

**INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES DE
RESPOSTA A QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE
EM PACIENTES COM CARCINOMA DE
OROFARINGE**

JULIA BETTE HOMEM DE MELLO

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

**Co-Orientadora: Profa. Dra Silvia Regina
Rogatto**

São Paulo

2019

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Melo, Julia Bette Homem de
Investigação de marcadores de resposta a quimioterapia neoadjuvante em pacientes com carcinoma de orofaringe / Julia Bette Homem de Mello – São Paulo, 2019.
127p.
Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.
Orientador: Luiz Paulo Kowalski

Descritores: 1. Neoplasias Orofaríngeas/Oropharyngeal Neoplasms. 2. Neoplasias de Cabeça e Pescoço/Head and Neck Neoplasms. 3. Terapia Neoadjuvante/Neoadjuvant Therapy 4. Quimioterapia de indução/Induction Chemotherapy. 5. Carcinoma de Células Escamosas/Carcinoma, Squamous Cell. 6. Biomarcadores Tumoriais/Biomarkers, Tumor.

DEDICATÓRIA

À minha mãe e meu pai, pelo exemplo de dedicação, persistência e superação. E pelo incentivo a nunca desistir e acreditar nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr Luiz Paulo Kowalski, e minha co-orientadora Profa. Dra. Silvia Regina Rogatto, pela oportunidade de aprendizado. Por toda orientação durante o desenvolvimento do estudo e principalmente na superação dos desafios, proporcionando sempre crescimento profissional e pessoal.

Ao Dr. Mateus de Camargo Barros Filho, pelos ensinamentos, todo suporte e ajuda ao longo do estudo e nas análises estatísticas.

Aos pesquisadores que colaboraram para realização desse estudo, Dra Adriana Paes Leme, Dra Ariane Busso, Dr Clóvis Pinto e Dr Ulisses Nicolau.

Ao Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências, CNPEM, Campinas, SP pelo suporte nas análises de espectrometria de massas.

Ao A.C.Camargo Câncer Center, CIPE e Fundação Antônio Prudente pela estrutura, apoio e suporte para desenvolvimento deste estudo.

A CAPES, CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, Silvia e Orlando, por darem todo apoio necessário para essa jornada.

Aos amigos e familiares pelo apoio e conselhos nos momentos mais precisos.

Agradeço a todos que de alguma forma colaboraram para realização desse estudo.

RESUMO

Mello JBH. **Investigação de marcadores de resposta a quimioterapia neoadjuvante em pacientes com carcinoma de orofaringe.** São Paulo; 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

A resistência a quimioterapia é um dos principais fatores para falhas no tratamento dos pacientes com carcinoma epidermóide de orofaringe (CCEO). O regime mais frequentemente utilizado nestes casos é a quimioterapia de indução (IC) com taxano, platina e 5-fluorouracil. Apesar da maioria dos pacientes responderem satisfatoriamente ao tratamento, uma parcela deles apresenta resposta insatisfatória podendo ocorrer progressão tumoral. Outro fator crítico é a alta taxa de toxicidade, especialmente no grupo de pacientes que não se beneficia do tratamento. Até o momento, não há marcadores moleculares capazes de auxiliar na predição da resposta e evolução da doença disponíveis na prática clínica desses tumores. Este estudo teve como objetivo desenvolver um painel de marcadores para prever a resposta da quimioterapia de indução. Para isso, investigamos o perfil de expressão gênica (22 CCEO) e proteica (20 CCEO) e comparamos os grupos de acordo com a resposta a IC (resposta satisfatória, RS vs insatisfatória, RI). A análise de transcritos revelou 200 genes diferencialmente expressos entre os grupos, sendo 87 com expressão diminuída e 113 com aumento de expressão nos pacientes não respondedores em relação aos respondedores. A partir desses genes desenvolvemos um modelo de predição com cinco marcadores (*GPSM2*, *CPNE2*, *FOXRED2*, *BCHE* e *KLKB1*), o qual foi capaz de classificar 100% dos pacientes de acordo com a resposta a IC. Esse algoritmo foi aplicado aos dados de expressão do TCGA e apresentou bom desempenho como marcador de prognóstico independente do tratamento. Os genes com aumento de expressão foram utilizados para identificar proteínas potencialmente secretadas possíveis de serem utilizadas como marcadores

detectáveis em biópsia líquida. Esta análise resultou em quatro potenciais marcadores secretados em RI (CR1, KLKB1, FBLN1 e MOB1A) e cinco em RS (PCSK5, RET, PRPH2, CST6 e BCHE). A análise proteômica por espectrometria de massas revelou 183 proteínas diferencialmente expressas entre os grupos, sendo 127 com expressão diminuída e 56 com expressão aumentada nos pacientes RI em relação ao grupo RS. A partir dessas proteínas, desenvolvemos um classificador de predição de IC com quatro marcadores (CDKN2A, HNRNPA0, MYO1B e TXNL1), os quais foram capazes de classificar corretamente todas as amostras de acordo com a resposta ao tratamento. As proteínas com aumento de expressão nos tumores foram investigadas quanto ao potencial de serem secretadas, sendo possível identificar oito potenciais marcadores secretados em RI e 19 em RS. A análise integrada dos transcritos e proteínas diferencialmente expressas revelou apenas uma molécula em comum, o MOB1A. Uma análise *in silico* das vias biológicas associadas às moléculas entre os grupos em ambas as análises moleculares revelou diversas vias de regulação comuns entre os grupos de proteínas e transcritos. As principais vias canônicas alteradas estão associadas a regulação do ciclo celular, incluindo ciclo celular, transição G1/S e fase S. Este estudo revelou diversos marcadores com potencial para ser aplicado na prática clínica, auxiliando na tomada de decisões terapêuticas de forma mais personalizada. Esses achados embora promissores necessitem ser validados em uma coorte maior de pacientes.

Descritores: Neoplasias Orofaringeas. Neoplasias de Cabeça e Pescoço. Terapia Neoadjuvante. Quimioterapia de indução. Carcinoma de Células Escamosas. Biomarcadores Tumorais.

SUMMARY

Mello JBH. **[Investigation of molecular biomarkers to predict neoadjuvant chemotherapy response in patients with oropharyngeal carcinoma]**. São Paulo, 2019. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Resistance to chemotherapy is one of the main causes for treatment failure in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma (OSCC). The induction to chemotherapy treatment with taxane, platinum and 5-fluoracil has been widely used. Although most patients shows good response to treatment (RS), a set of cases present unsatisfactory response (RI) and tumor progression may occur. An additional critical issue is the high toxicity rate, especially for patients who will not benefit from the treatment. To date, there are no molecular markers available in the clinical practice capable to predict response and disease progress. This study aimed to develop a panel of markers capable of predicting induction to chemotherapy response. We investigated gene and protein expression profile of 22 and 20 OSCC, respectively, and compared the groups according to the response to IC (satisfactory response vs. unsatisfactory response). Gene expression data analysis from a previous study of our group, revealed 200 differentially expressed genes, 87 downregulated and 113 genes with overexpression in nonresponders compared to responders cases. Using these genes, we developed a prediction model with five markers (*GPSM2*, *CPNE2*, *FOXRED2*, *BCHE* and *KLKB1*) able to classify 100% of the patients according to the response to IC. This algorithm was applied to the TCGA expression data and presented good performance as a prognostic marker independent of the treatment. Overexpressed genes were used to identify potentially secreted proteins with potential to be used as detectable markers in liquid biopsy. This analysis revealed four potential markers in RI (CR1, KLKB1, FBLN1 and MOB1A) and five in RS (PCSK5, RET, PRPH2, CST6

and BCHE). Proteomic analysis using mass spectrometry revealed 183 differentially expressed proteins between the groups, 127 downexpressed and 56 overexpressed in RI patients compared to RS group. Using these proteins, we developed a prediction algorithm using four biomarkers (CDKN2A, HNRNPA0, MYO1B and TXNL1) able to correctly classify all tumors according to the response to treatment. Overexpressed proteins with potential to be secreted were investigated revealing eight potential markers secreted in IR and 19 in RS. The integrative analysis of differentially expressed transcripts and proteins revealed one molecule in common, MOB1A. In silico pathway analysis resulted in common biological pathways in both group of cases. The major altered canonical pathways are associated with cell cycle regulation, being Cell cycle, G1 / S Transition and S Phase. Our study revealed several candidate markers with potential to be applied in the clinical practice, assisting in therapeutic decisions. Although promisor, these findings need to be validated in a larger cohort of patients.

Key words: Oropharyngeal Neoplasms. Head and Neck Neoplasms. Neoadjuvant Therapy. Induction Chemotherapy. Carcinoma, Squamous Cell. Biomarkers, Tumor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Fluxograma representando as etapas realizadas neste estudo.....	35
Figura 2	Fluxograma ilustrando as metodologias e resultados obtidos em cada etapa do projeto.....	49
Figura 3	Curva de sobrevida global em 5 anos de acordo com a resposta a quimioterapia de indução	53
Figura 4	Curva de sobrevida global em 5 anos de acordo com o status do HPV	55
Figura 5	Análise de agrupamento hierárquico dos transcritos diferencialmente expressos.....	58
Figura 6	Modelos de predição de resposta a quimioterapia de indução em tumores de orofaringe baseados em expressão gênica.....	61
Figura 7	Curva de sobrevida de acordo com o classificar utilizando os dados do TCGA.....	62
Figura 8	Análise in silico dos transcritos potencialmente secretados..	65
Figura 9	Análise hierárquica não supervisionada incluindo 1551 proteínas presentes em pelo menos 75% dos tumores de cada grupo	69

Figura 10	Clusterização das 183 proteínas diferencialmente expressas entre os grupos 1 e 2 evidenciando uma intersecção com dois agrupamentos	72
Figura 11	Modelos de predição de resposta a quimioterapia de indução em tumores de orofaringe baseados em expressão proteica	75
Figura 12	A esquerda, fluxograma representando as etapas da análise de secretoma	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características associadas ao grau de risco do câncer de orofaringe	11
Tabela 2	Dados clínicos dos 39 pacientes incluídos no estudo, entre eles, 20 foram avaliados por espectrometria de massa, 22 por análise de expressão gênica e secretoma, sendo que 3 pacientes foram avaliadas por ambas metodologias.....	51
Tabela 3	Lista dos 20 transcritos com maior diferença de expressão (aumento e diminuição de expressão) entre os tumores de pacientes não respondedores ao tratamento em relação ao grupo respondedor.....	57
Tabela 4	Transcritos candidatos a marcadores de resposta a tratamento (20 maiores área abaixo da curva ROC)	60
Tabela 5	Proteínas potencialmente secretadas por tumores de orofaringe de acordo com a resposta ao tratamento neoadjuvante utilizando as ferramentas de predição CBS server, Vesiclepedia/ Exocarta e Plasma Proteome.....	66
Tabela 6	Número de proteínas identificadas em 20 carcinomas de orofaringe	68
Tabela 7	Lista das 20 proteínas com maior diferença de expressão (aumento e diminuição de expressão) entre os tumores de pacientes não respondedores ao tratamento em relação ao grupo respondedor.....	71

Tabela 8	Proteínas candidatas a marcadores de resposta a tratamento (20 maiores área abaixo da curva)	74
Tabela 9	Métricas de desempenho da expressão das proteínas HNRNPA0, TXNL1, MYO1B e CDKN2A em classificar os carcinomas de orofaringe de acordo com a resposta à terapia neoadjuvante.....	74
Tabela 10	Proteínas potencialmente secretadas por tumores de orofaringe de acordo com a resposta ao tratamento neoadjuvante utilizando as ferramentas de predição CBS server, Vesiclepedia/ Exocarta e Plasma Proteome.....	78
Tabela 11	Proteínas detectadas exclusivamente nos pacientes com resposta completa (10 casos) ou sem resposta ao tratamento (4 casos).....	79
Tabela 12	Principais vias canônicas associadas com os genes e proteínas diferencialmente expressos	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AUC	Área abaixo da curva
CCECP	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
CCEO	Carcinoma de células escamosas de orofaringe
CNA	<i>Copy number alteration</i>
CRT	<i>Chemoradiotherapy</i>
CTC	Célula tumoral circulante
DP	Doença progressiva
EC	Estadiamento clínico
ESI	Ionização por eletrospray
FC	<i>Fold change</i>
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FFPE	Tecido em bloco de parafina
GO	<i>Gene Ontology</i>
HCSD	<i>Human Cancer Secretome Database</i>
HPV	Papiloma Vírus Humano
HPLC	<i>High-pressure liquid chromatography</i>
IC	Quimioterapia de indução
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrometria de massas
M/Z	Massa/ carga
PET-CT	<i>Positron emission tomography–computed tomography</i>
RC	Resposta completa
RI	Resposta insatisfatória
RP	Resposta parcial

RS	Resposta satisfatória
SEM- MS	Espectrometria de massa - <i>Selected Reaction Monitoring</i>
SVM	<i>Support Vector Machines</i>
SR	Sem resposta ou progressão da doença
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TNM	Tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos e metástases
TPF	Taxano, cisplatina e 5-fluoracil
VCD	Vivo com a doença
VE	Vesículas extracelulares
VSD	Vivo sem a doença

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de cabeça e pescoço	1
1.2	Expressão Gênica em Larga Escala em Cânceres de Cabeça e Pescoço.....	22
1.3	Análise Proteômica por Espectrometria de Massas (MS).....	25
2	OBJETIVOS	32
2.1	Objetivo Geral.....	32
2.2	Objetivos Específicos	32
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.1	Grupos de pacientes e critérios de resposta ao tratamento	35
3.1.1	Critérios de inclusão e exclusão	37
3.1.2	Caracterização do status do HPV.....	38
3.2	Expressão gênica global.....	39
3.3	Análise do perfil proteômico dos tumores.....	40
3.3.1	Preparo das amostras e extração dos peptídeos	40
3.3.2	Quantificação dos peptídeos por Bradford	41
3.3.3	Dessalinização dos peptídeos com Stage Tip – colunas C18	42
3.3.4	Análise proteômica pela técnica de espectrometria de massa	42
3.4	Análise dos dados	43
3.4.1	Características clínicas.....	43
3.4.2	Expressão gênica	43
3.4.3	Expressão proteica.....	44
3.4.4	Comparação entre os grupos e construção de modelo preditor de resposta à quimioterapia de indução.....	44
3.4.5	Aplicação do algoritmo de expressão gênica de predição de resposta utilizando os dados do TCGA	45

3.4.6	Análise in silico de secretoma baseado em dados de transcriptoma e proteômica.....	46
3.4.7	Análise de vias in silico.....	47
4	RESULTADOS.....	48
4.1.1	Análise dos dados clínicos e epidemiológicos.....	50
4.1.2	Status do HPV e resposta à terapia	53
4.2	Análise de expressão global de transcritos	56
4.2.1	Comparação do perfil de expressão de transcritos em câncer de orofaringe de acordo com a resposta ao tratamento neoadjuvante	56
4.2.2	Análise do potencial preditivo dos transcritos diferencialmente Expressos.....	59
4.2.3	Análise da aplicação do algoritmo de predição de resposta ao tratamento usando os dados do TCGA em relação ao prognóstico	62
4.2.4	Análise do secretoma de câncer de orofaringe de acordo com a resposta ao tratamento neoadjuvante	63
4.3	Análise do perfil proteômico dos tumores.....	66
4.3.1	Comparação do perfil proteômico entre os grupos de respondedores e não respondedores à quimioterapia de indução.....	70
4.3.2	Análise do potencial preditivo das proteínas diferencialmente Expressas.....	73
4.3.3	Análise das proteínas potencialmente secretadas em câncer de orofaringe de acordo com a resposta ao tratamento neoadjuvante.....	76
4.3.4	Proteínas presentes em apenas um grupo de pacientes	79
4.4	Análise de vias in silico.....	70
5	DISCUSSÃO	82
6	CONCLUSÕES	106

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 108

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

APÊNDICES

Apêndice 1 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

Apêndice 2 Lista completa dos transcritos diferencialmente expressos entre os tumores de pacientes não respondedores ao tratamento em relação ao grupo respondedor

Apêndice 3 Lista completa das proteínas diferencialmente expressas entre os tumores de pacientes não respondedores ao tratamento em relação ao grupo respondedor

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

Os cânceres de cabeça e pescoço englobam uma variedade de neoplasias epiteliais malignas, sendo que 90% desses tumores originam-se a partir de células epiteliais escamosas. Os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) são mais frequentes na cavidade oral (60%), seguido da laringe (25%) e orofaringe (15%) (FORASTIERE et al. 2001; JEMAL et al. 2006). Entre os carcinomas de orofaringe, os sítios primários mais frequentes são a base de língua (47%) e a amígdala (46%) (FORASTIERE et al. 2001). Segundo estimativas do GLOBOCAN-IARC, ocorrem 705.000 novos casos de CCECP por ano (sétima posição em incidência no mundo) sendo estes tumores responsáveis por 350 mil mortes por ano (BRAY et al. 2018). A incidência global do câncer de orofaringe é aproximadamente 93.000 novos casos por ano, sendo responsável por cerca de 51.000 mortes (BRAY et al. 2018).

Segundo as estimativas do Instituto Nacional de Câncer (INCA) do Brasil, para o biênio 2018/ 2019, foram estimados 11.200 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 3.500 em mulheres. Para o câncer de laringe, foram estimados 6.390 casos novos em homens e 1.280 em mulheres (Ministério da Saúde 2018). Os CCECP têm incidência maior em homens do que em mulheres

(razão de 2:1) (CURADO e HASHIBE 2009). Para o ano de 2018, a Sociedade Americana de Câncer dos Estados Unidos estimou mais de 50 mil novos casos de câncer oral e faringe, e aproximadamente 10 mil mortes associadas (American Cancer Society-ACS 2018). A incidência do carcinoma de células escamosas de orofaringe (CCEO) tem aumentado nas últimas décadas, principalmente em homens entre a quinta e sétima décadas de vida, sendo estimado cerca de 12.000 novos casos por ano nos Estados Unidos (DAHLSTROM et al. 2013; PYTYNIA et al. 2014).

1.1.1 Fatores de risco e de predisposição ao CCECP

Assim como diversas neoplasias epiteliais, o desenvolvimento de CCECP é um processo de múltiplas etapas desencadeado pelo acúmulo de alterações genéticas. Essas alterações podem ser moduladas por predisposição genética e/ou fatores ambientais, mudanças no sistema imunológico, indução de vascularização (incluindo angiogênese) e a disseminação das células tumorais (invasão tumoral local e metástases à distância) (revisado por CHOI e MYERS 2008; PÉREZ-SAYÁNS et al. 2009).

Certas doenças como a anemia de Fanconi (AF) e a disqueratose congênita predisõem ao CCECP (ROSENBERG et al. 2003; SARODE et al. 2016). Estas síndromes hereditárias causam falência da medula óssea e estão associadas com o desenvolvimento precoce do CCECP na ausência dos fatores de risco comuns, como o consumo de tabaco e álcool. Pacientes com AF têm um risco aumentado em 700 vezes de apresentar CCECP quando comparados

com indivíduos da população em geral. A partir dos 20 anos estes pacientes apresentam aumento progressivo no risco de desenvolver tumores sólidos (ROSENBERG et al. 2003; ALTER et al. 2005).

Em um estudo multicêntrico composto por 4005 pacientes com CCP foram avaliados os fatores de risco associados com recorrência e segundo tumor primário (LEONCINI et al. 2018). Durante o seguimento, 1161 (29%) pacientes apresentaram recorrência e 343 (8.6%) desenvolveram segundo tumor primário. Os fatores de predição de recorrência observados foram o estágio tumoral e sexo masculino (apenas para laringe), enquanto os fatores preditivos de segundo tumor primário foram idade avançada e consumo de álcool para pacientes com câncer de laringe, e sexo feminino para câncer de cabeça e pescoço (LEONCINI et al. 2018).

