. Besides etiology, HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinoma (OpSCC) cases configure diseases with remarkably different clinical presentation, epidemiological and molecular profiles^{3–6}. Regarding prognosis, HPV-positive OpSCC have a far more favorable outcome when compared with HPV-negative cases⁶. For this reason, the tumor-node-metastasis (TNM) staging for HNC was adapted in the eighth edition to include p16^{INK4A} immunostaining as a surrogate for HPV status in OpSCC⁷.

¹Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil. ²Institute of Nutrition, Genetics and Metabolism Research, Faculty of Medicine, Universidad El Bosque, Bogotá, Colombia. ³International Agency of Research on Cancer, Lyon, France. ⁴Center of Molecular Diagnosis, Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil. ⁵Research Support Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil. ⁶Pathology and Molecular Diagnostics Service, Diagnósticos da América-DASA, São Paulo, SP, Brazil. ⁷Pelé Little Prince Research Institute, Curitiba, PR, Brazil. ⁸Little Prince College, Curitiba, PR, Brazil. ⁹Department of Medical Oncology, Barretos Cancer Hospital, Barretos, SP, Brazil. ¹⁰Oncoclinicas, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ¹¹Department of Medicine, Division of Oncology, UTHSC Center for Cancer Research, University of Tennessee Health Science Center, Memphis, USA. ¹²Life and Health Sciences Research Institute (ICVS), Medical School, University of Minho, Braga, Portugal. ¹³ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal. ✉e-mail: carvalhoal@gmail.com

Treatment for OpSCC has evolved in the past decades and often includes approaches for organ preservation based on concomitant chemotherapy and radiotherapy followed by salvage surgery in non-responders⁸. This treatment frequently has long-term side effects, impacting patients' quality of life⁹. Several treatment de-escalation trials for HPV-positive OpSCC have been initiated, which may lead to personalized treatment based on HPV status¹⁰.

Around 2/3 of HNC patients are diagnosed with advanced disease in different parts of the world^{9,11–13} and at least 50% of them will relapse locally, regionally or at distant sites, within the first two years after treatment^{9,14,15}. While for HPV-positive OpSCC cases, 5-years overall survival rates (OS) are close to 80%, regardless of stage^{16–18}, TNM stage has a significant impact in OS for HPV-negative OpSCC: 70%, 58%, 50%, and 30% for stage I, II, III, and IV¹⁸. Therefore, there is an increasing need for predictors of treatment response and disease progression/relapse.

Studies characterizing the spectrum of genetic alterations in cancers have been enabling a better understanding of the molecular alterations playing a role in head and neck carcinogenesis^{19–22}. A high level of intertumoral heterogeneity has been observed, confirming the biological complexity of these tumors^{22–24}. A common finding is that HPV-negative tumors have a higher mutation burden while HPV-positive tumors have far fewer genes mutated and variants per tumor, regardless of smoking status^{22,23}. Results from The Cancer Genome Atlas (TCGA) consortium on the molecular profile of 279 HNSCC tumors confirmed the differences at the molecular level between HPV-positive and negative cases, with frequent activating helical domain mutations in *PIK3CA* in HPV-positive cases and *TP53* mutations and *CDKN2A* loss-of-function mutations in HPV negative cases²⁴. These findings suggest that the absence of the oncogenic effect from HPV oncoproteins in HPV-unrelated tumors requires the accumulation of multiple genetic aberrations to allow malignant transformation²³.

Despite the different strategies for diagnosis and treatment of OpSCC patients, and the advent of HPV as an important prognostic marker, there is no molecular biomarker to guide selection among treatment and follow-up options that directly have an impact on patient survival. Therefore, the lack of risk categories based on clinical features and/or biomarkers that can be used for personalized treatment approaches for OpSCC has propelled research into the molecular landscape of these tumors. Moreover, there is an underrepresentation of genomic data on the mutation profile of HNC patients from admixed populations. Therefore, this study aims at identifying molecular alterations in a set of HNC patients from Brazil and to better characterize, together with clinical variables, OpSCC cases according to their outcome.

Methods

Sample population and DNA isolation. This study included pre-treatment formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tissue biopsies from 51 patients with primary oropharyngeal squamous cell carcinoma (OpSCC) diagnosed at the Department of Head and Neck Surgery of Barretos Cancer Hospital in Brazil between 2009 and 2017. These cases were selected based on very stringent criteria to ensure reliability of the clinical and molecular data as follows: pre-treatment FFPE tumor biopsies available from patients treated with curative intent by chemo-radiation protocols and with available follow-up data; samples with at least 60% of tumor cells at the histopathological examination and, with enough DNA for library preparation at an acceptable level of integrity as evaluated by multiplex PCR²⁵. Finally, after sequencing, only samples with acceptable scores of DNA sequencing quality were included (as described below).

Hematoxylin & eosin stained sections of paraffin blocks containing the tumor tissue from the patients included were reviewed by two expert pathologists (CSN and GCA) for diagnosis confirmation and characterization of cellular components. Scrapings from regions containing at least 60% of tumor cells were processed using the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Germany). Isolated DNA samples were eluted in 35 μ L of water and quantified in the Qubit fluorometer (Invitrogen, Carlsbad, CA) prior to storage at -20°C until use.

Information regarding tobacco and alcohol consumption, clinical and pathological features were retrieved from patient's charts. p16 immunohistochemistry was conducted as a surrogate marker for high-risk HPV (pre-diluted, monoclonal mouse antihuman p16INK4A protein, Clone E6H4TM, ready for use, Ventana, Tucson, AZ, USA). Samples with strong and diffuse nuclear and cytoplasmic staining in more than 75% of the tumor cells were considered positive for p16^{26–28}. Moreover, HPV-DNA detection of types HPV-16 and HPV-18 was performed in a subset of cases (n = 12) using droplet digital PCR as previously described and detailed in the Supplementary Methods²⁹.

The present study was approved by the Barretos Cancer Hospital Institutional Review Board (approval number 425/2013) and all methods were performed in accordance with the relevant guidelines and regulations.

Next-generation sequencing (NGS) and genetic ancestry determination. To identify somatic mutations, we performed NGS of a panel of 15 genes, including some of the most frequently mutated genes in HNC, *TP53*, *NOTCH1*, *CDKN2A*, *PTEN*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *HRAS*, *TP63*, *CASP8*, *FAT1*, *KMT2D*, *RB1*, *IRF6*, *EZH2* and *NSD1*, based on a previous study³⁰. Bearing in mind the consensus regarding DNA fragmentation when recovered from FFPE, primers were designed to amplify fragments with sizes ranging from 125–175 base pairs, to minimize the effect of DNA fragmentation in the efficiency of library preparation. Therefore, three pools of primers were used for the simultaneous amplification of 923 amplicons from the 15 genes.

Ten nanograms of genomic DNA from each sample were subjected to library preparation using the Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Life Technologies, Carlsbad, CA) and an AmpliSeq Custom Panel (Life Technologies, Carlsbad, CA) designed to specifically amplify the entire coding region of the 15 genes, with a coverage of 99.26%. Samples were barcoded using IonXpress Barcode Adapters (Life Technologies, Carlsbad, CA). Automated template preparation and enrichment using an input of 30pM of purified library were performed in an Ion Chef System (Life Technologies, Carlsbad, CA) and sequencing was conducted in an Ion Torrent PGM (Life Technologies, Carlsbad, CA) using the Ion PGM Hi-Q View Sequencing Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA).

The genetic ancestry of a subset of patients ($n = 11$) was determined using AIMs (Ancestry Informative Markers) as previously reported^{31–35}. A more detailed description of the methodology used is in the Supplementary Methods.