A exposição aos carcinógenos do tabaco combinado com o consumo de álcool são os principais fatores de risco ao desenvolvimento de CCECP em países em desenvolvimento (80-90% dos casos) (HAYES et al. 2015). Pacientes tabagistas e consumidores de álcool apresentam um aumento de 30 vezes no risco de desenvolvimento desse tumor (HASHIBE et al. 2009). A maioria dos CCECP associados ao histórico de alto consumo de tabaco, apresentam mutações em *TP53*, perda de função de *CDKN2A*, amplificação em 3q e alterações em genes envolvidos no estresse oxidativo (incluindo *KEAP1*, *NFE2L2*, *CUL3*) (Cancer Genome Atlas Network 2015). Um estudo desenvolvido no sudeste da Índia, onde ocorre um dos maiores consumos de tabaco, identificou que uma variante no gene *DFNA5* (rs2237306) é um fator protetor

(odds ratio = 0.33) para o desenvolvimento de câncer oral relacionado ao tabaco (KUNDU et al. 2018). Outras quatro variantes, (rs182361, rs290974 e rs169724 em *SYK* e rs1670661 em *NELL1*) foram associadas a suscetibilidade aumentada para a oncogênese oral associada ao tabaco e HPV (KUNDU et al. 2018). O hábito tabagista está associado com um aumento superior a 10 vezes no risco de desenvolvimento de todos os cânceres de cabeça e pescoço e é responsável por 42% das mortes pela doença (LICITRA et al. 2003; Ministério da Saúde 2018). Além disso, experimentos *in vivo* em modelos animais demonstraram que a nicotina presente no sangue aumenta a taxa de metástases linfonodais, induz o acúmulo de p-EGFR no núcleo e a ativação da via de sinalização de AKT, desempenhando um papel importante na resistência a cetuximab (SHIMIZU et al. 2019).

Um estudo originado pelo consórcio do TCGA incluiu 279 carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço analisados por uma estratégia utilizando múltiplas plataformas (Cancer Genome Atlas Network 2015). Um subgrupo de tumores de cavidade oral com resultados clínicos favoráveis apresentou alterações genômicas raras, assim como mutações ativadoras em *HRAS* e *PIK3CA* e inativadoras em *CASP9*, *NOTCH1* e *TP53*. Alterações em genes da via WNT, ativação do fator de estresse *NFE2L2* e perda de função do modificador de cromatina *NSD1* foram mais comumente detectados em tumores de laringe. Uma análise supervisionada de expressão de mRNAs, miRNAs e metilação de DNA também demonstrou um evidente agrupamento das amostras

de acordo com o sítio anatômico (Cancer Genome Atlas Network 2015), revelando a importância da elaboração de estudos focando uma só topologia.

Entre as alterações moleculares descritas em CCECP estão a ativação de oncogenes como *EGFR*, *CCND1* e *COX-2*; outros genes supressores tumorais além do *TP53* e *CDKN2A/p16* também tem sido relatados, como *PSMD9/p27* e *WAF1/C1P1*; além da expressão de fatores angiogênicos e metastáticos e de polimorfismos genéticos em genes codificadores de enzimas que atuam no metabolismo (LEEMANS et al. 2011). Um estudo recente descreveu os genes e os processos celulares mais frequentemente alteradas em CCECP (LEEMANS et al. 2018). Entre elas se destacam principalmente a via do ciclo celular afetando genes previamente descritos, como *CDKN2A*, *TP53* e *CCND1*. As vias de sinalização de crescimento e sobrevivência (*EGFR*, *PIK3CA* e *PTEN*), vias do WNT (*FAT1*, *AJUBA* e *NOTCH1*) e genes envolvidos na regulação epigenético, como *KMT2D* e *NSD1* (LEEMANS et al. 2018).

1.1.2 HPV e o câncer de orofaringe

Nas últimas décadas, a infecção pelo HPV (papiloma vírus humano) de alto risco (ou oncogênico) tem se tornado um importante fator etiológico associado aos tumores de cabeça e pescoço, especialmente em tumores da cavidade oral e orofaringe (MARTIN et al. 2014; HAYES et al. 2015). A incidência de tumores de orofaringe HPV+ aumentou em 225% de 1988 a 2004, principalmente em pacientes do Norte da Europa, América do Norte e Austrália (DAHLSTROM et al. 2013; SEPIASHVILI et al. 2015). Em 2012 foi estimado que

mais 30% dos tumores de orofaringe eram causados pelo HPV, dando evidências que esse aumento é resultado das mudanças no comportamento sexual da população (CASTELLSAGUÉ et al. 2016). Por outro lado, os tumores HPV negativos diminuíram em 50%, essa redução da incidência pode estar principalmente associada a mudanças nos hábitos de vida, especialmente a diminuição do tabagismo na população (CHATURVEDI et al. 2011; DAHLSTROM et al. 2013; SEPIASHVILI et al. 2015).

Estudos que avaliaram a presença do HPV em tumores de cabeça e pescoço são concordantes para o fato de que os tumores infectados pelo vírus são mais frequentes em pacientes jovens com linfonodos positivos (HAYES et al. 2015). Em torno de 60-87% dos CCEO são HPV positivos, enquanto tumores de cabeça e pescoço de outras topologias tem uma prevalência de apenas 6% (Cancer Genome Atlas Network 2015; LUCAS-ROXBURGH et al. 2017).

Atualmente, é amplamente estabelecido em literatura que os CCEO podem ser divididos em duas entidades clínico-patológicas distintas, classificadas de acordo com o status de HPV (LEEMANS et al. 2018). A apresentação clínica, perfil molecular e principalmente o prognóstico do tumor diferem entre estes dois subgrupos (LEEMANS et al. 2018). A presença do vírus nesses tumores é um fator prognóstico independente e os casos positivos estão principalmente associados com fatores de risco relacionados ao comportamento sexual (DAHLSTRAND et al. 2008; VIDAL e GILLISON 2008). A sobrevida dos pacientes com CCECP HPV+ é notavelmente maior do que a de pacientes com tumores HPV negativos, com uma sobrevida em três anos de 84% vs. 57%,

respectivamente (ANG et al. 2010). A diferença no prognóstico desses dois subtipos tumorais é muito distinta, de tal modo que a oitava edição de estadiamento TNM para tumores de orofaringe inclui a avaliação da expressão da proteína p16 por imuno-histoquímica para a classificação tumoral (BRIERLEY et al. 2017). Além disso, foram relatados diversos estudos clínicos visando o uso de estratégias menos agressivas no tratamento dos CCEO HPV positivos. Entretanto, os resultados de controle de doença locoregional e à distância a médio e longo prazo ainda não foram relatados em literatura. Esses achados certamente contribuiriam para a maior precisão no tratamento dos pacientes de acordo com o status do HPV (LEEMANS et al. 2018).

A maioria dos carcinomas de orofaringe apresenta o genótipo HPV-16 (86-95%), o segundo tipo mais frequente é HPV-18, sendo os subtipos oncogênicos de maior impacto na doença (KREIMER et al. 2005). A molécula viral frequentemente se integra ao DNA da célula hospedeira levando ao aumento de expressão das proteínas virais E6 e E7 (ZUR HAUSEN 2002). Essas proteínas são frequentemente expressas em tumores positivos, e perturbam diversos mecanismos celulares regulatórios predominantemente anti-proliferativos, como os que envolvem as proteínas p53 e pRb (MCLAUGHLIN-DRUBIN e MUNGER 2009). A proteína p53 é inativada apenas em nível proteico pela E6 na ausência mutações no gene *TP53*, enquanto os tumores HPV negativos frequentemente possuem mutações neste gene. A proteína E7 promove a inativação da proteína pRb e apesar de continuar expressando p16, a

sua atividade supressora de tumor é perdida por ser mediada pela pRb (LOWY e MUNGER 2010).

O estudo do TCGA revelou alterações específicas dos tumores de acordo com o status de infecção do HPV e sítio anatômico. Tumores positivos para infecção por HPV apresentaram mais frequentemente mutações em *PIK3CA*, ampliações em *EI2F1* e perda genômica de *TRAF3*, enquanto tumores HPV negativos apresentaram mutação em *TP53*, perda de *CDKN2A* e 3q26-28 e amplificação de 11q13-q22 (Cancer Genome Atlas Network 2015).

Recentemente, LEEMANS et al. (2018) descreveram diversos genes e vias alteradas associadas ao status do HPV. Os autores destacam alterações nos genes da via de sinalização do PI3K como os mais frequentemente alterados, semelhante ao descrito em outros tumores relacionados ao HPV (BADER et al. 2005; LEEMANS et al. 2018). Relatos prévios em literatura demonstraram que os carcinomas de orofaringe HPV+ apresentam perfis de expressão mais heterogêneos (KECK et al. 2015).

Análises de clusterização dos dados do perfil de expressão (RNAseq) revelaram a classificação dos tumores de cabeça e pescoço HPV+ em dois subgrupos (ZHANG et al. 2016; LEEMANS et al. 2018). Um subgrupo estava associado às vias mesenquimal e de resposta imune (denominado HPV-IMU) e o outro incluía genes das vias de diferenciação de queratinócitos e estresse oxidativo (denominado HPV-KRT) (ZHANG et al. 2016; LEEMANS et al. 2018). O grupo HPV-KRT apresentou maior frequência de integração do HPV e maior taxa de transcritos E6, assim como um enriquecimento de CNA em 3q e

mutações de PIK3CA. Enquanto o grupo HPV-IMU apresentou enriquecimento de perdas no cromossomo 16q (ZHANG et al. 2016). Porém este estudo não foi capaz de identificar diferença na sobrevida entre esses dois subgrupos, principalmente devido ao tempo de seguimento limitado e o pequeno número de amostras (ZHANG et al. 2016; LEEMANS et al. 2018).

1.1.3 Métodos diagnósticos para o câncer de orofaringe

A maioria dos pacientes com CCEO apresenta tumor em estágio avançado ao diagnóstico, sendo que 43% apresentam metástase em linfonodos regionais e 10% metástase à distância (KASKAS et al. 2014). A detecção precoce aumenta notavelmente a taxa de sobrevida comparado a detecção em estágios avançados, sendo importante para um prognóstico favorável (LAMPRI et al. 2015).

A detecção precoce da doença é frequentemente prejudicada pela natureza assintomática desses tumores e métodos inadequados de diagnóstico com sensibilidade limitada. Os sintomas de tumores de orofaringe podem variar de acordo com sua localização anatômica, podendo estar localizados na amígdala, base da língua, palato mole, úvula ou parede faríngea posterior (CHOI et al. 2009). Os principais sintomas dessas lesões são dor, sangramento, disfagia, perda de peso e percepção de massa no pescoço, a qual ocorre, na maioria dos casos, nos estágios avançados da doença (CHOI et al. 2009).

Aproximadamente 75% dos pacientes com lesões localizadas na fossa amigdaliana são diagnosticados com estágio III ou IV. As metástases linfonodais

são detectadas ao diagnóstico em mais de 70% dos pacientes com lesões de base de língua, devido à grande drenagem linfática na região (CHOI et al. 2009; MENDENHALL et al. 2011). Além disso, a ausência de fibras de dor na base da língua faz com que esses tumores sejam frequentemente assintomáticos até apresentarem significativa progressão tumoral, com infiltração do músculo profundo causando fixação da língua (CHOI et al. 2009).

A avaliação inicial do tumor primário de orofaringe é realizada por inspeção e palpação, quando possível. As áreas de drenagem linfáticas devem ser avaliadas cuidadosamente por palpação. A presença tumoral deve ser confirmada por biópsia, com a qual é avaliada a presença de HPV. Além da confirmação histopatológica, são indicados exames de imagem também, sendo os mais comuns a ressonância magnética, tomografia computadorizada e PET-CT (do inglês, *positron emission tomography-computed tomography*) (TAHARI et al. 2014). O teste PET-CT permite avaliar a morfologia e a atividade metabólica do tumor primário, da metástase linfonodal ou à distância, as quais auxiliam no planejamento terapêutico (TAHARI et al. 2014). Dados retrospectivos de PET-CT demonstraram que tumores primários HPV negativos geralmente apresentam maior captação glicólica, maior média de SUV (do inglês, *standardized uptake value*) maior volume metabólico tumoral comparado a tumores HPV positivos. Enquanto a doença no linfonodo regional de tumores HPV positivos apresentam maiores valores de PET-CT (TAHARI et al. 2014).

Apesar dos avanços nos exames de imagem e métodos de diagnóstico, a detecção precoce desses tumores ainda é observada em uma pequena parcela

dos pacientes. Desta forma, é clara a necessidade de estabelecer marcadores moleculares com maior sensibilidade para auxiliar no diagnóstico precoce, e possivelmente permitir o delineamento de estratégias de tratamento da lesão pré-maligna de modo a evitar a progressão tumoral (DEY et al. 2015; LAMPRI et al. 2015).

1.1.4 Prognóstico e Estadiamento do câncer de orofaringe

Os principais fatores prognósticos para o carcinoma de orofaringe incluem status do HPV, hábito tabagista e o estadiamento clínico ao diagnóstico (ANG et al. 2010). Na Tabela 1 estão descritos os critérios utilizados para a classificação do grau de risco (baixo, intermediário ou alto risco) dos pacientes.

Tabela 1 - Características associadas ao grau de risco do câncer de orofaringe.

Grau de risco	Características	Sobrevida global em 3 anos
Baixo	HPV+, histórico de tabagismo de <10 maços/ano, N0-N2a	93%
Intermediário	HPV+, histórico de tabagismo de >10 maços/ano, N2b-N3; ou	70 a 80%
	HPV-, histórico de tabagismo de <10 maços/ano, N0-N2a ou T2-T3	
Alto	HPV- e histórico de tabagismo de <10 maços/ano, ou	46 a 20%
	HPV- e histórico de tabagismo de >10 maços/ano e T4	

Fonte: Adaptado de ANG et al. (2010).

A determinação do status do HPV nesses tumores têm se demonstrado cada vez mais importante para a avaliação clínica inicial, sendo considerado um fator prognóstico independente. Em decorrência dessas evidências, a oitava edição de Classificação de Tumores Malignos – TNM (BRIERLEY et al. 2017), incluiu parâmetros distintos para classificar o CCEO HPV positivo e negativo.

A sobrevida global em 5 anos para pacientes com CCEO é de 50% e nos casos com metástase a distância é de 30% (BASTOS DE SOUZA et al. 2014; MARTIN et al. 2014). A detecção precoce aumenta notavelmente a taxa de sobrevida comparada à detecção em estágios avançados, sendo importante para um prognóstico favorável (LAMPRI et al. 2015). Em um estudo com 981 pacientes com CCEO, 94% deles apresentavam tumor em estágio avançado (III – IVB) ao diagnóstico, sendo que 89% apresentavam metástase em linfonodos regionais (GUNN et al. 2013).

Além da alta frequência de metástases linfonodais, outro fator que leva a redução da sobrevida é a alta frequência de recorrência local, a qual pode acometer até 30% dos pacientes, mesmo quando as margens cirúrgicas são patologicamente livres de tumor (BASTOS DE SOUZA et al. 2014). Os protocolos atuais não são capazes de estratificar adequadamente os pacientes com alto risco de desenvolver recorrência tumoral, de modo a permitir as modificações adequadas no tratamento (SEPIASHVILI et al. 2012; LAMPRI et al. 2015).

Pacientes com CCECP possuem um alto risco de desenvolvimento de segundo tumores primários sincrônicos ou metacrônicos. A incidência de

múltiplos tumores primários para esses pacientes pode chegar a 27%. Os sítios mais frequentes de ocorrência de segundo tumor primário são o trato aerodigestivo superior (40%-59%), pulmão (31%-37.5%) e esôfago (9%-44%) (PRIANTE et al. 2011). Pacientes que desenvolvem um segundo tumor primário possuem uma redução significativa na sobrevida. Pacientes com carcinomas de orofaringe possuem uma taxa significativamente menor de desenvolvimento de segundos tumores primários comparado com outros sítios da cabeça e pescoço, como cavidade oral, laringe e hipofaringe (GAN et al. 2013).

O seguimento clínico dos pacientes com câncer de orofaringe deve ser realizado com cautela para a detecção de recorrência. É necessário realizar exames clínicos e de imagem a cada 6 a 12 semanas no primeiro ano pós-tratamento, a cada 3 meses no segundo ano, a cada 3 a 4 meses no terceiro ano e posteriormente, a cada 6 meses (National Cancer Institute-NCI 2018).

1.1.5 Tratamento do câncer de orofaringe

Um dos primeiros *clinical trials* específicos para câncer de orofaringe foi desenvolvido pelo grupo GORTEC em 1999. Nesse estudo foram randomizados 266 pacientes tratados com quimio-radioterapia (CRT, do inglês *chemoradiotherapy*) ou radioterapia isolada (CALAIS et al. 1999). Foi observada uma sobrevida global em 3 anos de 51% para os pacientes tratados com CRT contra 31% para radioterapia isolada (CALAIS et al. 1999). Posteriormente foi descrito um benefício de 6,6% na sobrevida global em 5 anos com adição da quimioterapia, tornando assim o tratamento com CRT padrão para os

carcinomas de orofaringe com doença locorregional avançada (PIGNON et al. 2000; DENIS et al. 2004).

As mudanças nas estratégias de tratamento de 43.983 pacientes com tumores de orofaringe entre 1998 e 2009 foram avaliadas utilizando dados governamentais Norte Americanos sobre o tratamento do câncer (National Cancer Database, NCDB) (CHEN et al. 2014). O número de pacientes que receberam quimio-radioterapia subiu de 22% em 1998 para 61% em 2009, enquanto os que foram submetidos a cirurgia reduziu de 41% para 31% no mesmo período (CHEN et al. 2014).

A maioria dos pacientes com CCECP apresenta doença locorregional avançada no momento do diagnóstico. Neste estágio, 40-60% dos pacientes apresentam recidiva com uma sobrevida de 30-50% em três anos quando tratados com cirurgia e radioterapia (POSNER et al. 2004). As terapias multidisciplinares envolvendo quimioterapia e radioterapia (CRT, do inglês *chemoradiotherapy*) apresentam aumento na sobrevida comparado a radioterapia isolada (HADDAD e SHIN 2008). Apesar do uso de CRT estar associado a aumento na sobrevida desses pacientes, em geral, esse aumento está associado ao melhor controle local da doença, porém apresenta pouco impacto nas metástases à distância (HADDAD e SHIN 2008). Com o aperfeiçoamento do controle local utilizando CRT, as metástases à distância se tornaram um importante fator nas falhas no tratamento. Este fato demonstra a importância de quimioterapias sistêmicas para melhora do controle da doença à distância (HADDAD e SHIN 2008; KIM et al. 2016).

O uso de quimioterápicos sistêmicos neoadjuvantes ao tratamento definitivo com CRT, chamado de quimioterapia de indução (IC), têm se tornado cada vez mais atrativo, especialmente em pacientes com tumores localmente avançados, não ressecáveis ou com presença de metástases. O uso de IC levou a redução na incidência de metástases à distância. Além disso, a terapia de indução baseada em cisplatina revelou uma taxa de resposta de 80 a 90% e em pacientes com tumores avançados de cabeça e pescoço, a taxa de resposta completa foi de 20-40% (BROCKSTEIN et al. 2004; ARGIRIS 2005).

Uma meta-análise envolvendo 1.280 pacientes com CCECP localmente avançado, avaliou o impacto do tratamento com quimioterapia de indução seguido de CRT comparado com esquemas de CRT (KIM et al. 2016). Os autores verificaram que não houve alteração na sobrevida global entre os grupos. Porém, a sobrevida livre de progressão e taxas de resposta completa foram significativamente superiores no primeiro grupo (IC seguido de CRT) comparado ao segundo (KIM et al. 2016). Diversos estudos clínicos demonstraram que a quimioterapia de indução utilizando o regime de docetaxel, cisplatina e 5-fluoracil (TPF) está associada com taxas de resposta e sobrevida significativamente superiores comparado aos regimes empregando apenas cisplatina e 5-fluoracil, tornando assim o uso de TPF o padrão na quimioterapia de indução (HITT et al. 2005; POSNER et al. 2007).

Apesar da maioria dos pacientes apresentar boa resposta a IC, podendo haver até remissão completa do tumor, 10-30% deles não se beneficiam deste tratamento, sendo expostos a agentes causadores de alta toxicidade e

morbidades de maneira desnecessária (ARGIRIS 2005). Uma maneira de evitar o emprego de tratamentos que não serão benéficos ao paciente é por meio do uso de marcadores preditivos.

O novo sistema de estadiamento de tumores de orofaringe (UICC/AJCC - TNM System Complete) utiliza o status do HPV para classificação dos tumores propondo estratégias de tratamento menos agressivas nos casos de tumores HPV positivos (BRIERLEY et al. 2017). Entretanto, deve haver cautela em minimizar a toxicidade tardia sem comprometer as taxas de resposta ao tratamento (SINDHU e BAUMAN 2018). Por exemplo, a política da União Europeia é de não utilizar a oitava edição do TNM para auxiliar na definição do tratamento, uma vez que essa mudança na conduta clínica deve ser realizada apenas no contexto apropriado de estudos clínicos controlados (HAY e NIXON 2018).

1.1.6 Biomarcadores de predição de resposta a terapias neoadjuvantes em câncer de cabeça e pescoço

A maioria dos estudos buscando marcadores de resposta a terapia em câncer de cabeça e pescoço tem focado no tratamento com quimioterapia concomitante a radioterapia, sendo o regime mais frequentemente aplicado (revisado por COSWAY et al. 2015). Embora alguns estudos tenham investigado marcadores de resposta a quimioterapia de indução, para o nosso conhecimento, estes marcadores ainda não foram amplamente validados (HASEGAWA et al. 2018; revisado por SPECTOR et al. 2018)

A correlação entre a expressão do Ki-67 em tumores de cabeça e pescoço tratados com quimioterapia de indução foi avaliada a fim de verificar seu potencial de predição de resposta ao tratamento (CHATZKEL et al. 2017). Amostras tumorais de 59 pacientes antes e após dois ciclos de TPF +/- cetuximab não revelaram associação entre a expressão de Ki-67 e resposta do tumor a IC ou taxa de recidiva (CHATZKEL et al. 2017).

Diversos estudos já investigaram a associação entre a presença do HPV e resposta a quimioterapia de indução (LORCH et al. 2011; SAITO et al. 2016; PSYRRI et al. 2017; LEE et al. 2018). SAITO et al. (2016) avaliaram a resposta a IC de 23 pacientes com tumores de orofaringe HPV positivos estágio III ou IV. Foi observado resposta parcial ou completa em aproximadamente 90% dos pacientes. O controle local e a distância foi obtido quando realizado tratamento definitivo com radioterapia ou cirurgia demonstrando que tumores HPV+ possuem bom prognóstico (SAITO et al. 2016). Apesar de ser amplamente estabelecido em literatura que os tumores HPV positivos apresentam melhor prognóstico, essa associação é descrita independente do tratamento, não sendo um marcador específico de resposta a IC (BARROS-FILHO et al. 2018; LEEMANS et al. 2018; HAY e NIXON 2018). Além da infecção pelo HPV, perdas no número de cópias do gene *CDKN2A*, que codifica a proteína p16, também foi descrito como um fator independente de predição de pior sobrevida em CP (CHEN et al. 2018).

O supressor tumoral TP53 é um dos biomarcadores mais estudados em cabeça e pescoço, com resultados iniciais promissores (CABELGUENNE et al.

2000; TEMAM et al. 2000). Entretanto, um *clinical trial* randomizado em pacientes com carcinoma oral tratados com quimioterapia de indução, não revelou resultados sólidos quanto as mutações no gene *TP53* (PERRONE et al. 2010). Apesar dos autores encontrarem uma associação entre *TP53* wild type (wdTP53) com maiores taxas de remissão completa do tumor, também foi observada uma associação entre a proteína p53 funcional com melhor resposta em tratamentos primários com cirurgia (PERRONE et al. 2010). Estes dados sugeriram que o status de *TP53* não está associado especificamente a quimioterapia (PERRONE et al. 2010). Alguns estudos avaliando IC em carcinoma de laringe e orofaringe, observaram que apesar de mutações em *TP53* não possuem valor prognóstico independente, quando avaliado em conjunto com a expressão de *BCL-XL*, sugerem que a diminuição de expressão desses marcadores está associada a um padrão de alto risco, com diminuição da sobrevida global e doença específica (KUMAR et al. 2008a, b).

Um estudo retrospectivo avaliou 224 pacientes submetidos a IC (ou outro tratamento neoadjuvante incluindo cisplatina) seguida de radioterapia, ou submetidos a cirurgia seguida de radioterapia (FENG et al. 2011). Os autores observaram que a diminuição da expressão do gene *CCND1* foi um fator de predição de resposta a quimioterapia, incluindo resposta completa e parcial (diminuição >30% do tumor). A diminuição de expressão desse marcador também foi associada a melhor sobrevida no grupo submetido a tratamento neoadjuvante. Em adição, os pacientes que apresentaram aumento de expressão de *CCND1* estavam associados a melhor sobrevida no grupo de

pacientes submetidos a cirurgia (FENG et al. 2011). Esses achados indicam que tumores de cabeça e pescoço com baixa expressão de *CCND1* podem se beneficiar com quimioterapia neoadjuvante, enquanto tumores com alta expressão teriam maior benefício com a cirurgia. Apesar do papel da ciclina D1 ter sido observado em outros estudos menores, uma análise multivariável com diversos marcadores, incluindo ciclina D1, não demonstrou nenhuma associação com prognóstico ou predição de acordo com o status de expressão de *CCND1* em carcinoma oral e orofaringe (AKERVALL et al. 2001; ISHIGURO et al. 2003; PERISANIDIS et al. 2012).

CULLEN et al. (2009) avaliaram o potencial de biomarcadores em 265 biópsias de pacientes recrutados para o estudo de fase III TAX 324, o qual comparou o tratamento com docetaxel, cisplatina e fluorouracil contra cisplatina e fluorouracil, seguidos de quimiorradioterapia, em pacientes com tumores avançados de cabeça e pescoço. Os autores observaram que pacientes com baixa expressão de betaT-II apresentaram maior sobrevida global (58.6 meses) quando comparados com aqueles que apresentaram aumento de expressão (18.2 meses). A sobrevida livre de progressão também foi maior em pacientes com menor expressão de betaT-II (43.2 x 9.8 meses). O valor preditivo de beta tubulina foi maior no grupo tratado com TPF comparado ao grupo com cisplatina e 5-fluorouracil. A associação entre essa proteína com a sensibilidade ao taxano revela seu potencial como marcador para identificar os pacientes que podem se beneficiar da quimioterapia baseada em taxano (CULLEN et al. 2009).

Alguns estudos descreveram associação entre a via de sinalização da glutathione e sensibilidade a agentes quimioterápicos baseados em platina em cabeça e pescoço (NISHIMURA et al. 1996; CABELGUENNE et al. 2000). Um estudo antigo descreveu uma correlação entre a diminuição de expressão da proteína *glutathione S-transferase* (GST) com melhor resposta a quimioterapia (NISHIMURA et al. 1996). A taxa de resposta de pacientes com diminuição de expressão de GST foi 88% (21 of 24), contra 19% (6 of 32; $P = 0.001$) nos pacientes com aumento de expressão (NISHIMURA et al. 1996). Essa associação foi reproduzida em outros estudos, porém também foram relatados resultados conflitantes, sem associação com resposta a quimioterapia (SHIGA et al. 1999; COSWAY et al. 2015; HASEGAWA et al. 2018).

Recentemente, TANG et al. (2018) descreveram uma associação entre a expressão proteica GDF15 e benefícios do tratamento de indução em pacientes com câncer oral. A expressão dessa proteína foi avaliada por imunohistoquímica em biópsias de 230 pacientes com tumores estágio III e IV. Foi possível observar que pacientes com menor expressão proteica de GDF15 apresentaram maior taxa de sobrevida global (73.4 vs. 57.7%; $P=0,059$), sobrevida livre de doença (64.5 vs. 49.2%; $P=0,033$), recorrência (66.0 vs. 51.5%; $P=0,043$) e metástases à distância (73.4 vs. 56.6%; $P=0,038$) em 5 anos (TANG et al. 2018). Além disso, os autores demonstraram que pacientes com aumento de expressão de GDF15 apresentaram benefício significativo com o uso de TPF na quimioterapia de indução. Esses resultados sugerem que a expressão elevada de GDF15 pode ser utilizada como marcador de pior

prognóstico em pacientes com tumores de cavidade oral localmente avançados (TANG et al. 2018).

Além da investigação de marcadores no tecido tumoral, YAMASHITA et al. (2016) avaliaram as concentrações de *midkine* no soro de 103 pacientes com câncer de cabeça e pescoço pelo ensaio de *enzyme-linked immunosorbent* afim de avaliar seu potencial como biomarcador. Os autores relataram associação dos níveis séricos de *midkine* com o potencial maligno, prognóstico e resposta a quimioterapia. As taxas de sensibilidade, especificidade e acurácia para predição de resposta a quimioterapia de indução foram de 57.3, 85.3 e 72.1%, respectivamente. Esses resultados sugerem que o *midkine* é um importante biomarcador sérico, minimamente invasivo, útil para detecção precoce, decisão terapêutica e prognóstico (YAMASHITA et al. 2016). Porém até o momento esse marcador não foi validado em uma coorte maior de pacientes com tumores de cabeça e pescoço. Outra abordagem que demonstrou potencial clínico no monitoramento por biopsia líquida de resposta ao tratamento de pacientes com CCECP é a determinação da expressão do gene *PD-L1* em células tumorais circulantes (CTC) (STRATI et al. 2017). STRATI et al. (2017) demonstraram que o aumento de expressão desse gene em CTCs de pacientes ao fim do tratamento está associada a menor sobrevida global e livre de progressão ($P < 0,001$), sendo um fator prognóstico independente após análise multivariada.

1.2 EXPRESSÃO GÊNICA EM LARGA ESCALA EM CÂNCERES DE CABEÇA E PESCOÇO

Diversos estudos investigaram o perfil transcritômico de tumores de cabeça e pescoço visando identificar marcadores de resposta a terapias úteis na prática clínica. Apesar de grande parte dos estudos relatarem marcadores estatisticamente significativos, até o momento nenhum deles foi amplamente validado em coortes independentes e inseridos na rotina clínica.

THIBODEAU et al. (2015) desenvolveram um interessante estudo visando identificar por meio do perfil de expressão gênica marcadores de pior prognóstico em pacientes com CCECP HPV positivos. Apesar do câncer de cabeça e pescoço HPV+ estar associado a melhor prognóstico, há um pequeno grupo de pacientes que não respondem ao tratamento. Desta maneira, os autores avaliaram o transcriptoma de 19 CCECP HPV+ tratados com quimio e radioterapia. Foi possível verificar que os genes diferencialmente expressos entre respondedores e não respondedores estavam associados com estabilidade genômica, ciclo celular e danos ao DNA. Além disso, também foram identificados potencial biomarcadores de resposta, incluindo *LCE3D*, *KRTDAP*, *HMOX1*, *KRT19*, *MDK* e *TSPAN1* (THIBODEAU et al. 2015). Apesar dos resultados terem sido validados com dados públicos, este foi um estudo piloto realizado em uma coorte limitada de pacientes.

O perfil de expressão genica gênica de sete pacientes com câncer de laringe respondedores a quimioterapia de indução (TPF) foi comparado com

quatro pacientes não respondedores utilizando microarray de expressão (LIAN et al. 2017a). Foram identificados 1546 genes diferencialmente expressos, sendo 769 com aumento de expressão nos tumores respondedores e 777 com diminuição de expressão. Análises *in silico* sugerem que esses genes estão envolvidos nos processos de diferenciação celular, metabolismo, transdução e organização celular. Além disso, as vias de sinalização de Wnt e p53 também se encontravam alteradas, sugerindo seu papel na sensibilidade a quimioterapia com TPF (LIAN et al. 2017a).

A correlação entre o perfil de expressão de 21 genes e a resposta a quimioterapia de indução com 5-fluorouracil e cisplatina foi investigada em 64 pacientes com tumores de cabeça e pescoço (HASEGAWA et al. 2018). Foi observada uma correlação significativa entre a resposta a terapia e a expressão dos genes *DPD*, *ERCC1*, *XPA*, *TP53*, *BCL2*, *VEGF* e *MDR1*. Uma análise multivariada identificou o *ERCC1* como marcador significativo de predição de resposta, indicando que as vias de reparo do DNA e apoptose podem ser importantes mecanismos envolvidos na resposta a quimioterapia (HASEGAWA et al. 2018).

Um estudo visando identificar potenciais *drivers* moleculares associados a prognóstico e resposta a terapia avaliou o perfil de expressão gênica e alterações em números de cópias de 33 pacientes com tumores de orofaringe avançados (BARROS-FILHO et al. 2018). Os autores identificaram alterações genômicas recorrentes, como perdas em 8p11.23-p11.22, 14q11.1-q11.2 e 15q11, e ganhos em 11q13.2 e 11q13.2-q13.3. Algumas alterações estavam

presentes exclusivamente nos tumores HPV negativos (ganhos em 3q26.31 e 11q13.2, perdas em 9p21.3). O perfil de expressão gênica revelou um agrupamento dos tumores de acordo com o status do HPV. Análises multivariadas demonstraram que o aumento de expressão de *PPFIA1* e status do HPV são fatores prognósticos independentes. O aumento de expressão dos genes *ORAOV1*, *CPT1A*, *SHANK2* e *PPFIA1* foi associado a pior sobrevida, e *SHANK2* foi significativamente associado a resposta parcial ao tratamento. A análise integrada dos dados revelou potenciais genes *drivers* mapeados em 11q13 associados a pior prognóstico e resposta a tratamento (BARROS-FILHO et al. 2018).

As análises de transcriptoma podem ser utilizadas para identificar marcadores em uma grande variedade de cânceres, no entanto, um conjunto de genes diferencialmente expressos não fornece informações suficientes para prever quais proteínas possuem maior chance de serem detectadas na circulação (VATHIPADIEKAL et al. 2015). Desta maneira, uma estratégia que tem se mostrado promissora na identificação de marcadores presentes nos biofluidos é a análise do secretoma, o qual consiste basicamente no conjunto de macromoléculas (secretadas pelas células) presentes na matriz extracelular (VATHIPADIEKAL et al. 2015). Esse conjunto de proteínas secretadas representa aproximadamente 10-15% das proteínas codificadas e estão envolvidas em importantes processos biológicos, como defesa imune, remodelamento da matriz e sinalização celular (KARAGIANNIS et al. 2010). Essas proteínas podem ser liberadas na matriz extracelular por meio de dois

mecanismos: pela via secretória clássica (os peptídeos são sintetizadas como proteínas precursoras contendo um sinal na porção N-terminal) ou por vias secretórias não clássicas. Neste último caso, as proteínas podem ser exportadas passando diretamente pela membrana plasmática, pela secreção de exossomos ou com o auxílio de endossomos (NICKEL 2003).

O secretoma tumoral é constituído por proteínas secretadas pelas células estromais associadas ao tumor e proteínas secretadas pelas próprias células tumorais. Os fatores secretados são propensos a entrar na circulação sanguínea, tornando esse grupo de proteínas uma fonte promissora de biomarcadores séricos (LIN et al. 2013). Neste sentido, BOLT et al (2017) compararam o perfil de secretoma de linhagens celulares de carcinoma de orofaringe HPV negativo e positivos e sua interação com o microambiente tumoral. Os autores demonstraram que as células tumorais HPV negativas eram capazes de induzir rapidamente os fibroblastos estromais a suportar a migração e invasão tumoral. A caracterização do perfil de secretoma dos fibroblastos permitiu a identificação do HGF (*hepatocyte growth factor*) como o principal fator secretado que promove a migração e invasão tumoral (BOLT et al. 2017).

1.3 ANÁLISE PROTEÔMICA POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS)

Análises descritivas do perfil proteômico celular foram inicialmente limitadas a detecção das proteínas (500 – 1000) mais abundantes utilizando

metodologias como gel de eletroforese bidimensional. Atualmente, devido aos avanços nas tecnologias de alto desempenho, como a espectrometria de massas, é possível avaliar milhares de proteínas em pequenas amostras de tecido (AEBERSOLD e MANN 2003). Essa tecnologia é capaz de identificar e quantificar com acurácia proteínas expressas, novas proteínas alvo, biomarcadores úteis na prática clínica e no diagnóstico de várias doenças. Análises proteicas também contribuem para aumentar o conhecimento sobre a composição, função e controle de moléculas envolvidas nos complexos processos biológicos e fenótipos (PANDEY e MANN 2000; AEBERSOLD e MANN 2016).

O espectrômetro de massas consiste basicamente de uma fonte de íons, um analisador de massas que calcula a razão massa/ carga (m/z) e um detector que registra o número de íons para cada valor m/z . As medições são realizadas na fase gasosa dos analitos ionizados. Nas análises por espectrometria de massas, as técnicas mais comumente utilizadas para volatilizar e ionizar as proteínas ou peptídeos são ionização por eletrospray (ESI) e MALDI (do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization*) (FENN et al. 1989).

A análise proteômica consiste basicamente de cinco etapas, primeiramente, as proteínas são isoladas do tecido. Posteriormente são degradadas enzimaticamente em peptídeos, normalmente utilizando tripsina, o que resulta em peptídeos com a porção C-terminal dos aminoácidos protonada. Na terceira etapa, os peptídeos são separados por uma ou mais etapas de cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC, do inglês, *high-pressure liquid*

chromatography) em capilares finos, seguido por nebulização em pequenas gotas por uma fonte iônica de eletropulverização. Após a evaporação, múltiplos peptídeos protonados entram no espectrômetro de massas e um espectro da massa dos peptídeos é captado e dividido em tempos seriados. Em seguida, determinados peptídeos são fragmentados por colisão energética com gás e seguido por uma série de espectrometria de massa para obter a sequência de cada peptídeo (MS/MS). O espectro de cada peptídeo é comparado com um banco de dados de sequências de proteínas para a sua posterior identificação (AEBERSOLD e MANN 2003).

As análises proteômicas têm recebido cada vez mais atenção, como um método capaz de detectar alterações no padrão de expressão proteica em doenças. Em especial, a metodologia de espectrometria de massas tem sido cada vez mais utilizada para identificar biomarcadores oncológicos, incluindo para pacientes com CCECP (KAWAHARA et al. 2016; CARNIELLI et al. 2018).

1.3.1 Espectrometria de massas e o Câncer de Cabeça e Pescoço

Alguns estudos avaliaram o perfil proteômico de carcinomas de orofaringe; porém, a maioria deles teve como foco identificar as diferenças na patogênese molecular entre os tumores HPV positivos e negativos (DESCAMPS et al. 2014; SEPIASHVILI et al. 2014). SLEBOS et al. (2013) avaliaram 20 tumores de orofaringe, sendo 10 HPV+ e 10 HPV-, e 10 epitélios orais normais, por LC-MS/MS. As proteínas diferencialmente expressas entre os grupos revelaram um enriquecimento de proteínas envolvidas no desenvolvimento de

células epiteliais, queratinização e organização da matriz extracelular em tumores HPV negativos. Os tumores HPV positivos apresentaram enriquecimento de proteínas envolvidas na duplicação do DNA, replicação e controle do ciclo celular, assim como fatores de transcrição E2F1 e E2F4. Os tumores HPV+ apresentaram aumento de expressão de ASS1 sugerindo uma maior dependência de aminoácidos essenciais e arginina. Os autores demonstraram distintos perfis proteômicos entre os tumores HPV positivos e negativos que podem auxiliar em estratégias terapêuticas e serem utilizados como ferramentas prognósticas (SLEBOS et al. 2013).