Data analysis. Sequencing results obtained in the Ion Torrent PGM run were processed in the Torrent Server. Reads generated were aligned to hg19 human reference genome using the Torrent Mapping Alignment Program (TMAP) and the Torrent Variant Caller (TVC) plugin version v5.8.0.19 (464) was used to call for variants. Variants were annotated using wANNOVAR (<http://wannovar.wglab.org/>) and Cancer Genome Interpreter³⁶. After quality filters were applied per sample (average depth of coverage of at least 600x, at least 80% of reads aligned to the target region and at least 100,000 mapped reads)³⁷, variants with the following characteristics were selected: non-synonymous and frameshift variants occurring within exons; variants with a depth of coverage of at least 200x; variants with an allele frequency of at least 10%; frequency observed in population databases of germline variants (such as 1000 genomes, ExAC and ESP6500) lesser than 1%; classified as drivers or predicted drivers using the CGI tool (<https://www.cancergenomeinterpreter.org/home>); and previously reported at the COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) and/or TCGA databases (<http://www.cbioportal.org/>).

All remaining variants were manually confirmed on the Integrative Genomics Viewer (IGV) version 2.7. We further explored *TP53* status by using the Evolutionary Action score of *TP53*-coding variants (EA₅₃) to stratify patients with tumors harboring *TP53* mutations as high or low risk for unfavorable outcome, based on a model of the genotype-phenotype relationship described in^{38,39}.

Tobacco, HPV status and mutational data from 39 OpSCC patients evaluated in The Cancer Genome Atlas (TCGA) were accessed with the online Xena Browser (<https://xenabrowser.net>). Mutation frequencies of the 15 genes tested in this study were compared between both cohorts.

All NGS data generated from the 51 OpSCC samples evaluated here was deposited in the European Genome-phenome Archive (EGA) under study/dataset identifiers EGAS00001004430/EGAD00001006151.

Statistical analysis. Statistical analysis was performed using the software IBM SPSS Statistics 23 for Windows. Categorical variables were compared using Fisher's exact or Chi-square test. Survival curves were calculated by Kaplan-Meier method and differences between groups were compared using the log-rank test. Recurrence-free survival was defined as the interval between the date of initial treatment and the diagnosis of recurrence. For all analysis, we considered statistical significance when p value < 0.05 .

Results

Clinical description of the study population. Clinical and histopathological data of the 51 oropharyngeal cancer patients enrolled in this study are presented in Table 1. Most of the patients profiled in this cohort were male (98.0%) with age ranging from 35 to 76 years (mean/median = 55.3/55.0 years). Tobacco and alcohol consumption were self-reported by 86.3% and 96.0% of the cases, respectively. The majority of patients had advanced disease (according to the AJCC TNM 8th edition⁴⁰) at diagnosis (84.3%), T3/T4 tumors (37/51, 72.5%) and with clinically positive lymph nodes at diagnosis (N+; 45/51, 88.2%). All patients were treated with a platinum-based chemotherapy concomitant to radiotherapy between 2009 and 2017.

The median follow-up was 26 months (range: 1.00 to 86.00 months) and 44.3% of the cases were alive in 5-years. Recurrence occurred in 14 cases (27.5%). Tobacco smoking was significantly associated with reduced recurrence-free survival (50.2% versus 100% for never smokers; log-rank $p = 0.045$), while HPV-status association with increased recurrence-free survival was marginally significant (75.5% for HPV-positive versus 48.8% for HPV-negative; log-rank $p = 0.082$) (Supplementary Fig. 1A,B).

The expression of p16 protein was detected in 18/51 samples (35.3%). For a small subset of cases with available DNA ($n = 12$), droplet digital PCR (ddPCR) was used for the detection of HPV-DNA for types HPV-16 and HPV-18 as part of another study (unpublished data). The agreement between p16-IHC and HPV-DNA results was of 91.7% (Cohen's Kappa Value = 0.833; $p = 0.003$): 6 were p16+ /HPV-DNA+, 5 were p16-/HPV-DNA-, but 1 had discordant a result, being p16+ /HPV-DNA- (Supplementary Table 1). Given the high agreement between p16-IHC and HPV-DNA results in the subset of samples tested, and the recommendation of this test as a surrogate marker for HPV-positivity on a clinical setting⁴¹, we considered patients with tumor p16-IHC expression as positive for HPV infection in this study.

We also included a set of 39 OpSCC with available mutational, tobacco consumption and HPV status (by p16-IHC and/or *in-situ* hybridization) from the TCGA study recovered from the Xena database (Supplementary Table 2). Of the 39 OpSCC cases, 79.5% (31/39) were HPV-positive and 69.2% were current or former smokers (26/39). Therefore, our cohort had a substantially lower rate of HPV-positive cases and higher prevalence of current or former tobacco smoker patients in comparison to this set of patients from the TCGA study.

Detection of somatic variants and genetic ancestry determination in OpSCC cases. After filtering-out common germline variants, only nonsynonymous variants, with VAF $> 10\%$, and previously reported by TCGA in head and neck tumors and/or in COSMIC were considered. The mutation profile identified a total of 136 variants, with an average of 2.67 variants per sample (ranging from 1–31). The majority of variants were classified as missense (117/136; 86.0%), followed by nonsense variants (16/136; 11.8%) and frameshift (3/136; 2.2%). We found an average of 1.65 (ranging from 1–12) genes mutated per sample and the majority of the patients (32/51; 62.7%) were mutated for at least one of the genes tested: 17/32 (53.1%) had only 1 gene mutated, 9/32 (28.1%) had between 2 and 5 genes mutated, and 6/32 (18.8%) had more than 5 genes mutated.

The frequency of mutated samples per gene was as follows: 45.1% (23/51) for *TP53*, 21.6% (11/51) for *NOTCH1*, 17.6% (9/51) for *FAT1*, 13.7% (7/51) for *NSD1* and *PIK3CA*, 11.8% (6/51) for *CDKN2A*, 9.9% (5/51) for *RBI*, 7.8% (4/51) for *KMT2D* and *PTEN*, 5.9% (3/51) for *HRAS*, 3.9% (2/51) for *IRF6* and *FBXW7*, and 2.0%

Characteristic	Number of cases	%
Gender		
Male	50	98.0
Female	1	2.0
Age		
<=55 years	26	51.0
>55 years	25	49.0
Smoking status		
Never	7	13.7
Current or Former	44	86.3
Alcohol consumption status		
Never	2	4.0
Current or Former	48	96.0
HPV status		
Negative	33	64.7
Positive	18	35.3
T stage		
T1/T2	14	27.5
T3/T4	37	72.5
N stage		
N0	6	11.8
N+	45	88.2
Stage*		
I/II - early	8	15.7
III/IV - advanced	43	84.3
Response to treatment		
Non-responder	19	38.8
Responder	30	61.2
Recurrence		
No	37	72.5
Yes	14	27.5
Live Status		
Alive without disease	25	49.0
Alive with disease	3	5.9
Death by cancer	23	45.1

Table 1. Clinical and pathological features of oropharyngeal patients (n = 51). *According to the 8th edition of the AJCC TNM staging system of oropharyngeal tumor⁴⁰.

(1/51) for *EZH2* (Fig. 1 and Supplementary Fig. 2). None of the patients presented mutations for *CASP8* and *TP63*.

For *TP53*, the most frequently mutated gene in our cohort, most of the mutations were missense (28/51), 5 were truncating (3 frameshift and 2 nonsense) and the majority occurred within the p53 DNA-binding domain (between codons 95 and 288) (Supplementary Fig. 3A). *NOTCH1* was the second most frequently mutated gene in our cohort (11/51) and all variants observed were missense with a high fraction happening in the N-terminal epidermal growth factor (EGF)-like ligand binding domains and another fraction in the C-terminal end, mainly around and within the Ankyrin repeat domain (Supplementary Fig. 3B).

In the set of OpSCC patients from TCGA evaluated, 64.1% of the samples had mutation in at least 1 of the genes tested (25/39), a very similar rate to the one we observed in our cohort (32/51; 62.7%). *TP53* was the most frequently mutated gene (9/39; 23.1%), followed by *PIK3CA* (8/39; 20.5%), *RB1* (5/39; 12.8%), *KMT2D* (4/39; 10.3%), *NOTCH1* and *NSD1* (3/39; 7.7%), *FAT1*, *FBXW7* and *PTEN* (2/39; 5.1%), and *CDKN2A* (1/39; 2.6%) (Supplementary Fig. 2 and Supplementary Table 2). No mutations in *CASP8*, *EZH2*, *HRAS*, *IRF6* and *TP63* were observed.

Besides somatic variants characterization, for a subset of patients (n = 9) the genetic ancestry was determined (Supplementary Table 1). A great admixture was observed in the genetic composition of the individuals tested based on the four ancestry groups evaluated. As expected, a high proportion of European ancestry was observed (median: 63.8%, range: 42.0–88.5%), followed by African (median: 22.2%, range: 5.5–38.6%), Native American (median: 6.2%, range: 2.0–28.7%) and East Asian (median: 5.0%, range 3.8–23.9%) (Supplementary Table 1 and Supplementary Fig. 4).

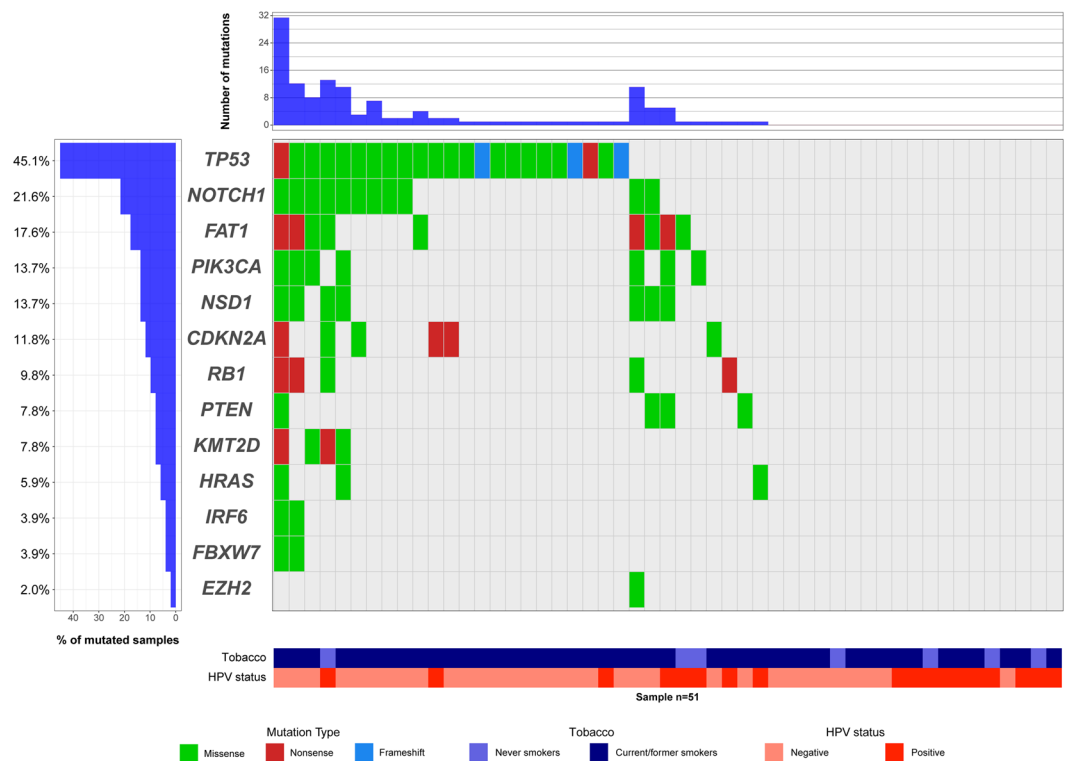


Figure 1. Oncoprint diagram with frequencies and types of mutation observed in OpSCC. Genes (rows) are sorted according to the frequency of mutation within samples ($n = 51$). Samples (columns) are further classified according to tobacco consumption and HPV status. The right panel represents mutations in the genes tested. Top, number of mutations per sample. Color codes indicate mutation type, tobacco and HPV status. The oncoprint was generated using the package GenVisR (version 1.14) in R 3.5.0 software.

		HPV status		Tobacco consumption			
Genes		Negative	Positive	p-value ⁺	Never	Current/Former	p-value ⁺
<i>Any gene</i>	WT	9 (27.3)	10 (55.6)	0.046*	4 (57.1)	15 (34.1)	0.402
	mutated	24 (72.7)	8 (44.4)		3 (42.9)	29 (65.9)	
<i>CDKN2A</i>	WT	29 (87.8)	16 (88.9)	1.000	6 (85.7)	39 (88.6)	1.000
	mutated	4 (12.2)	2 (11.1)		1 (14.3)	5 (11.4)	
<i>FAT1</i>	WT	27 (81.8)	15 (83.3)	1.000	5 (71.4)	37 (84.1)	0.592
	mutated	6 (18.2)	3 (16.7)		2 (28.6)	7 (15.9)	
<i>NOTCH1</i>	WT	23 (69.7)	17 (94.4)	0.072	6 (85.7)	34 (77.3)	1.000
	mutated	10 (30.3)	1 (5.6)		1 (14.3)	10 (22.7)	
<i>PIK3CA</i>	WT	28 (84.8)	16 (88.9)	1.000	6 (85.7)	38 (86.4)	1.000
	mutated	5 (15.2)	2 (11.1)		1 (14.3)	6 (13.6)	
<i>TP53</i>	WT	13 (39.4)	15 (83.3)	0.003*	6 (85.7)	22 (50.0)	0.112
	mutated	20 (60.6)	3 (16.7)		1 (14.3)	22 (50.0)	

Table 2. Results of the association between HPV status and tobacco consumption with the status of somatic gene mutation in the OpSCC patients. ⁺Results obtained using the Fisher's Exact test, except for* that were obtained with the Chi-square test.

Association between mutation status, HPV status and tobacco consumption. The average number of variants in HPV-negative samples was higher than in HPV-positive cases (3.33 ± 6.04 versus 1.44 ± 3.22 ; $p = 0.199$) (Supplementary Fig. 5); and the majority of mutated cases were HPV-negative (24/32, 75.0% versus 8/32, 25.0% for HPV-positive; Chi-square $p = 0.046$). As expected, genes commonly associated with tobacco-induced HNC carcinogenesis had a lower frequency of mutation in HPV-positive cases (Table 2): 1/18 (5.6%, $p = 1.000$) for *CDKN2A*, 3/18 (16.7%; $p = 1.000$) for *FAT1*, 1/18 (5.6%; $p = 0.077$) for *NOTCH1*, and 3/18 (16.7%; $p = 0.003$) for *TP53* (Fig. 1 and Supplementary Fig. 6). Interestingly, of the 8 HPV-positive cases harboring mutations, 5 were current or former smokers; and only 2/18 (11.1%) showed mutation in *PIK3CA*, reportedly the most frequently mutated gene in this group (Fig. 1 and Supplementary Fig. 6).

Characteristic	Number of cases	Number of events	5-year recurrence-free survival	p-value (log-rank)
HPV status				
Negative	33	11	48.8%	0.082
Positive	18	3	75.5%	
Tobacco history				
never	7	0	100.0%	0.045
current/former	44	14	50.2%	
Mutation status (any gene)				
WT	19	3	80.0%	0.156
mutated	32	11	47.9%	
PTEN status				
WT	47	11	64.5%	0.045
mutated	4	3	25.0%	
NOTCH1 status				
WT	40	8	68.2%	0.032
mutated	11	6	35.1%	
TP53 status				
WT	28	5	75.9%	0.137
mutated	23	9	42.6%	
EAp53				
WT/low-risk	37	7	71.8%	0.080
high-risk	11	6	38.4%	

Table 3. Recurrence-free survival information according to selected clinical and molecular factors.