SEPIASHVILI et al. (2014) investigaram o perfil proteômico de tumores de orofaringe, sendo 27 HPV positivos e 26 HPV negativos. Os autores identificaram 174 proteínas diferencialmente expressas entre os grupos HPV-/+, as quais estavam principalmente relacionadas com ciclo celular, replicação do DNA, apoptose e resposta imune. Os autores realizaram uma análise integrada *in silico* utilizando dados do TCGA, nos quais eles integraram dados de expressão proteica, mutações, alterações no número de cópias genômicas, metilação e perfil transcriptômico. Um dos principais achados da análise integrada foi a identificação de níveis elevados da oncoproteína cortactina (CNNT) nos tumores HPV-. Esses achados sugeriram que a desregulação das vias associadas a CNNT poderia contribuir para redução da sobrevida desses pacientes (SEPIASHVILI et al. 2014).

Foi também descrita a investigação de biomarcadores em fluidos corporais utilizando a metodologia de espectrometria de massas (GOURIN et al.

2006; HU et al. 2007). GOURIN et al. (2006) avaliaram o perfil proteômico de amostras de sangue periférico de 78 pacientes com CCECP e 68 controles saudáveis utilizando um *array* de proteínas (SELDI-TOF-MS). Pacientes com CCECP apresentaram um perfil distinto de picos de proteínas com alto grau de sensibilidade e especificidade quando comparados aos controles. Esse estudo permitiu diferenciar os tumores derivados dos diferentes sítios primários (cavidade oral, orofaringe e laringe) (GOURIN et al. 2006). Em 2015, WU et al. avaliaram o perfil proteômico da saliva de indivíduos saudáveis, com lesões orais com potencial maligno e pacientes com carcinoma oral por SDS-PAGE acoplado com LC-MS/MS. Foi possível detectar 22 proteínas com aumento de expressão nos tumores comparado aos demais grupos. Dentre estas proteínas, RETN foi posteriormente validada por ELISA em uma coorte independente de casos. Além de confirmarem o aumento de expressão de RETN em tumores comparado a indivíduos saudáveis ou com lesões orais, os autores também demonstraram que níveis elevados da proteína estão correlacionados com estágio avançado da doença e presença de metástases linfonodais (WU et al. 2015).

A metodologia de espectrometria de massa (MS) pela estratégia *Selected Reaction Monitoring* (SEM- MS) apresenta alta especificidade, sensibilidade e precisão. É uma alternativa atrativa para a validação de candidatos a marcadores biológicos, tendo se mostrado uma técnica precisa de quantificação de peptídeos em amostras biológicas complexas (PICOTTI et al. 2010). Utilizando essa metodologia para validar resultados prévios de MS, KAWAHARA

et al. (2016) investigaram 14 proteínas candidatas a biomarcadores de câncer da cavidade oral em amostras de saliva. Foi possível demonstrar um aumento significativo na quantidade dos marcadores C1R, LCN2, SLPI, FAM49B, TAGLN2, CFB, C3, C4B, LRG1 e SERPINA1 na saliva de pacientes com carcinoma oral. Em adição, os autores também demonstraram que CFB, C3, C4B, SERPINA1 e LRG1 estão associados ao risco de desenvolvimento deste tipo tumoral (KAWAHARA et al. 2016).

Um estudo recente combinou as análises de proteômica global e de alvos para identificar uma assinatura prognóstica para pacientes com câncer oral (CARNIELLI et al. 2018). Na etapa de descoberta, os autores avaliaram o perfil proteômico global e histopatológico de tumores da cavidade oral acoplado com os dados clínicos. A partir da análise do perfil das proteínas de ilhas neoplásicas e do estroma adjacente (realizado por microdissecção a laser) foi possível identificar proteínas diferencialmente expressas entre o fronte de invasão tumoral e o tumor (CSTB, NDRG1, LTA4H, PGK1, COL6A1, ITGAV e MB). Em seguida, esses achados foram validados em duas cortes de pacientes independentes por *target* proteômica. Considerando o significado clínico e a intensidade da marcação por IHQ em 125 tumores foi possível identificar que a baixa expressão de CSTB no fronte de invasão é um marcador independente para recorrência local. Além disso, os autores investigaram os níveis dessas proteínas na saliva de 40 pacientes pela técnica de SRM-MS. A análise desses resultados por técnicas de inteligência artificial demonstrou que a combinação dos peptídeos LTA4H, COL6A1 e CSTB é capaz de distinguir com boa

performance pacientes com e sem metástases linfonodais (CARNIELLI et al. 2018). Os resultados desse estudo podem auxiliar nas decisões clínicas e terapêuticas levando a melhora no prognóstico e sobrevida dos pacientes.

Apesar de diversos estudos descritos em literatura terem sido capazes de identificar marcadores significativamente associados a resposta a tratamento, nenhum deles estão sendo efetivamente aplicados na prática clínica. Ainda há uma grande dificuldade na escolha da melhor abordagem terapêutica para pacientes com carcinomas de orofaringe, objetivando aumentar a sobrevida dos pacientes, reduzir a morbidade e toxicidade decorrente do tratamento. A resistência à quimioterapia limita a eficácia da terapêutica contribuindo para óbitos precoces e recorrência, sendo clara a necessidade da inclusão na clínica de marcadores preditivos. Com isto, seria possível evitar a exposição desnecessária a agentes que causam alta taxa de toxicidade no organismo. Até o momento, não há marcadores preditivos de resposta ao tratamento ou capazes de estratificar as melhores linhas de tratamento para carcinomas de orofaringe e que sejam úteis na prática clínica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Identificar moléculas alteradas capazes de prever resposta a quimioterapia neoadjuvante em pacientes com carcinomas de orofaringe.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar genes diferencialmente expressos entre os CCEO de pacientes que responderam a quimioterapia de indução daqueles que não responderam;
- Elaborar um classificador capaz de estratificar pacientes que apresentaram ou não resposta a quimioterapia de indução a partir dos genes diferencialmente expressos;
- Aplicar o modelo preditivo de resposta ao tratamento baseado em transcritos utilizando banco de dados externo;
- Investigar os transcritos com expressão aumentada que codificam proteínas potencialmente secretadas, em cada grupo de pacientes;
- Comparar o perfil proteômico de CCEO de pacientes que responderam ou não a quimioterapia de indução, e assim identificar as proteínas diferencialmente expressas;

- Elaborar um classificador a partir das proteínas diferencialmente expressas capaz de estratificar os pacientes que apresentam resposta a quimioterapia de indução;
- Verificar se há sobreposição entre transcritos, proteínas e vias de sinalização biológicas preditas como alteradas nas análises de transcriptoma e proteoma.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este é um estudo retrospectivo, aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center (Nº. 2352/17) (Anexo 1). Os pacientes incluídos no estudo forneceram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para doação das amostras para a pesquisa. Foram utilizadas amostras biópsias de tumores primários obtidas previamente ao tratamento (Apêndice 1). As amostras de tecido fresco foram obtidas no Biobanco e as amostras tumorais fixadas em blocos de parafina (FFPE) foram obtidas no banco de tumores do Departamento de Patologia do A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brasil.

O fluxograma abaixo (Figura 1) esquematiza as etapas realizadas neste estudo.

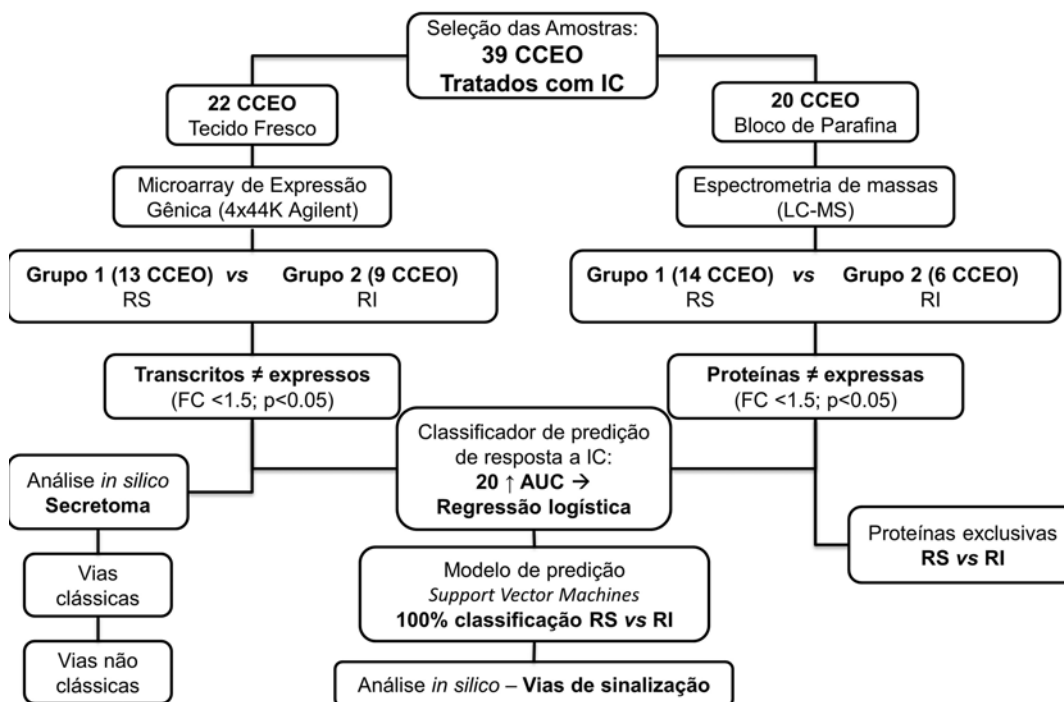


Figura 1 - Fluxograma representando as etapas realizadas neste estudo. CCEO: carcinoma epidemóide de orofaringe; RS: Resposta satisfatória; RI: Resposta insatisfatória; IC: Quimioterapia de indução; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; FC: *Fold-change*; AUC: área abaixo da curva; ≠: diferencialmente; seta: expressão aumentada.

3.1 GRUPOS DE PACIENTES E CRITÉRIOS DE RESPOSTA AO TRATAMENTO

Foram incluídos no estudo 39 pacientes portadores de carcinoma de células escamosas de orofaringe registrados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do A.C. Camargo Cancer Center. Entre os 39 casos, 22 foram avaliados por arrays de expressão gênica e 20 por espectrometria de massas. Os dados de expressão gênica utilizados nestas análises foram obtidos a partir

de um estudo prévio do grupo (BARROS-FILHO et al. 2018). Apenas três amostras tumorais (provenientes de biópsias) deste estudo prévio estavam disponíveis para análise do perfil proteômico, sendo assim, foram incluídas 17 amostras independentes. Para ambas as análises foram incluídos pacientes submetidos a mesma estratégia de tratamento (quimioterapia de indução), uma vez que o objetivo principal do estudo é identificar marcadores capazes de estratificar os pacientes que terão benefício com o emprego deste tratamento.

Os regimes de quimioterapia de indução incluíram a administração de docetaxel, cisplatina e 5-fluorouracil (TPF) para 29 pacientes e docetaxel e cisplatina para 10 pacientes, por três ciclos a cada 21 dias. Após o segundo ciclo ou ao término do tratamento de indução, foi avaliada a resposta ao tratamento por exame clínico e de imagem, como tomografia computadorizada e PET-CT.

A estratificação dos grupos foi realizada de acordo com a resposta a quimioterapia de indução. A resposta global à terapia foi classificada de acordo com os critérios do *World Health Organization-WHO*, sendo resposta completa (RC), resposta parcial (RP), doença estável (DE) e doença progressiva (DP).

Os pacientes foram divididos em dois grupos:

1) Resposta Satisfatória (RS): pacientes que apresentaram resposta completa ao fim do tratamento neoadjuvante. A resposta completa foi considerada quando da presença de remissão completa do tumor, ou seja, ausência de detecção de lesão tumoral por exames de imagem. Pacientes com resposta parcial inclui pacientes que apresentaram redução da massa tumoral de pelo menos 50% em relação ao tamanho prévio ao tratamento.

2) Resposta Insatisfatória (RI): foram incluídos os pacientes em que houve redução de menos de 50% da massa tumoral ao fim do tratamento de indução. Pacientes não responsivos foram considerados aqueles em que o tamanho da massa tumoral se manteve estável ou com diminuição menor do que 25% em relação ao tamanho inicial (doença estável), ou aqueles em que o tumor apresentou progressão durante o tratamento (aumento da massa tumoral ou desenvolvimento de metástases).

3.1.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de carcinoma de células escamosas de orofaringe independente do estadiamento clínico e patológico; pacientes submetidos a tratamento neoadjuvante com finalidade de indução, sendo administrado um regime com a combinação de pelo menos duas das drogas: docetaxel/placitaxel, cisplatina e 5-fluorouracil; pacientes com amostra do tumor primário, prévio ao tratamento, disponível no Banco de Tumores.

Foram excluídos os pacientes previamente submetidos a qualquer tratamento para o câncer ou portadores de qualquer outra neoplasia à coleta ou pacientes com metástase à distância ao diagnóstico.

3.1.2 Caracterização do status do HPV

O status do HPV para cada paciente foi consultado no prontuário médico eletrônico da instituição. As metodologias utilizadas na rotina clínica do A.C.Camargo Cancer Center para determinar a presença do HPV são imunohistoquímica (p16). A genotipagem do HPV pelo Linear Array HPV Genotyping Test (Roche) foi realizada nas amostras de tecido congelado. Em resumo, a técnica de IHQ consiste basicamente dos seguintes procedimentos: as lâminas contendo as amostras tumorais fixadas em formalina e em blocos de parafina são pré-aquecidas a 56°C. Procede-se a desparafinização em xilol (2 trocas de 10 minutos cada); passagem em álcool etílico em concentração decrescente (100%, 85% e 75%) seguidas de lavagem em água corrente por 5 minutos. A recuperação antigênica por calor é realizada utilizando o equipamento PT-Link (DAKO®) seguindo as recomendações de tempo e pH fornecidas pelo fabricante. As lâminas são submetidas a métodos de recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio 3% (Merck) em tampão tris salino (TBS) por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram incubados com bloqueador de proteínas inespecíficas (DAKO®) por 5 minutos, à temperatura ambiente e em câmara úmida. As lâminas foram incubados com anticorpo primário (p16 - Abcam), por 90 minutos à temperatura ambiente e posteriormente incubados com o anticorpo secundário e com o polímero HRP (Flex Plus, DAKO®) durante 30 minutos cada à temperatura ambiente. Após lavagem em PBS, as lâminas com as amostras foram incubadas com o cromógeno Diaminobenzidina (DAB – DAKO®), por 5

minutos e então lavadas em água corrente e contracorados com hematoxilina de Harris, por 2 segundos. As lâminas foram analisadas pelo patologista responsável. Os tumores com marcação difusa citoplasmática e nuclear, forte ou moderada, em pelo menos 70% das células foram considerados HPV positivos (GRØNHØJ LARSEN et al. 2014).

A técnica de genotipagem do HPV pelo Linear Array HPV Genotyping Test (Roche, Basileia, Suíça) é um método qualitativo que permite a identificação de 37 subtipos de HPV, incluindo 13 de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). A interpretação dos resultados é orientada pelo guia de referência fornecido pelo fabricante. O controle de qualidade do DNA é a β -globina (268pb).

3.2 EXPRESSÃO GÊNICA GLOBAL

O perfil global de expressão de transcritos foi re-analisado em um subconjunto de 22 amostras de carcinomas de orofaringe utilizando os dados de um estudo prévio do grupo (BARROS-FILHO et al. 2018). A metodologia utilizada para análise dos dados está descrita na seção 3.4.

3.3 ANÁLISE DO PERFIL PROTEÔMICO DOS TUMORES

Para caracterização do perfil proteômico foram avaliadas 20 biópsias de carcinomas de orofaringe fixadas em formalina e em blocos de parafina (FFEP), de acordo com os critérios descritos acima.

3.3.1 Preparo das amostras e extração dos peptídeos

Os tumores primários (FFPE) foram disponibilizados pelo Banco de Tumores do A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo. Primeiramente foi preparada uma lâmina de tecido tumoral contra corada com hematoxilina e eosina (HE) de cada paciente para análise histológica pelo médico patologista Dr. Clóvis Antonio Lopes Pinto. A região tumoral foi discriminada e utilizada como guia para macrodissecção de 10-15 cortes de 10 μ m de cada bloco de FFPE.

O preparo das amostras foi realizado no LNBio - CNPEM Campinas -SP (Laboratório Nacional de Biociências) em colaboração com a Dra Adriana F. Paes Leme. Após a macrodissecção foi realizada a desparafinização das amostras, utilizando duas lavagens com 500 μ L de xilol 100%, vórtex por 1 minuto e centrifugação por 15 minutos a 12000 rpm em temperatura ambiente. Seguido de uma lavagem com 500 μ L de etanol 100%, vórtex por 30 segundos e centrifugação, hidratação do tecido com 500 μ L de etanol 50%, vórtex por 30 segundos e nova centrifugação de 15 minutos a 12000 rpm em temperatura

ambiente. Após esses procedimentos, as amostras foram submetidas a um concentrador a vácuo.

As proteínas foram reduzidas, alquiladas e digeridas com tripsina para extração dos peptídeos. Brevemente, as amostras tumorais foram tratadas com 120 μL de ureia [8 M], seguida de redução com 1,2 μL de ditioneitol (DTT) a 5 mM por 25 minutos a 56°C protegidas da luz. A alquilação foi realizada com 3,36 μL de iodoacetamida (IAA) a 14 mM por 30 minutos em temperatura ambiente protegido da luz. Foi acrescentado 1,2 μL de ditioneitol, com incubação por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi adicionado 503,04 μL de bicarbonato de amônio [50mM], 6,28 μL de CaCl_2 , e digestão com 2,5 μg de tripsina (Sequencing Grade Modified Trypsin - Promega Corporation, Madison, WI, USA) por 16 horas a 37°C. Após a digestão com tripsina, foi utilizado 100 μL da amostra para quantificação por Bradford.

3.3.2 Quantificação dos peptídeos por Bradford

A quantificação dos peptídeos foi realizada pelo método de Bradford (Bradford assay kit - Bio-Rad, São Paulo, Brasil). A curva padrão foi elaborada utilizando albumina do soro bovino (BSA) [1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$], sendo o primeiro ponto com 0,5 μg de BSA e o último ponto da curva com 12 μg de BSA. Resumidamente, 100 μL das amostras foram adicionadas em uma placa de 96 poços contendo 100 μL de solução reativa de Bradford (reativo: 2 mL Bradford: 3 mL água ultra pura estéril). Após a incubação da placa em temperatura ambiente por 10

minutos, foi realizada a leitura no comprimento de onda de 595nm na leitora ASYS ExpertPlus (Biochrom Ltd., Cambridge, UK).

3.3.3 Dessalinização dos peptídeos com Stage Tip – colunas C18

A acidificação da amostra foi realizada com 2,5 µL de ácido trifluoracético (0,5%) (Sigma-Aldrich Corporation, Missouri, EUA) para posterior dessalinização. Primeiramente, a membrana C18 (EMPORE™ - 3M) foi condicionada com 100 µL de metanol 100%, e então foi equilibrada com 200 µL de ácido fórmico 0,1%. A amostra foi passada pela membrana duas vezes para garantir que todos peptídeos ficassem retidos, e então foi realizada 5 lavagens com 200 µL de ácido fórmico 0,1%. Os peptídeos foram eluídos em 100 µL de acetonitrila (80%) contendo 0,1% de ácido fórmico. Após cada etapa, as amostras foram centrifugadas a 2000 rpm por 2 minutos. O eluído foi incubado em um concentrador a vácuo para secagem e armazenado a -80°C.