Regarding tobacco consumption, the average number of variants was slightly higher in current or former tobacco smokers when compared with never smokers (2.75 ± 5.38 versus 2.14 ± 4.81 ; $p = 0.780$) (Supplementary Fig. 5). Additionally, most of the cases mutated for at least one of the genes tested were current or former smokers (29/32, 90.6% versus 3/32, 9.4% for never smokers; Fisher's Exact Test $p = 0.402$). Although not statistically significant, genes commonly associated with tobacco-induced HNC carcinogenesis were more frequently mutated in current or former smokers (Table 2): 10/44 (22.4%; $p = 0.592$) for *NOTCH1*, and 22/44 (50.0%; $p = 0.112$) for *TP53* (Fig. 1 and Supplementary Fig. 6). Although the overall frequency of mutations in *CDKN2A* and *FAT1* was slightly higher in never smokers, most of the mutated samples for these genes were current or former smokers: 5/6 (83.3%; $p = 1.000$) mutated for *CDKN2A* and 7/9 (77.8%; $p = 1.000$) for *FAT1* (Fig. 1 and Supplementary Fig. 6).

Interestingly, of the 19 cases for which no mutation was detected for the genes tested, all but one patient (18/19; 94.7%) were exposed to at least one of the risk factors evaluated (tobacco smoking and/or positivity for HPV infection): 3 (15.8%) cases were never-smokers, but HPV-positive; 8 were smokers, but HPV-negative; and 7 were smokers and HPV-positive (Fig. 1 and Supplementary Fig. 6).

Additionally, we compared the mutational rates of the 15 genes in our cohort and the 39 OpSCC from the TCGA study. Although the frequency of mutated samples was similar in both cohorts, as described earlier, significant differences in mutation frequencies were observed for specific genes (Supplementary Fig. 2). Genes commonly associated with tobacco-induced HNC carcinogenesis were less frequently mutated in the TCGA samples, namely *TP53* (9/39; 23.1%), *NOTCH1* (3/39; 7.7%), *FAT1* (2/39; 5.1%), and *CDKN2A* (1/39; 2.6%); while *PIK3CA* was mutated in 20.5% of the samples (8/39). This agrees with the lower prevalence of ever smokers (69.2% versus 86.3%) and higher prevalence of HPV-positive cases in the TCGA cohort (79.5% versus 35.3%; Supplementary Table 2).

Association between mutation status and clinical and outcome data. We tested whether the presence of mutation in the genes evaluated could be associated with the following demographical and clinical features: age at diagnosis, gender, tobacco consumption, drinking status, HPV status, T stage, N status and clinical stage. The only statistically significant association found was between *NOTCH1* mutation and tumor size: all tumors with *NOTCH1* mutation (11/11; $p = 0.023$) had a higher T-stage (T3/T4).

Next, we constructed Kaplan-Meier curves to assess the impact of gene mutations in recurrence-free survival of the patients tested. Although not statistically significant, the presence of mutation in at least one of the genes tested showed a decrease in recurrence-free survival (47.9% versus 80%; log rank p-value = 0.156), the same was observed for the presence of *TP53* (42.6% versus 75.9% for WT; log rank p-value = 0.137) (Table 3).

The presence of mutation in *NOTCH1*, significantly decreased the recurrence-free survival (RFS) of mutated cases (25.1% for mutated cases and 68.2% for WT; log-rank p-test = 0.032) (Table 3 and Fig. 2A). In a multivariate hazard ratio analysis for recurrence, adjusted by HPV and tobacco status, clinical stage, age at diagnosis, *TP53*, *PTEN* and *NOTCH1* mutation status, only *NOTCH1* mutation remained significant after stepwise selection, with a risk of recurrence of 4.503 for mutated cases (HR 95% CI = 1.112–14.572; Cox Regression $p = 0.034$) (Fig. 3).

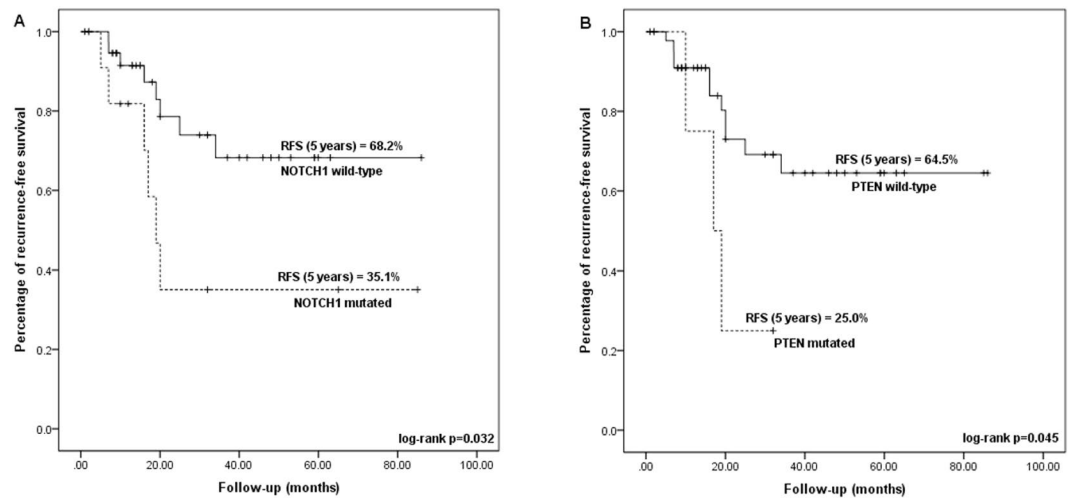


Figure 2. Kaplan Meier curves indicating the difference in 5-year recurrence-free survival (RFS) according to NOTCH1 (A) and PTEN (B) mutation status. The KM curves were generated using the software IBM SPSS Statistics Version 23.

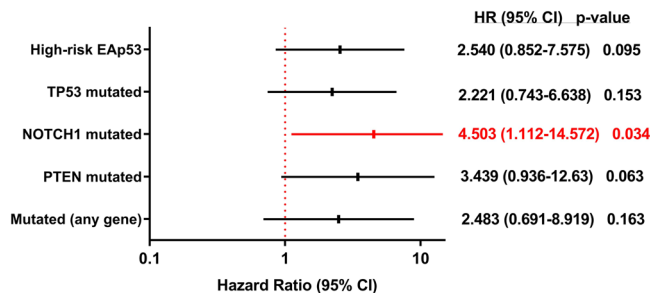


Figure 3. Forest plot with the hazard ratio values and 95% CI for selected molecular alterations (p-values were obtained through Cox regression test). The forest plot was generated using the software IBM SPSS Statistics Version 23.

The presence of *PTEN* mutation was also significantly associated with decreased recurrence-free survival (RFS: 25% versus 64.5% in WT; log rank p-test = 0.045) (Table 3 and Fig. 2B). However, the risk estimate by Cox regression was not statistically significant (Fig. 3).

Breakdown of TP53 effect in clinical outcome. As mentioned earlier, 45.1% (23/51) of the samples tested harbored *TP53* mutations. Although not statistically significant, we observed that the presence of *TP53* variants reduced recurrence-free survival (42.6% versus 75.9% for WT; log rank p-value = 0.137).

We further explored *TP53* missense mutations by using the Evolutionary Action score of *TP53*-coding variants (EAp53)^{38,39} to predict the impact of *TP53* mutations on outcome: 34.8% (8/23) of the mutated cases were scored as having low-risk variants, while 65.2% had high-risk variants. High-risk variants carriers had an increased risk of 2.540-fold of having a recurrence (HR 95% CI = 0.852–7.575; p-value = 0.095) and a marginally significant decreased recurrence-free survival (38.4% versus 71.8%; log rank p-test = 0.080) (Table 3).

Discussion

Oropharyngeal squamous cell carcinomas arise from epithelial cells of the mucosal lining of the upper aerodigestive tract and, despite all cases developing from one cell type in one tissue, these tumors are remarkably heterogeneous. This heterogeneity can be further explained by differences in etiology and in molecular alterations that drive carcinogenesis⁴².

OpSCC were classically associated with heavy tobacco and alcohol consumption; however, a significant decrease in cases related to tobacco/alcohol and an increase in cases related to infection by high-risk human papillomavirus (HPV) is being observed, especially in high and middle-income countries^{2,43}. In our cohort, most of the cases were current or former-smokers (86.3%) and only 35.3% were HPV-positive (by p16-IHC); even within the HPV-positive group, the majority of cases were smokers (66.7%). This information shows that tobacco smoking still seems to have a bigger impact in the onset of OpSCC treated at our institution. Despite the small number of cases evaluated in our study, tobacco smoking was significantly associated with reduced recurrence-free

survival (RFS), while HPV-status association with increased RFS was marginally significant. It is noteworthy that the majority of HPV-positive cases in our cohort were current or former smokers (12/18; 66.7%). HPV-positive OpSCC has a clearly improved outcome; however, smoking has a reportedly adverse effect on prognosis in both HPV-positive and HPV-negative cases⁶. This may have impacted the survival rates we observed, since although higher than in the HPV-negative group, the difference was not statistically significant.

Brazilian population has been frequently characterized by a considerable admixture of different ancestries in the genetic composition within individuals. Several studies have explored this admixture in large numbers of patients with the most prevalent tumor types (breast⁴⁴, colorectal³¹ and lung⁴⁵), as well as in the healthy population³⁴. All these studies found similar results, with a confirmed mixture of ancestry markers for the populations examined and a higher proportion of European ancestry markers, followed by African and then Asian and/or Native American in most of the patients. We were unable to test all our patients for genetic ancestry, but the small subset tested confirmed these results. Previous studies have shown differences in prevalence of mutation in specific genes according to genetic ancestry, such as an enrichment of *TP53* mutations in AFR and of *PIK3CA* in EUR⁴⁶. However, statistically significant confirmation of the genetic ancestry profile of the patients evaluated in this study and testing for any associations with the prevalence of gene mutations would require the evaluation of a substantially larger number of cases.

The most recent genomic progression model for head and neck cancer, resulting from new insights into the cancer genes that are commonly mutated in these tumors, points to different routes towards mucosal squamous cell carcinoma transformation. There seem to be three main genetic subgroups with two of them closely related to the etiology: (i) HPV-related; (ii) tobacco-related; and (iii) HPV-negative/tobacco-negative⁴². Our main findings will be discussed below based on these subgroups.

For HPV-positive cases, transcriptionally-active human papillomavirus leads to cell cycle deregulation through the abrogation of p53 and pRb pathways by the viral oncoproteins E6 and E7 (HPV E6 and E7). Further oncogenic events may lead to differentiation in HPV-KRT (HPV-keratinocyte differentiation and oxidative reduction process) or HPV-IMU (HPV-immune response and mesenchymal cell differentiation) tumors⁴⁷. p16 detection by immunohistochemistry (p16-IHC) was included in the clinical routine as the gold-standard test for HPV-positive oropharyngeal SCC with proved clinical impact^{18,48} due to its easy-of-use, low cost and high sensitivity rates (near 100%)^{41,49}. However, it frequently yields not ideal specificity rates (79% and 95%), detecting a positive p16 signal in tumors not associated with HPV^{48–50}. For this reason, several studies have suggested additional HPV-specific tests to ensure accurate classification of OpSCC as HPV-related^{48,51,52}. In our study, we performed HPV-DNA detection in a subset of the cases and observed a high agreement with p16-IHC results. Moreover, molecular characterization closely agreed with other studies that also used HPV-status to describe results. HPV-positive tumors usually have a lower mutational burden, are usually WT for *TP53* mutations and frequently harbor activating *PIK3CA* mutations and amplifications (mainly the HPV-KRT)^{20,22,47,53}. In accordance to this, in our cohort, HPV-negative cases had 2.5-times more variants than HPV-positive cases (3.27 ± 5.854 versus 1.33 ± 3.162 , respectively). Moreover, even though most of our HPV-positive cases were smokers (12/18; 66.7%), the frequency of *TP53* mutation in this subgroup was significantly lower (16.7%; $p = 0.003$). Conversely, we found 2 HPV-positive case with *PIK3CA* mutation (2/18; 11.1%); a classic C > T mutation in the helical domain, frequent in viral-associated tumors (p.E545K) and commonly associated with the apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic subunit (APOBEC)-induced mutational signature^{24,54}. Hayes and colleagues reported in a review article a frequency between 22–56% of *PIK3CA* activation in HPV-positive HNC; however, we only evaluated somatic mutations in the present study and did not explore copy-number alterations (CNA). This might explain the lower frequency in comparison to other studies that relate this activation both to mutation and amplification in HPV-positive cases⁵³. As expected, besides *TP53*, genes frequently mutated in tobacco-related HNC had a low frequency of mutation in the HPV-positive group, namely *NOTCH1* (1/18; 5.6%), *CDKN2A* (2/18; 11.1%) and *FAT1* (3/18; 16.7%)^{53,55}.

The second and most classic subgroup of HNC is associated with tobacco-smoking and also involves deregulation of the cell cycle mainly through loss-of-function (LoF) of two tumor suppressor genes: *TP53* and *CDKN2A*. *CDKN2A* encodes the p16INK4A protein and is lost through deletion, inactivating mutations and hypermethylation in 15–22% of HNC⁵³. Together with the frequent amplification of cyclin D1 (*CCND1*), also common in tobacco-associated HNC, *CDKN2A* LoF contributes to unscheduled DNA replication and leads to DNA damage and p53 activation⁵⁶; however, *TP53* inactivation is also found in 60–80% of HNC cases^{5,24}, thus abrogating cell cycle arrest and apoptosis⁵⁷. Consequently, these tumors have a higher mutational burden and frequent copy number alterations⁴². In our cohort, we found an overall rate of *CDKN2A* and *TP53* mutation of 9.8% and 45.1%, respectively. Dogan and colleagues found similar rates, when using a targeted exome sequencing approach to characterize 83 HPV-negative and 74 HPV-positive OpSCC⁵⁸: 49% of the cases were mutated for *TP53*, while 22% harbored *CDKN2A* mutations and deletions. Moreover, we did not test for *CDKN2A* inactivation through deletion or hypermethylation. However, among mutated cases, these genes were more frequently mutated in current/former smokers with rates of 83.3% for *CDKN2A* and 95.7% for *TP53*. The breakdown rates according to HPV status were: 78%/16% for *TP53* mutations in HPV-negative/positive cases and 39% versus 4% for *CDKN2A* mutations in HPV-negative/positive cases. It is already known that the presence of *TP53* mutations has an important impact in disease progression, treatment response, specially to platinum-based therapy, and survival^{59–62}. Although not statistically significant, we observed that the presence of *TP53* variants reduced recurrence-free survival (42.6% versus 75.9% for WT; log rank p -value = 0.137). Next, we explored whether the algorithm Evolutionary Action (EAp53), that stratifies patients according to *TP53* variants associated with especially poor outcomes^{38,39}, could be used as a classificatory in our cohort. The association of *TP53* variants classified with EAp53 still did not reach significance, but it is clear that, for our patients, high-risk variants carriers had an increased risk of 2.540-fold of having a recurrence (HR 95% CI = 0.852–7.575; p -value = 0.095) and a marginally significant decreased recurrence-free survival (38.4% versus 71.8%; log rank p -test = 0.080). Previous

studies have tested this algorithm in HPV-negative HNC and validated the association of high-risk *TP53* variants, as classified by EAp53, with decreased sensitivity to cisplatin, decreased survival and increased distant metastases in HNC^{38,39}. Here we focused our analysis in OpSCC patients with a significant representation of HPV-positive cases and treated by chemoradiation. These differences should be taken into consideration in the interpretation of the algorithm results.