3.3.4 Análise proteômica pela técnica de espectrometria de massa

Os peptídeos foram ressuspensos em 20 µL de ácido fórmico a 0,1% e separados em gradiente de acetonitrila (2-90%) contendo 0,1% de ácido fórmico em uma coluna analítica PicoFrit (15 cm x 75 µm id, de 5 µm de tamanho de partícula, New Objective), em fluxo de 300 nL/min durante 200 minutos. A voltagem do Nanoeletrospray (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA) é de 2,1 kV e temperatura da fonte de 275°C. Os peptídeos foram analisados no espectrômetro de massas LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific,

Massachusetts, EUA) acoplado com cromatografia líquida (LC-MS/MS). Todos os métodos de instrumento foram realizados no modo de aquisição de análise dependente dos dados. As análises foram realizadas em *full scan* (m/z 300-1600), com resolução no Orbitrap definida em $r=60.000$ e os 20 íons mais intensos com carga ≥ 2 , foram sequencialmente isolados e fragmentados por CID (*Collision-induced dissociation*) (normalizada de 35%). A exclusão dinâmica foi habilitada com uma lista de exclusão de 500 peptídeos, duração da exclusão de 60 segundos e contagem de repetição de 1. Foi utilizada uma ativação de $q=0,25$ e um tempo de ativação de 10 ms.

3.4 ANÁLISE DOS DADOS

3.4.1 Características clínicas

O teste de Qui-Quadrado ou Exato de Fisher foi utilizado para estudar associações entre as variáveis qualitativas, de acordo com frequências. Para a análise de variáveis expressas de forma numérica contínua, foram utilizados testes paramétricos (teste t e ANOVA com pós-teste de Tukey). As análises estatísticas foram realizadas com a utilização do programa SPSS (Statistics Packet for Social Sciences), versão 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

3.4.2 Expressão gênica

Os genes foram classificados baseadas na Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) e Gene Ontology (GO). As análises de expressão

gênica foram realizadas utilizando o software R v. 2.15 (<http://www.bioconductor.org/>) e BRB ArrayTools software (v.4.4.0). A análise hierárquica não supervisionada foi realizada utilizando as probes com maior variabilidade (>0.1) e distância euclidiana. Os dados de expressão utilizados estão disponíveis no GeneExpression Omnibus (GEO) (GSE111395).

3.4.3 Expressão proteica

A lista de picos (msf) gerada foi processada pelo programa Proteome Discoverer v. 1.3 (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, EUA), utilizando o algoritmo do Sequest. A busca das proteínas identificadas é feita utilizando o *Human International Protein Database* com modificação fixa de carbamidometilação (+57,021 Da) e modificações variáveis de oxidação da metionina (+15,995 Da), uma clivagem perdida da tripsina e tolerância de massas de 10 ppm para o íon precursor e 1 Da para os íons fragmentos. Em seguida, os dados foram filtrados pelo Scaffold Q+ e configurado para a obtenção de False Discovery Rate (FDR) menor que 1%.

3.4.4 Comparação entre os grupos e construção de modelo preditor de resposta à quimioterapia de indução

Transcritos e proteínas diferencialmente expressas entre os grupos de pacientes respondedores e não respondedores a terapia de indução foram identificadas pelo teste t com nível de significância de 5% e fold-change $>1,5$, utilizando o software BRB-ArrayTools (NIH- Nacional Cancer Institute). As

curvas ROC foram avaliadas pelo programa SPSS (Statistics Packet for Social Sciences) versão 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA).

Para a seleção dos transcritos e proteínas com maior potencial de predizer pacientes que apresentaram resposta a IC daqueles que não respondem ao tratamento, foram avaliadas as curvas ROC de cada potencial marcador (AUC, *area under the ROC curve*). Foram selecionadas as 20 moléculas com maiores valores de AUCs (≥ 0.8). Os marcadores não redundantes e que não apresentaram colinearidade foram filtrados utilizando teste de regressão logística. Os marcadores selecionados foram utilizados para desenvolver um classificador com potencial de predição de resposta a quimioterapia de indução, os modelos foram treinados utilizando o método Support Vector Machine (SVM), e o desempenho estimado pela Leave-One-Out-Cross-Validation (LOOCV) pelo programa BRB Array Tools v. 4.4.0 (Biometric Research Branch, National Cancer Institute. <https://brb.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools/>).

3.4.5 Aplicação do algoritmo de expressão gênica de predição de resposta utilizando os dados do TCGA

Dados de expressão gênica (sequenciamento de RNA) e seguimento clínico de pacientes com câncer de orofaringe do TCGA foram obtidos pelo Xena Browser (<https://xenabrowser.net/> -acessado em fevereiro de 2019). O modelo com os valores de RNA seq (RPM log₂) foi aplicado e estratificado em abaixo e acima da mediana. Foi realizada a análise de sobrevida global e livre de doença

utilizando os métodos de Kaplan Meier e teste de log rank (SPSS, Chicago, IL, USA).

3.4.6 Análise *in silico* de secretoma baseado em dados de transcriptoma e proteômica

Com o objetivo de identificar potenciais biomarcadores em biópsia líquida, foi realizada uma análise de secretoma para selecionar proteínas secretadas pelos tumores de orofaringe com potencial para estarem presentes na circulação. Os genes e proteínas com aumento de expressão ($FC > 1,5$) para cada grupo foram selecionados para a identificação de produtos possivelmente secretados pelo tumor.

Primeiramente, foi realizada a identificação das proteínas traduzidas pelos genes diferencialmente expressos e mapeamento das proteínas diferencialmente expressas. A aquisição da sequência de aminoácidos foi realizada usando UniProtKB (<http://www.uniprot.org>). Foram selecionadas somente sequências revisadas e com no máximo 4.000 aminoácidos. Os servidores CBS: SecretomeP 2.0, SignalP 4.1 e TargetP 1.1 (disponíveis em <http://www.cbs.dtu.dk/services/>) foram utilizados como ferramentas de predição de proteínas secretadas a partir dos arquivos FASTA gerados por UniProtKB.

A ferramenta TargetP é utilizada para a predição de localização de proteínas baseado na presença de sequências na região N-terminal que indiquem direcionamento mitocondrial (mTP) ou peptídeo-sinal da via secretora (SP). Os sítios de clivagem do peptídeo-sinal nas sequências de aminoácidos de

diferentes organismos são avaliados pelo SignalP, identificando proteínas secretadas pela via clássica. O método incorpora uma previsão de locais de clivagem e uma predição de peptídeo-sinal/peptídeo não sinal com base em uma combinação de várias redes neurais artificiais. A ferramenta SecretomeP permite prever as proteínas secretadas pela via não clássica, ou seja, sem a presença do peptídeo-sinal. O software consulta diversos servidores para obter informações sobre vários aspectos pós-translacionais e de localização da proteína, que são integrados na previsão final de secreção.

Os resultados dos três bancos de dados foram comparados para seleção dos candidatos com maior potencial para serem investigados em biópsias líquidas. Proteínas identificadas como secretadas pelas vias clássica (SignalP) e não clássica (SecretomeP) que não possuíam como alvo a mitocôndria (TargetP) foram selecionadas para uma investigação detalhada em bancos de dados de proteínas secretadas em vesículas e no plasma: ExoCarta (<http://www.exocarta.org/>), Vesiclepedia (<http://www.microvesicles.org/>) The Plasma/ Proteome database (<http://plasmaproteomedatabase.org>), Cancer Secretome (<http://www.cancersecretome.org/>), EVpedia.

3.4.7 Análise de vias in silico

A análise in silico foi realizada pelo KOBAS 3.0 (<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>) usando o banco de vias do KEGG e Reactome, foram selecionadas as vias significativas com P corrigido <0.01.

4 RESULTADOS

O fluxograma abaixo resume as metodologias e análises aplicadas em cada etapa, assim como os resultados obtidos (Figura 2).

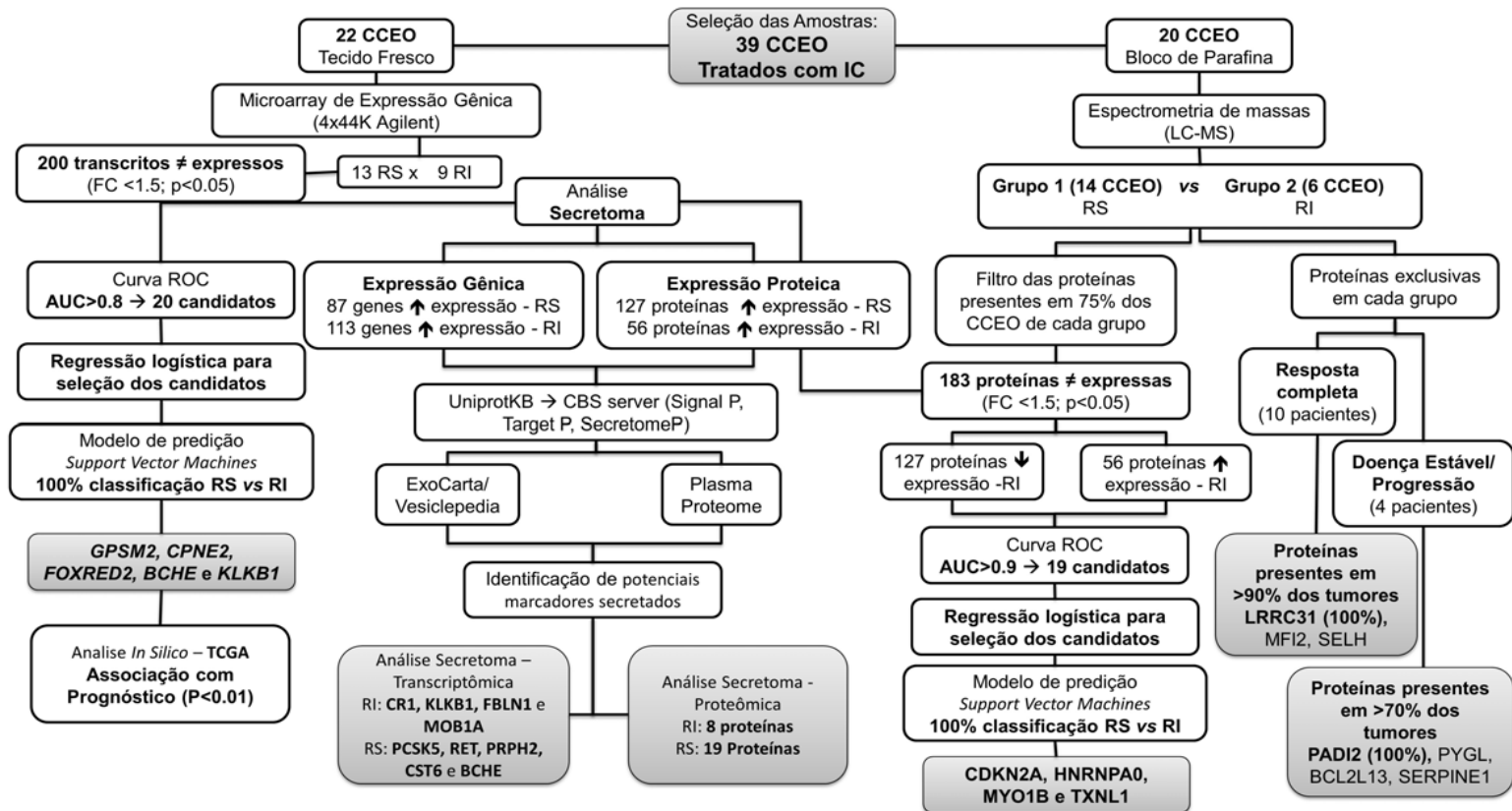


Figura 2 - Fluxograma ilustrando as metodologias e resultados obtidos em cada etapa do projeto.

Legenda: CCEO: carcinoma de células escamosas de orofaringe; RS: Resposta satisfatória; RI: Resposta insatisfatória; IC: Quimioterapia de indução; LC-MS: cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas; FC: *Fold-change*; AUC: área abaixo da curva; ≠: diferencialmente; seta para cima: expressão aumentada; seta para baixo: expressão diminuída.

4.1.1 Análise dos dados clínicos e epidemiológicos

Foram incluídos no estudo 39 pacientes, portadores de carcinoma de células escamosas de orofaringe, submetidos a tratamento neoadjuvante com finalidade de indução ou curativa, sendo aplicado um regime com a combinação entre taxano, cisplatina e 5-fluorouracil.

A Tabela 2 resume os dados clínicos dos pacientes, sendo apenas um do sexo feminino e 38 do sexo masculino. A idade média ao diagnóstico foi de 52 anos, variando entre 39 e 71. A maioria dos pacientes possuía histórico de hábito tabagista (69%, 27/39) e de consumo de álcool (74%, 29/39). O foco inicial do tumor primário estava localizado na amígdala em 23 pacientes (59%) e na base da língua em 15 pacientes (38%), um no palato mole e um tumor sem localização inicial específica (região da amígdala). A maioria dos pacientes apresentou tumores em estadiamento clínico (EC) avançado III (13 casos) e IV (15 casos) ao diagnóstico, e onze pacientes apresentaram EC II (28%). O acompanhamento clínico variou entre 5 e 120 meses.

Tabela 2 - Dados clínicos dos 39 pacientes incluídos no estudo, entre eles, 20 foram avaliados por espectrometria de massa, 22 por análise de expressão gênica e secretoma, sendo que 3 pacientes foram avaliadas por ambas metodologias.

<i>Característica</i>	<i>Grupo 1 (N=25) RS (%)</i>	<i>Grupo 2 (N=14) RI (%)</i>
Idade média em anos (variação)	52 (39 - 71)	51.5 (39 - 64)
Hábito tabagista		
Sim	15 (60)	12 (86)
Não	10 (40)	2 (14)
Consumo de álcool		
Sim	16 (64)	13 (93)
Não	9 (36)	1 (7)
Expressão de p16*		
Positiva	16 (73)	3 (25)
Negativa	6 (27)	9 (75)
ND	3	2
Localização do tumor		
Base de língua	10 (40)	5 (36)
Amígdala	15 (60)	7 (50)
Outros	-	2 (14)
Estádio T		
T1-2	7 (28)	2 (14)
T3	14 (56)	4 (29)
T4	4 (16)	8 (57)
Estádio N		
N0	3 (12)	2 (14)
N1	4 (16)	3 (21)
N2	14 (56)	5 (36)
N3	4 (16)	4 (29)
Estádio M		
M1	2 (8)	1 (7)
M0	23 (92)	13 (93)
Recidiva		
Sim	5 (20)	3 (21)
Não	20 (80)	11 (79)
Seguimento		
VSD	20 (80)	2 (14)
VCD		4 (29)
Óbito por câncer	4 (16)	8 (57)
Óbito por outras causas	1 (4)	

legenda: RS: resposta satisfatória; RI: resposta insatisfatória; ND: não disponível para análise; VSD: vivo sem a doença; VCD: vivo com a doença. * a positividade para p16 foi considerado como HPV positivo.

Considerando apenas a resposta ao tratamento neoadjuvante com quimioterapia de indução, 15 pacientes (38%) apresentaram resposta completa, 12 (31%) resposta parcial e 12 (31%) doença estável ou progressão da doença ao final da IC. O tratamento definitivo utilizando quimioterapia (cisplatina) e radioterapia concomitante foi administrado em 37 pacientes, um recebeu radioterapia com cetuximab e um foi abordado cirurgicamente. Entre os pacientes tratados com quimiorradioterapia (cisplatina e cetuximab), três necessitaram de cirurgia de resgate ao fim do tratamento. Considerando o final do tratamento completo, 29 pacientes apresentaram resposta completa e 10 apresentaram doença residual ou progressão. A curva de sobrevida global em 5 anos estratificada de acordo com a resposta ao tratamento de indução revelou uma estimativa de sobrevida semelhante entre os pacientes que apresentaram resposta completa e resposta parcial (86% e 75%), e foi significativamente inferior nos pacientes que apresentaram doença estável/ progressão da doença (41.7%) (Figura 3.A).

Ao estratificar os níveis de resposta a IC em dois grupos (1) Resposta Satisfatória (RC + RP>50%) e (2) Resposta Insatisfatória (RP<50% + DE/PD), foi possível observar uma diferença significativa ($p<0,001$) na sobrevida global em 5 anos nos pacientes que apresentaram resposta a IC comparado aqueles que não responderam ao tratamento (43% e 84%, respectivamente) (Figura 3.B). Desta maneira, as análises estatísticas dos dados clínicos e moleculares foi baseada na comparação entre esses dois grupos de pacientes. O grupo de pacientes respondedores inclui 25 casos e de não respondedores 14.

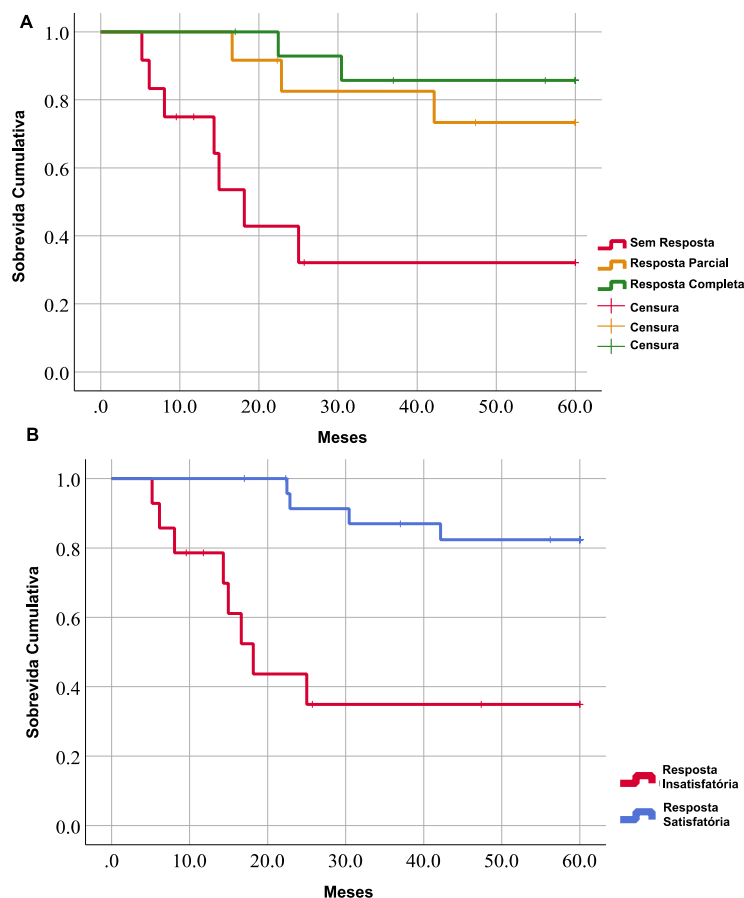


Figura 3 - Curva de sobrevida global em 5 anos de acordo com a resposta a quimioterapia de indução. **A.** Os pacientes foram classificados em três grupos: pacientes que apresentaram resposta completa (verde); resposta parcial (laranja) e aqueles que não responderam ao tratamento (vermelho). **B.** Curva de sobrevida global em 5 anos nos dois grupos de resposta a quimioterapia de indução: (1) Resposta satisfatória: RC + RP > 50% (azul); (2) Resposta Insatisfatória: RP < 50% + DE/PD (vermelho).

4.1.2 Status do HPV e resposta à terapia

O status do HPV foi baseado na expressão do p16 em 34 pacientes, sendo considerados 44% dos casos como HPV negativos (15 casos) e 56% positivos (19 casos). Em casos categorizados como HPV positivos, 50% dos sítios acometidos na orofaringe envolvia as tonsilas e 50% a base da língua. Nos casos classificados como HPV negativos, a maioria dos tumores acometia a

base da língua (67%). Por meio da análise de sobrevida global em 5 anos, foi verificado que a infecção pelo HPV prediz a probabilidade de sobrevida câncer específica (teste de log-rank, $P=0,000029$). Desta forma, os pacientes HPV negativos mostraram uma taxa de sobrevida menor quando comparados aos casos HPV positivos (Figura 4.A). Cinco amostras tumorais não possuíam tecido suficientes para avaliar a expressão da proteína p16.