After cell-cycle abrogation, HPV-negative/tobacco-positive cases usually acquire more alterations that drive different routes towards the progression of these tumors. These pathways usually involve squamous differentiation, oxidative stress and WNT signaling. Between 10–21% of HNC demonstrate LoF mutations in *NOTCH1*, impacting squamous differentiation and cell polarity, while 5–23% of cases harbor mutations in *FAT1*, an important component of the WNT signaling⁵³. This route seems to impact beta-catenin signaling and keratinocyte transformation, and tobacco-smoking is a known risk factor⁴². We found similar rates of mutated cases for these genes in our cohort, and the majority of cases mutated for *NOTCH1* and *FAT1* were current or former smokers. Moreover, we found an association between *NOTCH1* mutation and a higher T stage, consistent with previous studies showing that functional *NOTCH1* inhibits proliferation in SCC cells and that loss of canonical NOTCH increases tumorigenesis in both HPV-positive and p53-mutant mice^{21,63}. In addition, the presence of *NOTCH1* mutations significantly impacted recurrence-free survival. Emerging evidence indicates that Notch effects are dependent on the cellular context in which it is activated, with aberrant Notch signaling being associated with cancer recurrence, metastasis and treatment resistance in different tumor sites⁶⁴. In a recent study, Lim and colleagues tested the feasibility of using targeted NGS to guide treatment of HNC patients, among the genes with association with a poorer overall survival they found *NOTCH1* mutation as a predictor of worse outcome⁶⁵. Similarly, Dong and colleagues found that in HPV-positive OpSCC cases, the presence of *NOTCH1* mutations contributed to a worse overall-survival⁵⁸. Vettore and colleagues also found an association between the presence of mutations in genes of the Notch pathway and a lower disease-free survival in patients with oral tongue carcinoma⁶⁶. In a cohort of esophageal carcinomas from China, Song and colleagues found that patients with mutations in *NOTCH1* had shorter survival and failed to respond to chemotherapy⁶⁷. These results agree with our findings that the status of *NOTCH1* mutations is a promising predictive biomarker for patient outcome and treatment response in OpSCC.

Finally, *PTEN* is a tumor suppressor gene mutated in 9–23% of HPV-negative HNC, leading to oncogenic activity through the activation of the PI3K/AKT/mTOR signaling⁴². We found *PTEN* mutations in 7.8% of the cases tested; once again, this rate does not include CNAs. Interestingly, we observed a significant decrease in recurrence-free survival in the presence of *PTEN* mutation (25% versus 64.5% in WT; log rank p-test = 0.045). A recent study found that patients with high-expressing *PTEN* had an improved progression-free survival in response to cetuximab, in comparison to patients with low expression of this gene⁶⁸. A similar scenario was observed in a Brazilian study on HNC patients treated with cetuximab, with a worse progression-free and overall-survival in patients with loss of *PTEN*⁶⁹.

To our knowledge, this is the first study showing the association between *NOTCH1* and *PTEN* mutations and survival in OpSCC patients treated with platin-based chemotherapy plus radiation.

The third subgroup of HNC comes mainly from previous studies that identified a subset of HNC with a strong correlation between gain of function *HRAS* mutations and LoF mutation in *CASP8*^{21,42,70}. This subgroup is usually described as diploid, as having fewer CNAs, DNA mismatch repair proficient and to occur more frequently in women with oral cavity tumors without a history of alcohol and smoking consumption^{21,70}. The prevalence rates of this subgroup and the clinical impact is yet to be studied⁴². We did not detect any case with *CASP8* variants in our cohort; moreover, all 3 cases identified with *HRAS* mutation were current or former smokers and one of them was also HPV-positive.

Although differences in the mutation rates of specific genes were observed, mostly due to different prevalence of risk factors (HPV and tobacco smoking), when comparing the results on our cohort and the TCGA OpSCC samples explored, the frequency of cases mutated for at least one of the genes was similar (62.7% versus 64.1%). In the TCGA publication with genomic data on head and neck cancer, only 14% of the samples tested did not present mutation in any gene²⁴. Besides including data from all subsites within head and neck cancer, the mutation data reported in the article compiled results from whole exome sequencing, while we only tested a panel of a limited number of genes. This can explain the similarities between mutation rates in the two cohorts of OpSCC samples explored in this article in comparison to the frequency reported in the TCGA publication.

Recently, Perdomo and collaborators, evaluated a similar panel of genes in a cohort comprised of 180 HNC from 3 multicentric studies from South America and Europe³⁰. The study reports that 25% of the cases were from the oropharynx (45/180), and only 8% of the entire cohort was HPV-positive (15/180)³⁰. Therefore, their cohort was enriched for HPV-negative cases, and, although the number of OpSCC tested was similar to ours, only around 8% were HPV-positive, in contrast to our 35.3% frequency of HPV-positivity. This might explain the slightly lower rates of *TP53* mutations and other genes associated with tobacco-smoking in our cohort in comparison to their findings. In addition, they also explored somatic CNA, that are also included in their higher rates.

Our study has some limitations being the small number of cases evaluated and the short follow-up (median of 26 months) possibly the most important ones, directly impacting the statistical significance of the molecular findings in patient outcome. Besides that, we also did not evaluate copy-number alterations of the genes included, hindering comparisons to other genomic studies that include amplification and deletion in the mutational frequencies. It is important to point out that there is a lack of genomic studies including Brazilian cases; therefore, our study focused in the profile of somatic variants of a set of genes in a cohort of Brazilian OpSCC patients submitted to a homogeneous treatment and with sufficient and well-annotated clinical data. Despite of differences in geographic, economic and social habits when compared to other populations, the results were comparable to those reported before and new insights into possible molecular mechanisms associated with outcome were suggested.

Conclusions

In conclusion, we report here the results on the genetic characterization of a set of HNC-related genes in a cohort of OpSCC patients. Some of the findings suggest the clinical relevance of genomic approaches to better classify subgroups of patients with different outcomes. Validation of these data could lead to a more refined prognostic stratification and contribute to a personalized treatment approach of OpSCC patients.

Ethics approval and consent to participate. Informed consent was obtained from each individual prior to sample collection and the study protocol was approved by the Barretos Cancer Hospital Institutional Review Board.

Data availability

All data and materials are available upon request to the Corresponding Author.