No grupo de pacientes que apresentou resposta a terapia de indução, seis tumores foram considerados HPV negativos (24%), 16 HPV positivos (64%) e três indeterminados (Figura 4.B). Entre os pacientes com resposta insatisfatória, a maioria era HPV negativo (64%), apenas três eram HPV positivos (21%) e dois tumores foram considerados como indeterminados (Figura 4.C).

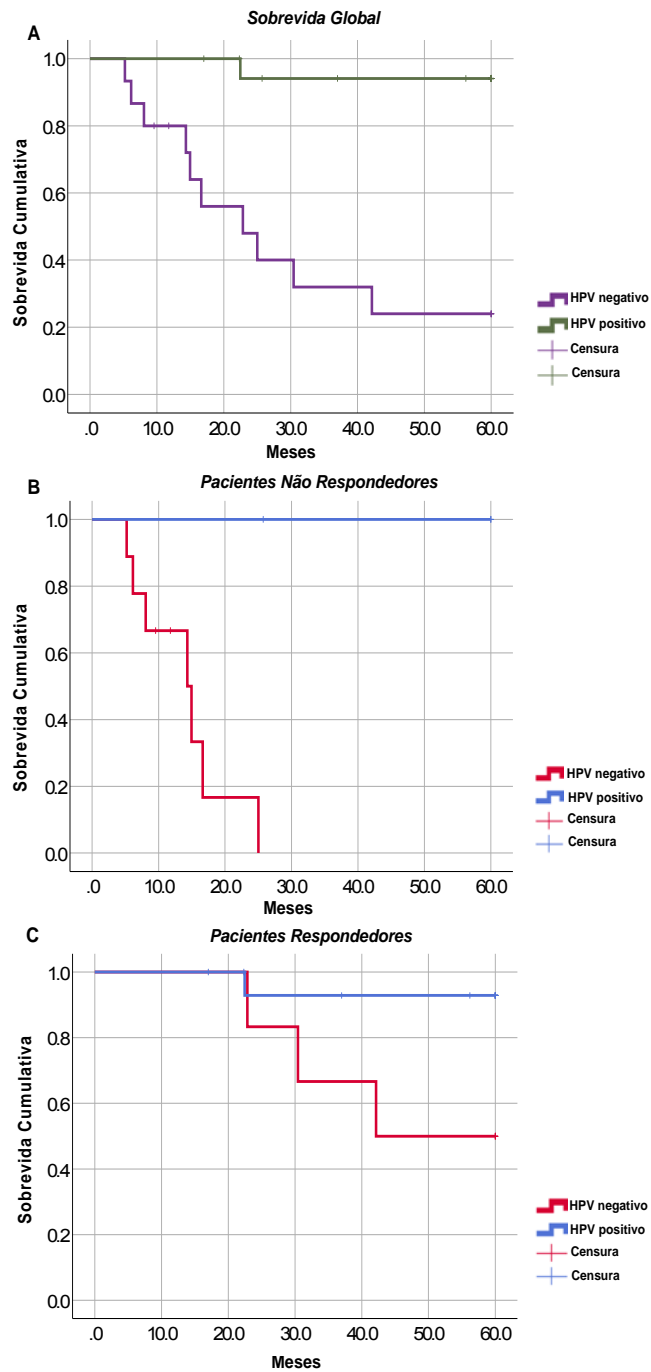


Figura 4 - Curva de sobrevivência global em 5 anos de acordo com o status do HPV (baseado na expressão da proteína p16) **(A)**. Curva de sobrevivência em 5 anos de acordo com o status do HPV e a resposta à terapia de indução. **B)** Grupo de pacientes não respondedores. **C)** Grupo de pacientes respondedores.

4.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GLOBAL DE TRANSCRITOS

4.2.1 Comparação do perfil de expressão de transcritos em câncer de orofaringe de acordo com a resposta ao tratamento neoadjuvante

O perfil de expressão gênica global foi avaliado em 22 tumores de orofaringe divididos em dois grupos, sendo 13 respondedores e nove que não apresentaram resposta satisfatória à quimioterapia indução. A análise de agrupamento hierárquico não supervisionado dos 2692 transcritos ($DP > 1$) entre as amostras não revelou diferença entre os grupos (Figura 5A).

Dessa forma, foi realizada uma análise comparativa entre os perfis de expressão gênica dos grupos 1 (respondedores) e 2 (não respondedores). Foram identificados 200 genes diferencialmente expressos entre os grupos (teste t-Student com $P < 0,05$) sendo 87 genes com expressão diminuída ($FC < -1,5$) e 113 genes com aumento de expressão ($FC > 1,5$) nos pacientes não respondedores em relação ao grupo respondedor (Tabela 3; Apêndice 2).

Os 200 genes diferencialmente expressos (Figura 5B) foram selecionados para realizar uma análise hierárquica sendo possível observar dois grupos, um incluindo os tumores com RS (9/13) a quimioterapia de indução, e o segundo compreendendo todos casos com resposta insatisfatória (9/9); quatro amostras RS (4/13) foram agrupadas erradamente no segundo grupo.

Tabela 3 - Lista dos 40 transcritos com maior diferença de expressão (aumento e diminuição dos níveis de expressão) entre os tumores de pacientes não respondedores ao tratamento em relação ao grupo respondedor.

Transcrito	<i>Fold-change</i>	Valor de P	Transcrito	<i>Fold-change</i>	Valor de P
<i>FLRT3</i>	-4,74	0,019	<i>RNF32</i>	2,13	0,020
<i>SPINK6</i>	-4,71	0,019	<i>SSX2IP</i>	2,13	0,030
<i>CWH43</i>	-4,60	0,048	<i>MKI67</i>	2,17	0,016
<i>BBOX1</i>	-4,51	0,011	<i>RASIP1</i>	2,17	0,015
<i>BCHE</i>	-4,03	0,016	<i>CD207</i>	2,27	0,022
<i>PQLC2L</i>	-3,75	0,001	<i>FAM153B</i>	2,38	0,011
<i>PPP1R9A</i>	-3,66	0,023	<i>SYCE2</i>	2,38	0,049
<i>TSPAN8</i>	-3,63	0,032	<i>ABI3BP</i>	2,56	0,024
<i>NLRP2</i>	-3,08	0,016	<i>RIBC2</i>	2,56	0,038
<i>RYR2</i>	-2,98	0,006	<i>RPTN</i>	2,56	0,033
<i>SLC35F3</i>	-2,95	0,038	<i>OLFM1</i>	2,70	0,005
<i>SLCO1A2</i>	-2,87	0,022	<i>C4orf19</i>	2,78	0,028
<i>CST6</i>	-2,84	0,011	<i>MROH2A</i>	2,78	0,047
<i>LRRC17</i>	-2,74	0,032	<i>BTNL9</i>	2,86	0,029
<i>PCSK1</i>	-2,74	0,006	<i>TDRD10</i>	3,13	0,016
<i>MAB21L4</i>	-2,71	0,038	<i>ASPN</i>	3,70	0,027
<i>C11orf88</i>	-2,69	0,011	<i>STAG3</i>	3,70	0,020
<i>NAP1L2</i>	-2,69	0,023	<i>GPC3</i>	3,85	0,006
<i>KLF8</i>	-2,68	0,008	<i>SMC1B</i>	4,00	0,037
<i>CA2</i>	-2,59	0,016	<i>SOHLH1</i>	4,55	0,036

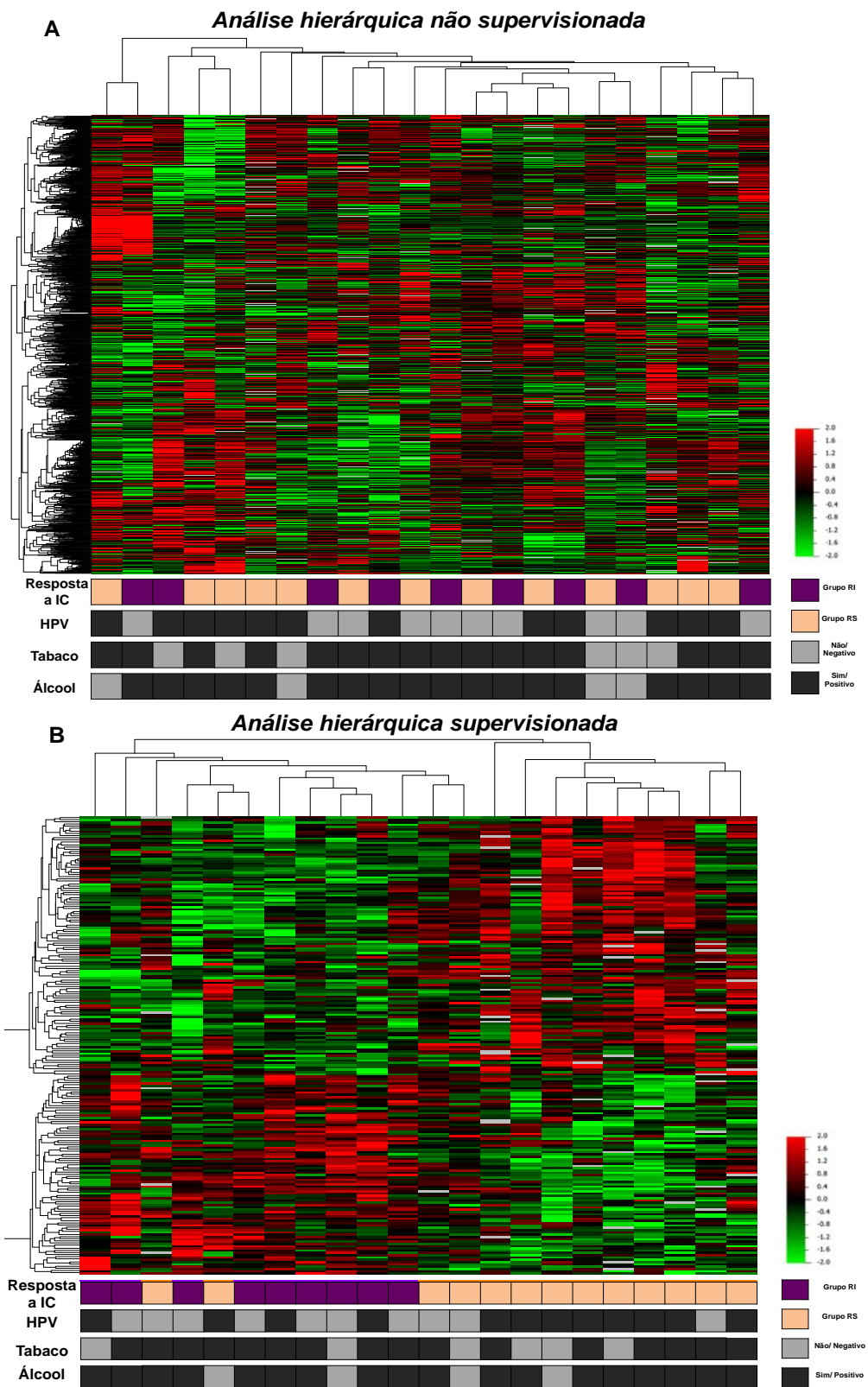


Figura 5 - Análise de agrupamento hierárquico dos transcritos diferencialmente expressos. **A.** Análise de agrupamento hierárquico não supervisionado incluindo 2692 transcritos diferencialmente expressos ($DP > 1$) em 22 carcinomas de orofaringe. Não foi observado grupos de acordo com a resposta a quimioterapia de indução, status do HPV, tabaco ou consumo de álcool. **B)** Clusterização dos 200 genes diferencialmente expressos entre os grupos 1 e 2, evidenciando dois agrupamentos: um incluindo apenas os casos com resposta satisfatória (9/13), sendo a maioria tumores HPV positivos (8/9). O outro cluster incluiu 4 (4/13) tumores com RS e todos os tumores que não apresentaram resposta ao tratamento. Não foi possível observar a formação de clusters de acordo com o consumo de álcool ou tabaco. Os quadros em roxo (0) indicam os casos que apresentaram resposta insatisfatória a IC, os quadros em laranja (1) representam os pacientes com resposta satisfatória ao tratamento de indução. Casos HPV negativos, que não fumam ou bebem estão representados pelos quadros em cinza; enquanto os casos positivos para estas características (HPV positivos, tabagistas e/ou consumidores de álcool) estão indicados pelos quadros em preto.

4.2.2 Análise do potencial preditivo dos transcritos diferencialmente expressos

Para a seleção dos transcritos com maior potencial preditivo em discriminar pacientes que apresentam resposta satisfatória daqueles que não respondem ao tratamento, foram selecionados 20 dos 200 transcritos diferencialmente expressos, os quais apresentaram os maiores valores de AUCs (Tabela 4).

Utilizando o método de construção do modelo de predição, foram selecionados cinco potenciais marcadores (*GPSM2*, *CPNE2*, *FOXRED2*, *BCHE* e *KLKB1*). O modelo matemático desenvolvido ($GPSM2 \times -0,6723 + CPNE2 \times -$

1,1916 + FOXRED2 x -1,0832 + BCHE x 0,4882 + KLKB1 x -0,5215) foi capaz de classificar corretamente todas as amostras de acordo com a resposta ao tratamento (escores menores que -0,588 são preditos como responsivos) (Figura 6).

Tabela 4 - Vinte transcritos candidatos a marcadores de resposta a tratamento (maiores área abaixo da curva ROC).

Gene	Valor de p	Fold-change	AUC	Inferior 95%	Superior 95%
<i>GPSM2</i>	0,026	1,6	0,897	0,769	1
<i>CPNE2</i>	0,013	1,5	0,88	0,733	1
<i>ITGB3BP</i>	0,032	1,5	0,872	0,725	1
<i>CCDC112</i>	0,002	1,9	0,872	0,715	1
<i>ELK1</i>	0,034	1,6	0,87	0,713	1
<i>ZBTB18</i>	0,037	1,6	0,855	0,69	1
<i>LINC02210</i>	0,029	1,6	0,855	0,684	1
<i>DCUN1D5</i>	0,009	-1,8	0,852	0,664	1
<i>DCBLD1</i>	0,004	-2,1	0,852	0,689	1
<i>HMG2</i>	0,021	1,7	0,846	0,661	1
<i>SNRNP40</i>	0,005	1,6	0,846	0,684	1
<i>SLC25A13</i>	0,033	-1,5	0,846	0,683	1
<i>FOXRED2</i>	0,001	2,1	0,843	0,669	1
<i>BCHE</i>	0,015	-4,0	0,843	0,668	1
<i>KLKB1</i>	0,028	2,0	0,838	0,672	1
<i>UNG</i>	0,018	1,6	0,833	0,655	1
<i>PLEKHH2</i>	0,023	2,1	0,829	0,656	1
<i>B3GLCT</i>	0,043	1,9	0,829	0,647	1
<i>FAM229B</i>	0,048	-1,7	0,829	0,653	1
<i>ALG10B</i>	0,039	1,9	0,824	0,642	1

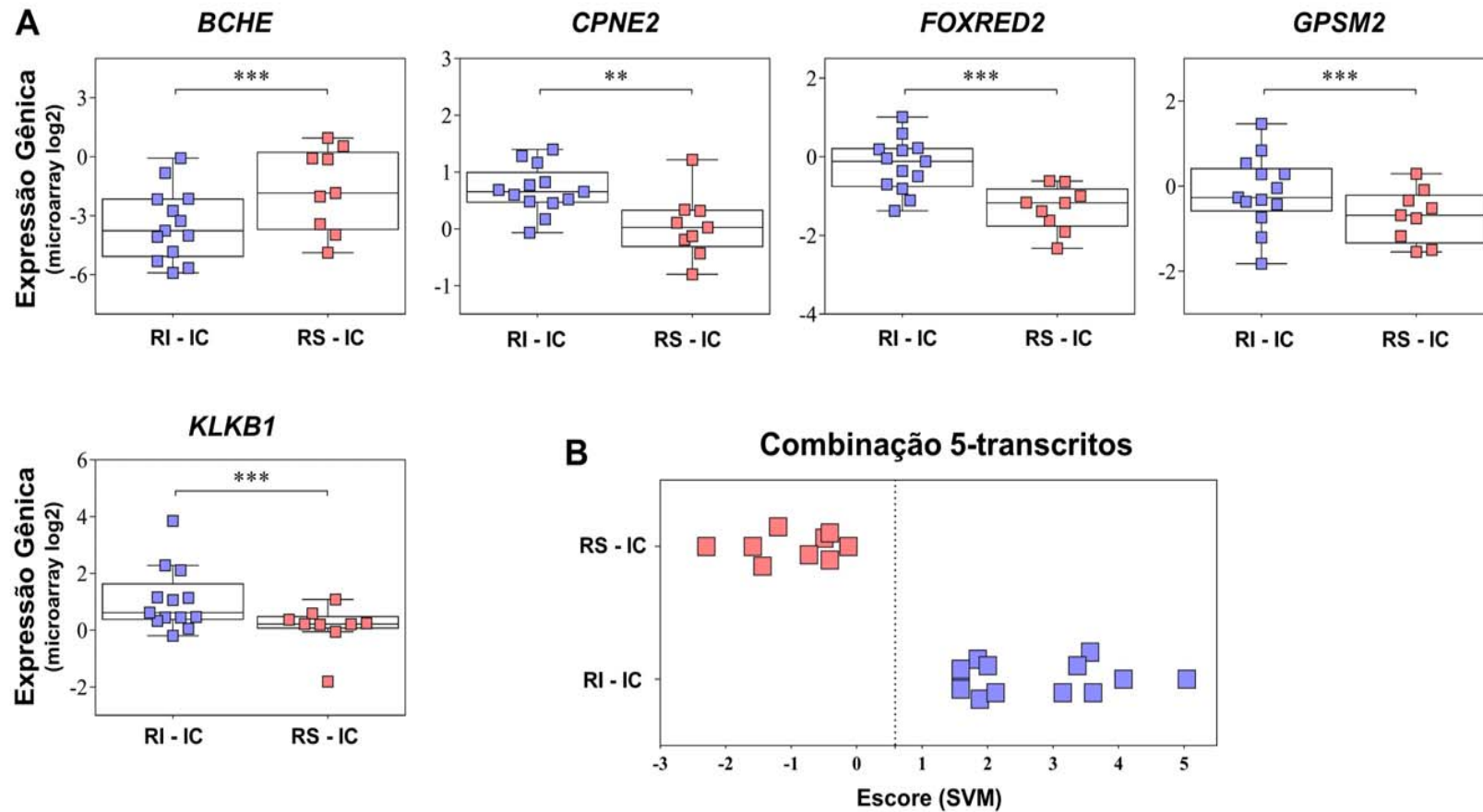


Figura 6 - Modelos de predição de resposta a quimioterapia de indução em tumores de orofaringe baseados em dados de expressão gênica do presente estudo. **A.** Gráficos representativos dos valores de expressão relativa de *GPSM2*, *CPNE2*, *FOXRED2*, *BCHE* e *KLKB1*. **B.** Modelo de predição de resposta a quimioterapia de indução em tumores de orofaringe baseados em microarranjos de expressão gênica com poder de classificação de 100% das amostras tumorais. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (teste t). IC: quimioterapia de indução; RS: resposta satisfatória; RI: resposta insatisfatória.

4.2.3 Análise da aplicação do algoritmo de predição de resposta ao tratamento usando os dados do TCGA em relação ao prognóstico

O algoritmo de predição de resposta ao tratamento desenvolvido com os dados de expressão gênica foi aplicado nos dados extraídos do TCGA, sendo possível a avaliação da associação com sobrevida global e livre de doença. Não foi possível treinar o classificador para a predição de resposta a IC em dados públicos pela falta de estudos com pacientes tratados com IC disponíveis no TCGA e GEO.

Além do algoritmo ter apresentado boa performance na predição de resposta a IC com os dados internos, ele também demonstrou bom desempenho para ser aplicado como marcador prognóstico independente do tratamento. Foi possível observar uma associação significativa ($P < 0,01$) com sobrevida global e livre de doença (Figura 7).

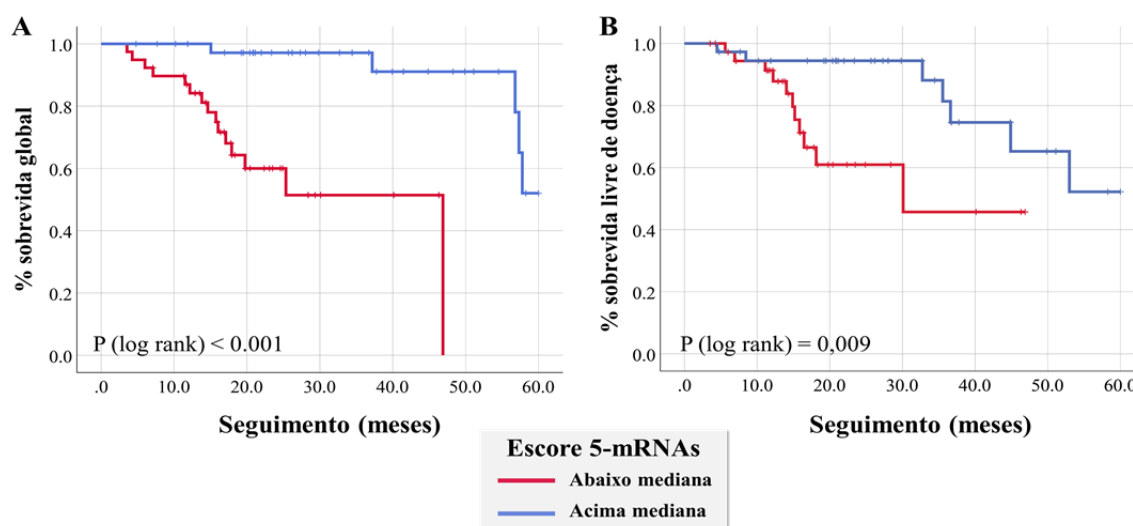


Figura 7 - Curvas de sobrevida de acordo com o classificador utilizando os dados do TCGA (N= 78 CCEO). **A.** Sobrevida global. **B.** Sobrevida livre de doença.

4.2.4 Análise do secretoma de câncer de orofaringe de acordo com a resposta ao tratamento neoadjuvante

Para identificar proteínas potencialmente secretadas possíveis de serem utilizadas como marcadores detectáveis em biópsia líquida, foram avaliados 113 transcritos com aumento de expressão (FDR < 5%, FC > 1,5) nos tumores de pacientes que não apresentaram resposta satisfatória (RI) ao tratamento neoadjuvante e 87 em tumores com boa resposta (RS). Entre esses genes, 109 de RI e 86 de RS foram associados à proteínas identificadas usando UniProtKB (<http://www.uniprot.org>). As sequências dessas proteínas foram utilizadas para predição *in silico* onde cada gene foi associado a um UniProt ID. Entre elas apenas um gene codifica proteínas com mais de 4,000 aminoácidos e não pode ser avaliado.

A análise dos 109 genes associados a RI e 86 a RS utilizando as ferramentas de predição SecretomeP 2.0, SignalP 4.1 e TargetP 1.1 (CBS servers: <http://www.cbs.dtu.dk/services/>) resultou em 45 proteínas potencialmente secretadas em RI e 38 proteínas em RS. A busca em bancos de dados por essas proteínas ou respectivos mRNAs descritos em vesículas extracelulares (VE) provenientes de amostras de carcinomas de cabeça e pescoço (Vesiclepedia: <http://www.microvesicles.org/> ou Exocarta: <http://www.exocarta.org/>) resultou em apenas uma proteína (CA2) secretada pelos tumores responsivos a quimioterapia de indução. Quando considerado as proteínas presentes em VE provenientes de amostras de pacientes com câncer em geral foram obtidas 20 proteínas de tumores não responsivos e 19 de RS. A busca por proteínas previamente descritas no plasma (Plasma

Proteome: <http://plasmaproteomedatabase.org>) resultou em 17 proteínas em RI e 18 em RS (Figura 8). Ao final desta análise, foram identificados quatro potenciais marcadores secretados em RI (CR1, KLKB1, FBLN1 e MOB1A) e cinco em RS (PCSK5, RET, PRPH2, CST6 e BCHE) (Tabela 5; Figura 8).

Também foi realizada uma busca nos dados do *Human Cancer Secretome Database* (HCSD) (<http://www.cancersecretome.org/>) sendo identificadas 27 proteínas da lista de RI e todas as 86 da lista de RS. Após sobreposição de todos os bancos de dados foi encontrado apenas uma potencial proteína secretada nos casos RI (FBLN1) e cinco nos RS (PCSK5, RET, PRPH2, CST6 e BCHE).

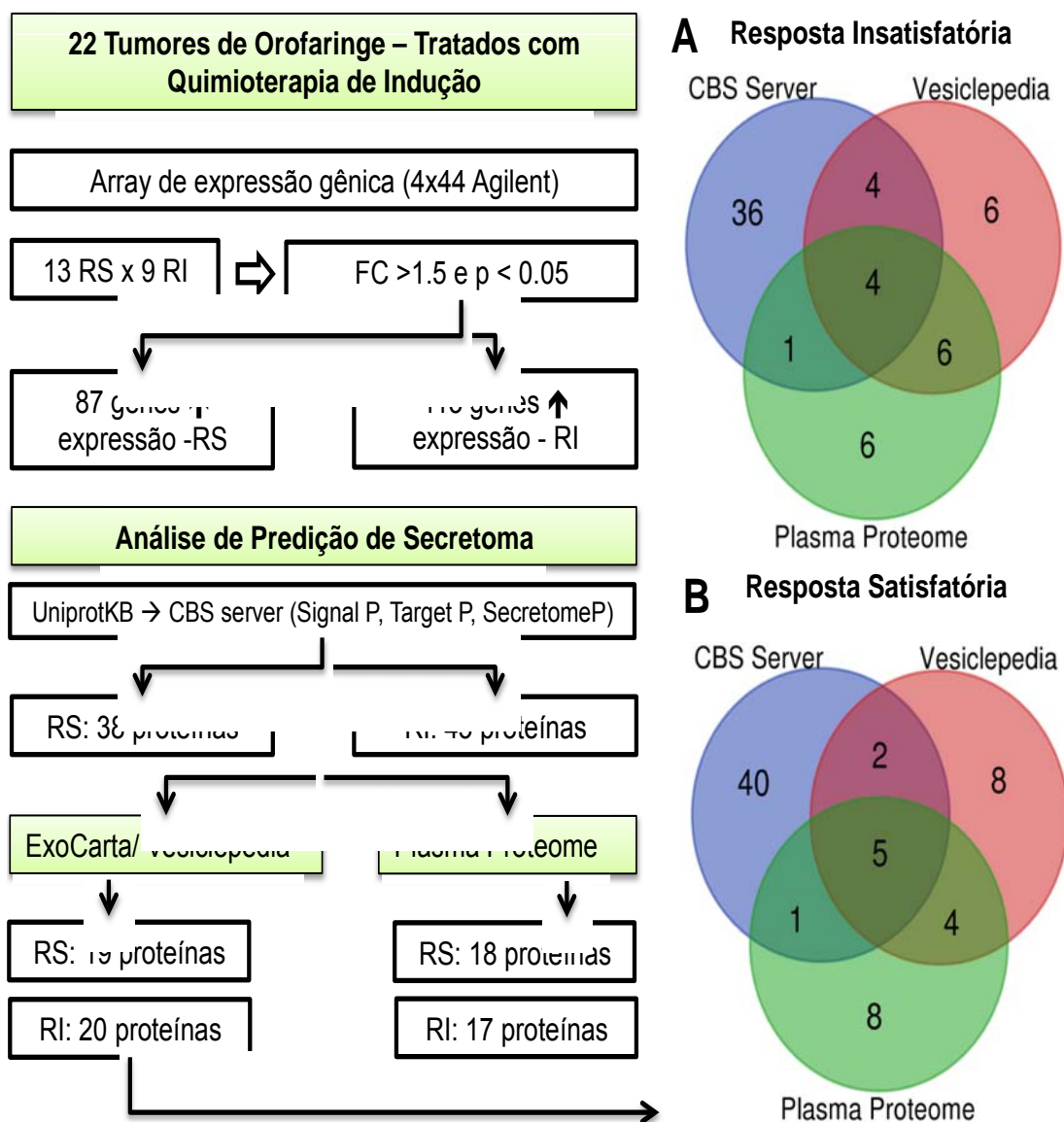


Figura 8 - Análise *in silico* dos transcritos potencialmente secretados. A esquerda, fluxograma representando as etapas da análise de secretoma. Diagrama de Venn representando o número de proteínas potencialmente secretadas (CBS servers) por tumores de orofaringe em (A) pacientes que apresentaram resposta satisfatória (RS) e (B) insatisfatória (RI). Também está representado o conjunto dessas proteínas descritas em bancos de dados de vesículas extracelulares (proteínas ou mRNAs secretadas por VEs de pacientes com câncer em Vesiclepedia ou ExoCarta) e de plasma (Plasma Proteome).

Tabela 5 - Proteínas potencialmente secretadas por tumores de orofaringe de acordo com a resposta ao tratamento neoadjuvante utilizando as ferramentas de predição CBS server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/>), Vesiclepedia/ Exocarta (<http://www.microvesicles.org/> ou <http://www.exocarta.org/>) e Plasma Proteome (<http://plasmaproteomedatabase.org>).

Gene	Nome da Proteína	UniProt	FC	Valor de p
Resposta Insatisfatória a IC				
<i>CR1</i>	Complement receptor type 1 (C3b/C4b receptor) (CD antigen CD35)	P17927	1,64	0,04
<i>KLKB1</i>	Kallikrein B1	P03952	2,00	0,02
<i>FBLN1*</i>	Fibulin-1	P23142	1,52	0,03
<i>MOB1A</i>	MOB kinase activator 1A	Q9H8S9	1,61	0,03
Resposta Satisfatória a IC				
<i>PCSK5*</i>	Proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	Q92824	1,91	0,04
<i>RET*</i>	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase receptor Ret	P07949	1,87	0,02
<i>PRPH2*</i>	Peripherin-2	P23942	2,37	0,02
<i>CST6*</i>	Cystatin-M	Q15828	2,84	0,01
<i>BCHE*</i>	Butyrylcholinesterase	P06276	4,03	0,01

*Proteínas potencialmente secretadas identificadas pelos dados do *Human Cancer Secretome Database* (HCSD) (<http://www.cancersecretome.org/>).

4.3 ANÁLISE DO PERFIL PROTEÔMICO DOS TUMORES

A partir da metodologia descrita para o preparo das amostras, foi possível obter quantidade de material suficiente para realizar a análise proteômica de 20 carcinomas de orofaringe, entre eles, três tumores também foram previamente avaliados por expressão gênica. Após a análise dos peptídeos no espectrômetro de massas, processamento dos dados e mapeamento das proteínas pelo *Human International Protein Database*, foi

obtida uma lista com 2906 proteínas. O número de proteínas identificadas nos grupos e em cada amostra está descrito na Tabela 6.

Para realizar as análises estatísticas, as amostras foram divididas em dois grupos (Grupo 1: 14 casos com resposta satisfatória; Grupo 2: 6 casos com resposta insatisfatória), conforme descrito acima. A análise de espectrometria de massas revelou a presença de 2906 proteínas, destas, foram filtradas 1551 proteínas presentes em 75% dos tumores de orofaringe de cada grupo (grupo 1: 11/14; grupo 2: 5/6). A análise hierárquica não supervisionada destas 1551 proteínas não revelou uma distinção nítida entre os grupos (Figura 9).

Tabela 6 - Número de proteínas identificadas em 20 carcinomas de orofaringe.

<i>Amostras (N=20)</i>	<i>Nº. de proteínas identificadas por MS</i>
CR1	1980
CR2	2205
CR3	2248
CR4	1871
CR5	2191
CR6	2159
CR7	2132
CR8	2247
CR9	2251
CR10	1962
SR01	2112
SR02	1931
SR03	2166
SR06	2207
RP01	2179
RP02	2211
RP03	1712
RP04	2220
RP05	2120
RP07	1514
Total	2906

CR: Resposta Completa; **SR:** sem resposta; **RP:** Resposta parcial a quimioterapia de indução; **MS:** espectrometria de massas.

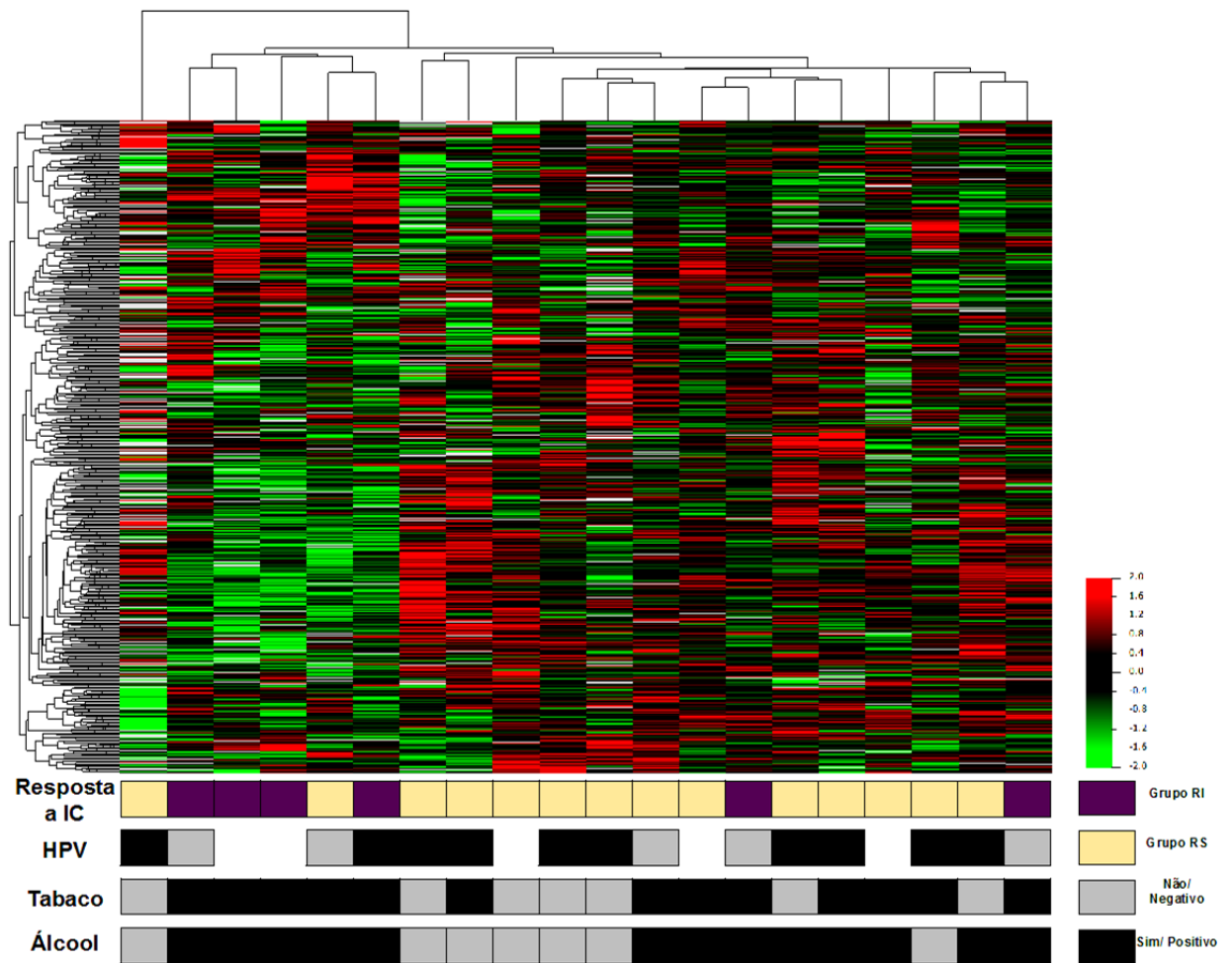


Figura 9 - Análise hierárquica não supervisionada incluindo 1551 proteínas presentes em pelo menos 75% dos tumores de cada grupo. Não foram evidenciados agrupamentos de acordo com a resposta a quimioterapia de indução, status do HPV, tabaco ou consumo de álcool. **Roxo**: casos que apresentaram resposta insatisfatória a IC; **Laranja**: representam os pacientes com resposta satisfatória ao tratamento de indução; **Cinza**: casos HPV negativos, não fumantes ou consumidores de álcool; **Preto**: casos HPV positivos, tabagistas e/ou consumidores de álcool.

4.3.1 Comparação do perfil proteômico entre os grupos de respondedores e não respondedores à quimioterapia de indução

A partir das 1551 proteínas previamente filtradas, foram selecionadas as aquelas diferencialmente expressas entre os grupos 1 (14 casos respondedores) e 2 (6 casos não respondedores) (teste t-Student; $p < 0,05$). Foram observadas 183 proteínas diferencialmente expressas entre os grupos com *fold-change* $\geq 1,5$. Cento e vinte e sete proteínas apresentaram expressão diminuída e 56 expressão aumentada nos pacientes não respondedores em relação ao grupo respondedor (Tabela 7 e Apêndice 3). A figura 10 ilustra o cluster contendo as 183 proteínas diferencialmente expressas entre os grupos. É possível observar dois clusters, um incluindo quatro (4/6) casos que não responderam a quimioterapia de indução e o segundo compreendendo os casos com resposta, exceto pelas amostras RP01 e SR06 (resposta parcial e ausência de resposta, respectivamente).

Tabela 7 - Lista das 40 proteínas com maior diferença de expressão (aumento e diminuição de expressão) entre os tumores de pacientes não respondedores ao tratamento em relação ao grupo respondedor.