Received: 18 February 2020; Accepted: 21 May 2020;

Published online: 19 June 2020

References

1. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, <https://doi.org/10.3322/caac.21492> (2018).
2. Shield, K. D. *et al.* The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. *CA: a cancer journal for clinicians* **67**, 51–64, <https://doi.org/10.3322/caac.21384> (2017).
3. Gillison, M. L. *et al.* Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* **100**, 407–420, <https://doi.org/10.1093/jnci/djn025> (2008).
4. Leemans, C. R., Snijders, P. J. F. & Brakenhoff, R. H. Publisher Correction: The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature reviews. Cancer* **18**, 662, <https://doi.org/10.1038/s41568-018-0057-9> (2018).
5. Leemans, C. R., Braakhuis, B. J. & Brakenhoff, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews. Cancer* **11**, 9–22, <https://doi.org/10.1038/nrc2982> (2011).
6. Ang, K. K. *et al.* Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *The New England journal of medicine* **363**, 24–35, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0912217> (2010).
7. Brierley, J. e., Gospodarowicz, M. K. e. & Wittekind, C. e. *TNM classification of malignant tumours*. Eighth edition. edn.
8. Dansky Ullmann, C., Harlan, L. C., Shavers, V. L. & Stevens, J. L. A population-based study of therapy and survival for patients with head and neck cancer treated in the community. *Cancer* **118**, 4452–4461, <https://doi.org/10.1002/cncr.27419> (2012).
9. Haddad, R., Annino, D. & Tishler, R. B. Multidisciplinary approach to cancer treatment: focus on head and neck cancer. *Dental clinics of North America* **52**, 1–17, vii, <https://doi.org/10.1016/j.cden.2007.10.005> (2008).
10. Cramer, J. D., Burtness, B., Le, Q. T. & Ferris, R. L. The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. *Nature reviews. Clinical oncology* **16**, 669–683, <https://doi.org/10.1038/s41571-019-0227-z> (2019).
11. Gatta, G. *et al.* Prognoses and improvement for head and neck cancers diagnosed in Europe in early 2000s: The EURO CARE-5 population-based study. *Eur J Cancer* **51**, 2130–2143, <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2015.07.043> (2015).
12. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin* **68**, 7–30, <https://doi.org/10.3322/caac.21442> (2018).
13. Abraham, R. *et al.* Predictors of Survival After Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in South America: The InterCHANGE Study. *JCO Glob Oncol* **6**, 486–499, <https://doi.org/10.1200/GO.20.00014> (2020).
14. Hoffman, H. T., Karnell, L. H., Funk, G. F., Robinson, R. A. & Menck, H. R. The National Cancer Data Base report on cancer of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* **124**, 951–962, <https://doi.org/10.1001/archotol.124.9.951> (1998).
15. Boysen, M., Natvig, K., Winther, F. O. & Tausjo, J. Value of routine follow-up in patients treated for squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Otolaryngol* **14**, 211–214 (1985).
16. D'Souza, G. *et al.* Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* **356**, 1944–1956, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa065497> (2007).
17. Benson, E., Li, R., Eisele, D. & Fakhry, C. The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* **50**, 565–574, <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.09.008> (2014).
18. Huang, S. H. & O'Sullivan, B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol* **18**, 40, <https://doi.org/10.1007/s11864-017-0484-y> (2017).
19. Lui, V. W. *et al.* Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer discovery* **3**, 761–769, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0103> (2013).
20. Stransky, N. *et al.* The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* **333**, 1157–1160, <https://doi.org/10.1126/science.1208130> (2011).
21. Pickering, C. R. *et al.* Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer discovery* **3**, 770–781, <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0537> (2013).
22. Agrawal, N. *et al.* Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* **333**, 1154–1157, <https://doi.org/10.1126/science.1206923> (2011).
23. Mountzios, G., Rampias, T. & Psyrri, A. The mutational spectrum of squamous-cell carcinoma of the head and neck: targetable genetic events and clinical impact. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology* **25**, 1889–1900, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu143> (2014).
24. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* **517**, 576–582, <https://doi.org/10.1038/nature14129> (2015).
25. van Beers, E. H. *et al.* A multiplex PCR predictor for aCGH success of FFPE samples. *Br J Cancer* **94**, 333–337, <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602889> (2006).
26. Begum, S., Gillison, M. L., Ansari-Lari, M. A., Shah, K. & Westra, W. H. Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **9**, 6469–6475 (2003).
27. Singhi, A. D. & Westra, W. H. Comparison of human papillomavirus *in situ* hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer* **116**, 2166–2173, <https://doi.org/10.1002/cncr.25033> (2010).
28. de Carvalho, A. C. *et al.* Clinical and Molecular Characterization of Surgically Treated Oropharynx Squamous Cell Carcinoma Samples. *Pathology oncology research: POR*, <https://doi.org/10.1007/s12253-018-0462-0> (2018).
29. Hanna, G. J. *et al.* Plasma HPV cell-free DNA monitoring in advanced HPV-associated oropharyngeal cancer. *Ann Oncol* **29**, 1980–1986, <https://doi.org/10.1093/annonc/mdy251> (2018).
30. Perdomo, S. *et al.* Genomic analysis of head and neck cancer cases from two high incidence regions. *PLoS one* **13**, e0191701, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191701> (2018).

31. Duraes, R. O. *et al.* Role of Genetic Ancestry in 1,002 Brazilian Colorectal Cancer Patients From Barretos Cancer Hospital. *Front Oncol* **10**, 145, <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.00145> (2020).
32. Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular ecology notes* **7**, 574–578, <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x> (2007).
33. Pritchard, J. K., Stephens, M. & Donnelly, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**, 945–959 (2000).
34. Campanella, N. C. *et al.* Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers. *Eur J Hum Genet* **22**, 875–880, <https://doi.org/10.1038/ejhg.2013.256> (2014).
35. Giolo, S. R. *et al.* Brazilian urban population genetic structure reveals a high degree of admixture. *European journal of human genetics: EJHG* **20**, 111–116, <https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.144> (2012).
36. Tamborero, D. *et al.* Cancer Genome Interpreter annotates the biological and clinical relevance of tumor alterations. *Genome medicine* **10**, 25, <https://doi.org/10.1186/s13073-018-0531-8> (2018).
37. de Leng, W. W. *et al.* Targeted Next Generation Sequencing as a Reliable Diagnostic Assay for the Detection of Somatic Mutations in Tumours Using Minimal DNA Amounts from Formalin Fixed Paraffin Embedded Material. *PLoS one* **11**, e0149405, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149405> (2016).
38. Neskey, D. M. *et al.* Evolutionary Action Score of TP53 Identifies High-Risk Mutations Associated with Decreased Survival and Increased Distant Metastases in Head and Neck Cancer. *Cancer research* **75**, 1527–1536, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2735> (2015).
39. Osman, A. A. *et al.* Evolutionary Action Score of TP53 Coding Variants Is Predictive of Platinum Response in Head and Neck Cancer Patients. *Cancer research* **75**, 1205–1215, <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2729> (2015).
40. Amin, M. B. *et al.* *AJCC Cancer Staging Manual*. 8 edn, (Springer International Publishing, 2017).
41. Lewis, J. S. Jr. *et al.* Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists. *Arch Pathol Lab Med* **142**, 559–597, <https://doi.org/10.5858/arpa.2017-0286-CP> (2018).
42. Leemans, C. R., Snijders, P. J. F. & Brakenhoff, R. H. The molecular landscape of head and neck cancer. *Nature reviews. Cancer* **18**, 269–282, <https://doi.org/10.1038/nrc.2018.11> (2018).
43. Castellsague, X. *et al.* HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients. *Journal of the National Cancer Institute* **108**, djv403, <https://doi.org/10.1093/jnci/djv403> (2016).
44. Fernandes, G. C. *et al.* Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. *Oncotarget* **7**, 80465–80481, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12610> (2016).
45. Leal, L. F. *et al.* Mutational profile of Brazilian lung adenocarcinoma unveils association of EGFR mutations with high Asian ancestry and independent prognostic role of KRAS mutations. *Sci Rep* **9**, 3209, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39965-x> (2019).
46. Yuan, J. *et al.* Integrated Analysis of Genetic Ancestry and Genomic Alterations across Cancers. *Cancer Cell* **34**, 549–560 e549, <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.08.019> (2018).
47. Zhang, Y. *et al.* Subtypes of HPV-Positive Head and Neck Cancers Are Associated with HPV Characteristics, Copy Number Alterations, PIK3CA Mutation, and Pathway Signatures. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **22**, 4735–4745, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-0323> (2016).
48. Jordan, R. C. *et al.* Validation of methods for oropharyngeal cancer HPV status determination in US cooperative group trials. *The American journal of surgical pathology* **36**, 945–954, <https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e318253a2d1> (2012).
49. Bishop, J. A., Lewis, J. S. Jr., Rocco, J. W. & Faquin, W. C. HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck: An update on testing in routine pathology practice. *Semin Diagn Pathol* **32**, 344–351, <https://doi.org/10.1053/j.semmp.2015.02.013> (2015).
50. Marur, S., D'Souza, G., Westra, W. H. & Forastiere, A. A. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet. Oncology* **11**, 781–789, [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(10\)70017-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(10)70017-6) (2010).
51. Prigge, E. S., Arbyn, M., von Knebel Doeberitz, M. & Reuschenbach, M. Diagnostic accuracy of p16(INK4a) immunohistochemistry in oropharyngeal squamous cell carcinomas: A systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer* **140**, 1186–1198, <https://doi.org/10.1002/ijc.30516> (2017).
52. Westra, W. H. Detection of human papillomavirus (HPV) in clinical samples: evolving methods and strategies for the accurate determination of HPV status of head and neck carcinomas. *Oral Oncol* **50**, 771–779, <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.05.004> (2014).
53. Hayes, D. N., Van Waes, C. & Seiwert, T. Y. Genetic Landscape of Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer and Comparison to Tobacco-Related Tumors. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* **33**, 3227–3234, <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.62.1086> (2015).
54. Henderson, S., Chakravarthy, A., Su, X., Boshoff, C. & Fenton, T. R. APOBEC-mediated cytosine deamination links PIK3CA helical domain mutations to human papillomavirus-driven tumor development. *Cell reports* **7**, 1833–1841, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.012> (2014).
55. Seiwert, T. Y. *et al.* Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **21**, 632–641, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-3310> (2015).
56. Toledo, L., Neelsen, K. J. & Lukas, J. Replication Catastrophe: When a Checkpoint Fails because of Exhaustion. *Molecular cell* **66**, 735–749, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.001> (2017).
57. Levine, A. J. & Oren, M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nature reviews. Cancer* **9**, 749–758, <https://doi.org/10.1038/nrc2723> (2009).
58. Dogan, S. *et al.* Identification of prognostic molecular biomarkers in 157 HPV-positive and HPV-negative squamous cell carcinomas of the oropharynx. *International journal of cancer* **145**, 3152–3162, <https://doi.org/10.1002/ijc.32412> (2019).
59. Poeta, M. L. *et al.* TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *The New England journal of medicine* **357**, 2552–2561, <https://doi.org/10.1056/NEJMoa073770> (2007).
60. Zhou, G., Liu, Z. & Myers, J. N. TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *Journal of cellular biochemistry* **117**, 2682–2692, <https://doi.org/10.1002/jcb.25592> (2016).
61. Tandon, S., Tudur-Smith, C., Riley, R. D., Boyd, M. T. & Jones, T. M. A systematic review of p53 as a prognostic factor of survival in squamous cell carcinoma of the four main anatomical subsites of the head and neck. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention: a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* **19**, 574–587, <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0981> (2010).
62. Perrone, F. *et al.* TP53 mutations and pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin and fluorouracil chemotherapy in resected oral cavity squamous cell carcinoma. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 761–766, <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.4170> (2010).
63. Nyman, P. E., Buehler, D. & Lambert, P. F. Loss of Function of Canonical Notch Signaling Drives Head and Neck Carcinogenesis. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* **24**, 6308–6318, <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-3535> (2018).
64. Brzozowa-Zasada, M. *et al.* Notch signalling pathway as an oncogenic factor involved in cancer development. *Contemporary oncology* **20**, 267–272, <https://doi.org/10.5114/wo.2016.61845> (2016).

65. Lim, S. M. *et al.* Investigating the Feasibility of Targeted Next-Generation Sequencing to Guide the Treatment of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer research and treatment: official journal of Korean Cancer Association* **51**, 300–312, <https://doi.org/10.4143/crt.2018.012> (2019).
66. Vettore, A. L. *et al.* Mutational landscapes of tongue carcinoma reveal recurrent mutations in genes of therapeutic and prognostic relevance. *Genome medicine* **7**, 98, <https://doi.org/10.1186/s13073-015-0219-2> (2015).
67. Song, B. *et al.* Mutually exclusive mutations in NOTCH1 and PIK3CA associated with clinical prognosis and chemotherapy responses of esophageal squamous cell carcinoma in China. *Oncotarget* **7**, 3599–3613, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6120> (2016).
68. Eze, N. *et al.* PTEN loss is associated with resistance to cetuximab in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oral oncology* **91**, 69–78, <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.02.026> (2019).
69. da Costa, A. *et al.* The roles of PTEN, cMET, and p16 in resistance to cetuximab in head and neck squamous cell carcinoma. *Medical oncology* **36**, 8, <https://doi.org/10.1007/s12032-018-1234-0> (2018).
70. Smeets, S. J. *et al.* Genetic classification of oral and oropharyngeal carcinomas identifies subgroups with a different prognosis. *Cellular oncology: the official journal of the International Society for Cellular Oncology* **31**, 291–300, <https://doi.org/10.3233/CLO-2009-0471> (2009).

Acknowledgements

ACC, BPS, LMRA and LMJ were recipients of scholarship from São Paulo Research Foundation (FAPESP); WS was a recipient of a scholarship from Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Capes); and RMR and ALC had a National Counsel for Technological and Scientific Development (CNPq) scholarship. This study was funded by São Paulo Research Foundation (FAPESP; grant # 2015/01286-0), National Counsel for Technological and Scientific Development (CNPq; grant # 445.053/2014-3), Barretos Cancer Hospital, and the Public Ministry of Labor Campinas (Research, Prevention, and Education of Occupational Cancer).

Author contributions

A.C.C. study design, sample selection, sample processing, sequencing experiments and analysis, clinical data collection, statistical analysis, manuscript preparation. S.P. study design, sequencing analysis, manuscript review. W.S. sequencing analysis, manuscript review. G.C.F. sequencing experiments and analysis. L.M.J. sample selection, sample processing, sequencing experiments, clinical data collection. R.S.C. sample selection, clinical data collection. C.S.N. and G.C.A. histopathological evaluations. B.P.S. sample processing and sequencing experiments. L.M.R.A. and M.E.M. study design and analysis. P.M. clinical data collection and interpretation. N.H. and R.M.R. study design and manuscript review. A.L.C. study design and coordination, manuscript review.

Competing interests

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Additional information

Supplementary information is available for this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-020-66741-z>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.L.C.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2020



**Feasibility of methylated ctDNA detection in plasma samples
of oropharyngeal squamous cell carcinoma patients**

Journal:	<i>Head & Neck</i>
Manuscript ID	HED-19-1499.R2
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	18-May-2020
Complete List of Authors:	Machado , Lais; Barretos Cancer Hospital Bisarro, Mariana; Barretos Cancer Hospital Carvalho, Raiany; Barretos Cancer Hospital Scapulatempo Neto, Cristovam; Barretos Cancer Hospital, Pathology Caravina, Gisele; Barretos Cancer Hospital LAUS, ANA CAROLINA; Hospital de Cancer de Barretos, Molecular Oncology Research Center Taqes, Gabriela; Barretos Cancer Hospital Leal, Leticia; Barretos Cancer Hospital MELENDEZ, MATIAS; Hospital de Cancer de Barretos, Molecular Oncology Research Center DE MARCHI, PEDRO; Hospital de Cancer de Barretos, Medical Oncology Manuel Reis, Rui; Hospital de Cancer de Barretos Carvalho, André ; Hospital de Cancer de Barretos, Head and Neck Department de Carvalho, Ana Carolina; Barretos Cancer Hospital,
Key Words:	OpSCC, liquid biopsy, DNA methylation, biomarkers, digital PCR

SCHOLARONE™
Manuscripts