Proteína	Fold-change	Valor de p	Proteína	Fold-change	Valor de p
KRT15	-15,63	0,001	C8G	2,40	0,013
KRT19	-6,25	0,001	DSG1	2,40	0,006
DPYSL5	-5,56	0,021	MYH11	2,43	0,029
CDKN2A	-5,00	0,000	C4BPA	2,52	0,017
CALML5	-4,76	0,014	KRT16	2,59	0,016
KRT8	-4,55	0,012	KRT14	2,61	0,009
HIST1H1C	-2,94	0,039	TPBG	2,76	0,015
TACSTD2	-2,94	0,000	FGG	2,87	0,019
MCM5	-2,86	0,001	NAMPT	2,91	0,049
HIST1H1E	-2,63	0,043	FGB	2,93	0,034
UBXN1	-2,56	0,017	PRTN3	2,93	0,031
HADH	-2,44	0,001	DEFA1	3,24	0,033
MCM6	-2,44	0,014	DEFA3	3,24	0,033
PSME2	-2,44	0,016	MIF	3,73	0,002
RPA3	-2,33	0,001	PC	3,78	0,001
HLA-DRB1	-2,27	0,021	LAMA3	3,85	0,010
API5	-2,22	0,000	KRT17	4,13	0,005
H2AFZ	-2,17	0,045	JUP	4,13	0,005
H2AFV	-2,17	0,045	LAMB3	4,35	0,019
MAL2	-2,17	0,018	DMD	4,87	0,013

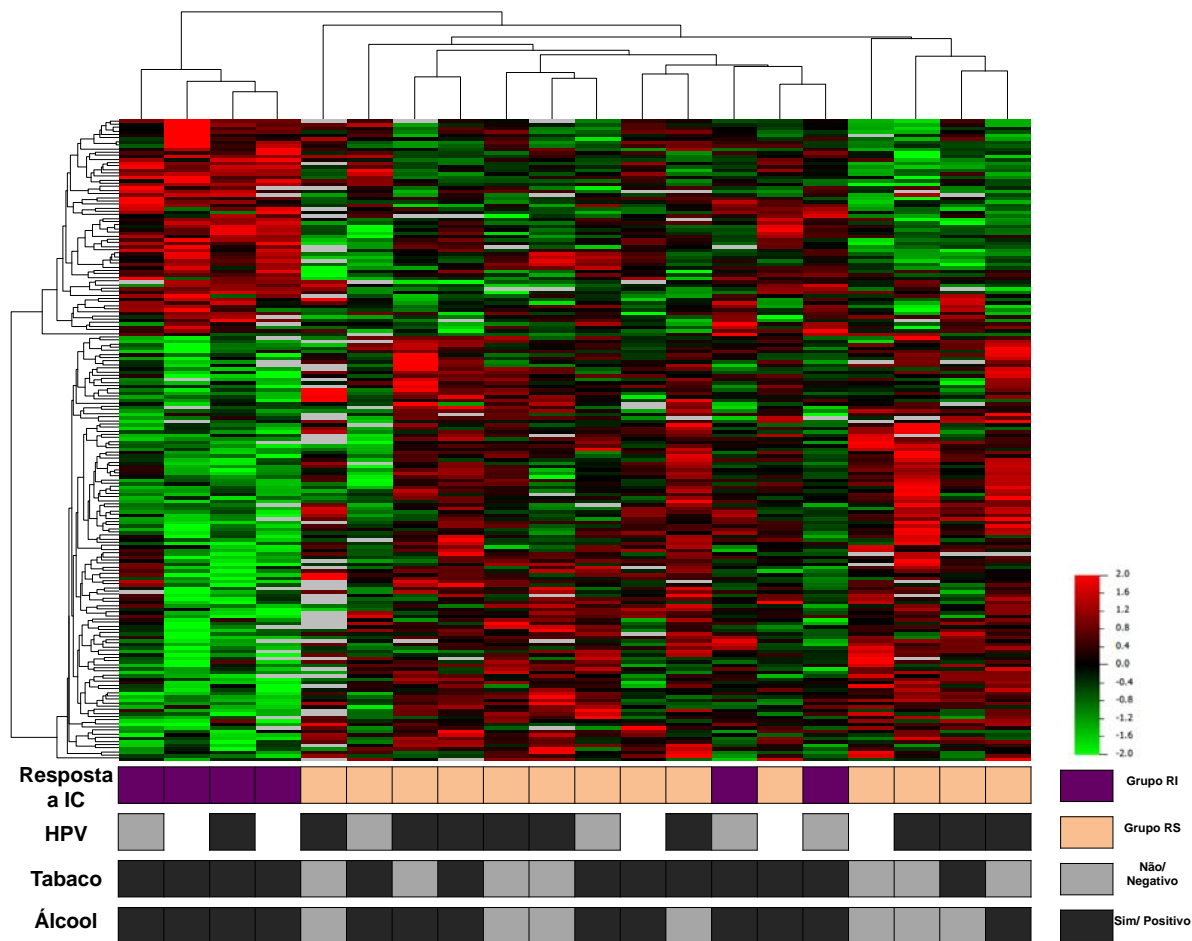


Figura 10 - Clusterização das 183 proteínas diferencialmente expressas entre os grupos 1 e 2, evidenciando uma intersecção com dois agrupamentos: um incluindo todos os casos com resposta, um com resposta parcial ao tratamento (RP01) e outro não respondedor (SR06). O segundo cluster inclui quatro (4/6) casos não respondedores. **Roxo**: casos que apresentaram resposta a IC; **Laranja**: pacientes não responsivos ao tratamento de indução. **Cinza**: casos HPV negativos, não fumantes ou consumidores de álcool; **Preto**: casos HPV positivos, tabagistas e/ou consumidores de álcool.

4.3.2 Análise do potencial preditivo das proteínas diferencialmente expressas

A seleção das proteínas com maior potencial de prever pacientes que apresentaram resposta a IC daqueles que não responderam ao tratamento, foi realizada conforme descritos na seção Métodos. Entre as 20 proteínas com maiores valores de AUCs ($\geq 0,9$), foram selecionados quatro marcadores (CDKN2A, HNRNPA0, MYO1B e TXNL1) não redundantes (Tabela 8). Estas proteínas foram utilizadas para desenvolver um classificador com potencial de predição de resposta a quimioterapia de indução ($\text{HNRNPA0} \times 4,4 + \text{TXNL1} \times 5,9 + \text{MYO1B} \times -3,5 + \text{CDKN2A} \times 2,1$) sendo capaz de classificar corretamente todas as amostras de acordo com a resposta ao tratamento (escores maiores que 176,8 preditos como responsivos) (Tabela 9; Figura 11).

Tabela 8 - Vinte proteínas candidatas a marcadores de resposta a tratamento (maior área abaixo da curva ROC).

Proteína	Valor de p	FDR	Fold-change	AUC
HNRNPA0	0,0018	0,209	-1,79	0,98
PMPCB	0,0036	0,216	-1,92	0,97
TXNL1	0,0055	0,251	-1,52	0,96
MYO1B	0,0006	0,196	2,18	0,94
API5	0,0005	0,196	-2,22	0,94
RPA3	0,0015	0,196	-2,33	0,94
CDKN2A	0,0005	0,196	-5,00	0,93
DDX46	0,0024	0,216	-2,08	0,93
HUWE1	0,0030	0,216	-1,67	0,93
MARS	0,0081	0,285	-1,56	0,92
TACSTD2	0,0005	0,196	-2,94	0,92
ADRM1	0,0158	0,318	-2,00	0,91
SNX5	0,0175	0,318	-1,56	0,91
AK2	0,0031	0,216	-1,89	0,90
ARF1	0,0171	0,318	-1,56	0,90
ARF3	0,0171	0,318	-1,56	0,90
GART	0,0010	0,196	-2,08	0,90
HADH	0,0010	0,196	-2,44	0,90
PSMB10	0,0034	0,216	-2,04	0,90
SAMHD1	0,0057	0,251	-1,69	0,90

Legenda: FDR: False Discovery Ratio; AUC: area under the ROC curve

Tabela 9 - Métricas de desempenho da expressão das proteínas HNRNPA0, TXNL1, MYO1B e CDKN2A em classificar os carcinomas de orofaringe de acordo com a resposta à terapia neoadjuvante.

Métrica	Resposta a IC*	
	Estimativa	95% IC
Sensibilidade	100%	51.7-100%
Especificidade	100%	73.2-100%
VPP	100%	51.7-100%
VPN	100%	73.2-100%

Legenda: VPP= valor preditivo positivo; VPN= valor preditivo negativo.

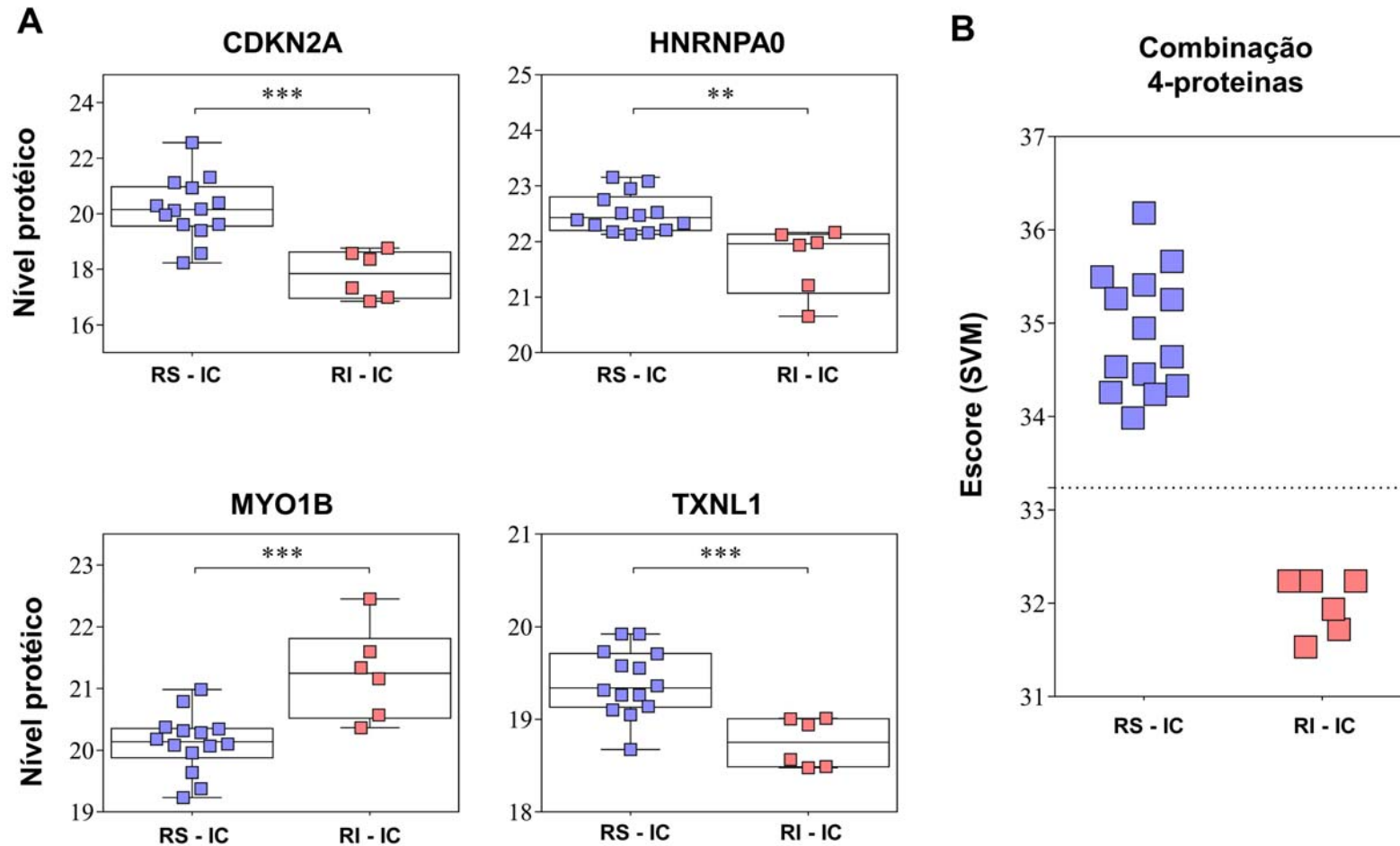


Figura 11 - Modelos de predição de resposta a quimioterapia de indução em tumores de orofaringe baseados nos achados de expressão proteica. **A.** Expressão das proteínas HNRNPA0, TXNL1, MYO1B e CDKN2A de acordo com a resposta a IC. **B.** Gráfico com os valores de expressão relativa de HNRNPA0, TXNL1, MYO1B e CDKN2A. O classificador foi treinado com SVM. RS: resposta satisfatória; RI: resposta insatisfatória IC: quimioterapia de indução; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ (teste t).

4.3.3 Análise das proteínas potencialmente secretadas em câncer de orofaringe de acordo com a resposta ao tratamento neoadjuvante

As proteínas com aumento de expressão (FDR < 5%, FC > 1,5) nos tumores de pacientes com RI (56 proteínas) e nos RS (127 proteínas) foram investigadas quanto ao potencial de serem secretadas. A análise pelo UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) permitiu a exclusão das proteínas que possuem mais de 4000 aminoácidos, aquelas que se alinharam com mais de um ID foram mantidas, resultando em 59 de RI e 144 de RS proteínas.

Utilizando as ferramentas de predição do CBS server (SecretomeP 2.0, SignalP 4.1 e TargetP 1.1) foram obtidas 34 (RI) e 113 (RS) proteínas potencialmente secretadas. Dezesesseis proteínas de tumores não responsivos e 36 de RS foram encontradas em bancos de dados de vesículas extracelulares (VE) provenientes de amostras de pacientes com câncer (Vesiclepedia: <http://www.microvesicles.org/> ou Exocarta: <http://www.exocarta.org/>). Foram encontradas 17 proteínas em RI e 35 em RS previamente descritas em plasma (Plasma Proteome: <http://plasmaproteomedatabase.org>) (Figura 12).

Ao final desta análise, foram identificados oito potenciais marcadores secretados em RI e 19 em RS (Tabela 10; Figura 12).

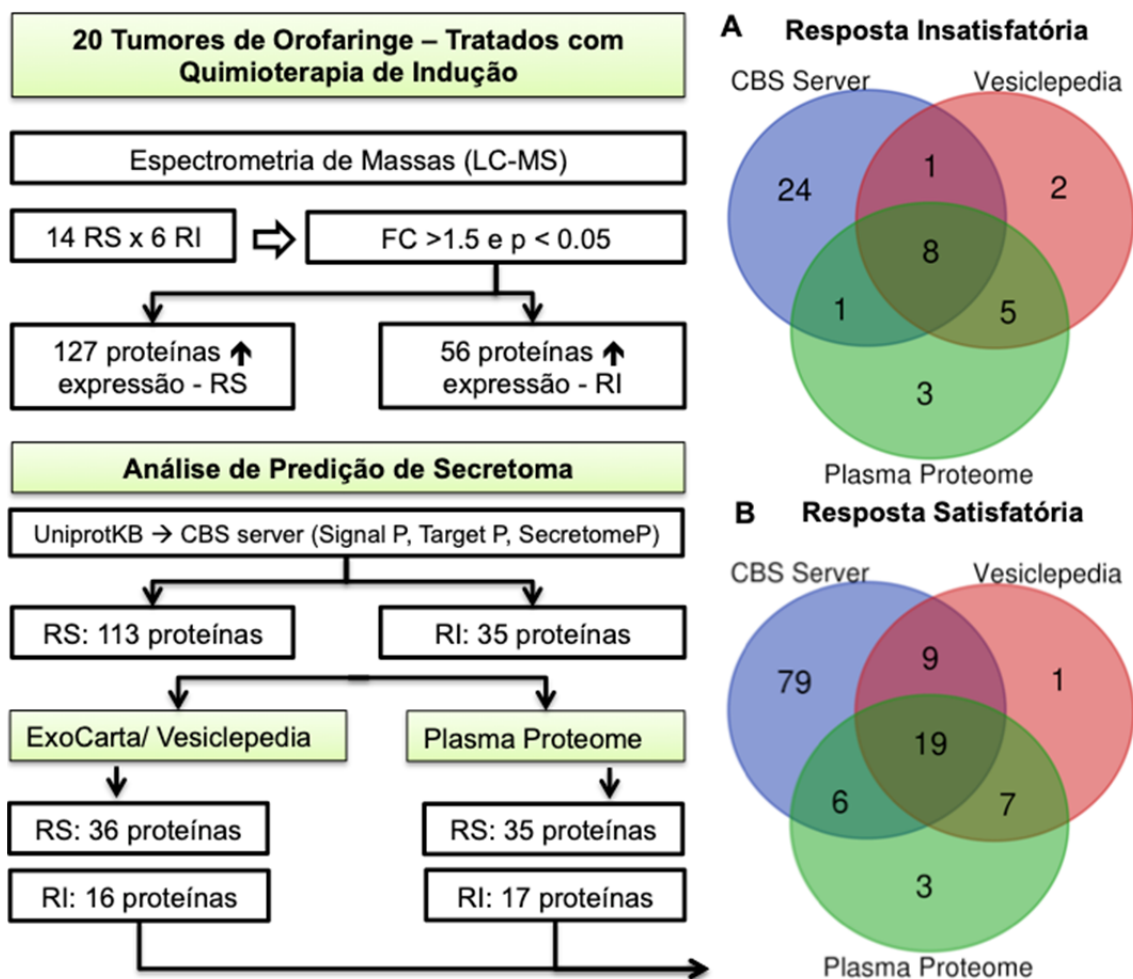


Figura 12 - A esquerda, fluxograma representando as etapas da análise do secretoma. Diagrama de Venn representando o número de proteínas potencialmente secretadas (análise in silico utilizando CBS servers) por tumores de orofaringe nos casos de tumores com resposta satisfatória (RS) **(A)** e **(B)** insatisfatória (RI). Também está representado o conjunto dessas proteínas descritas em bancos de dados de vesículas extracelulares (proteínas secretadas por VEs de pacientes com câncer em Vesiclepedia ou ExoCarta) e de plasma (Plasma Proteome).

Tabela 10 - Proteínas potencialmente secretadas por tumores de orofaringe de acordo com a resposta ao tratamento neoadjuvante utilizando as ferramentas de predição CBS server, Vesiclepedia/ Exocarta e Plasma Proteome.

Proteína	Nome da Proteína	UniProt	FC	Valor de P
<i>Resposta Insatisfatória a IC</i>				
PTK7	Inactive tyrosine-protein kinase 7	Q13308	1,79	0,006
CD44	CD44 antigen	P16070	1,81	0,017
MIF	Macrophage migration inhibitory factor	P14174	1,90	0,038
PRTN3	Myeloblastin	P24158	1,98	0,046
LAMB3	Laminin subunit beta-3	Q13751	2,40	0,006
LAMB1	Laminin subunit beta-1	P07942	2,93	0,031
MMP9	Matrix metalloproteinase-9	P14780	3,73	0,002
DSG1	Desmoglein-1	Q02413	4,35	0,019
<i>Resposta Satisfatória a IC</i>				
CDK1	Cyclin-dependent kinase 1	P06493	2,00	0,002
DDX1	ATP-dependent RNA helicase	Q92499	1,52	0,020
CAND1	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	Q86VP6	1,59	0,012
MOB1A	MOB kinase activator 1A	Q9H8S9	1,75	0,022
PEBP1	Phosphatidylethanolamine-binding protein 1	P30086	1,75	0,020
MCM6	DNA replication licensing factor	Q14566	2,44	0,014
DSG2	Desmoglein-2	Q14126	1,72	0,031
CAPG	Macrophage-capping protein	P40121	2,08	0,003
DHX15	Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase	O43143	1,72	0,022
ARF3	ADP-ribosylation factor 3	P61204	1,56	0,017
XRCC6	X-ray repair cross-complementing protein 6	P12956	1,52	0,020
VPS4B	Vacuolar protein sorting-associated protein 4B	O75351	1,54	0,021
RAB14	Ras-related protein Rab-14	P61106	1,59	0,031
GALK1	Galactokinase	P51570	1,96	0,045
LMNB1	Lamin-B1	P20700	1,52	0,043
ECI1	Enoyl-CoA delta isomerase 1	P42126	1,59	0,045
PDXK	Pyridoxal kinase	O00764	1,85	0,022
ALDH2	Aldehyde dehydrogenase	P05091	1,82	0,014
NUMA1	Nuclear mitotic apparatus protein 1	Q14980	1,82	0,029

Legenda: IC: quimioterapia de indução; FC: fold change;

4.3.4 Proteínas detectadas em apenas um grupo de pacientes

Nesta análise, foram seleccionados apenas os casos com resposta completa (10) e sem resposta ou progressão da doença (4) ao fim do tratamento neoadjuvante, sendo excluídos os casos com resposta parcial (6). A partir da lista completa de proteínas (2906 proteínas), foram filtradas aquelas detectadas em pelo menos 70% das amostras de um grupo e não detectadas no outro, a fim de identificar proteínas possivelmente associadas à resposta ao tratamento. Foram observadas 10 proteínas presentes no grupo com resposta completa e quatro proteínas detectadas apenas nos tumores sem resposta ao tratamento (Tabela 11).

Tabela 11 - Proteínas detectadas nos pacientes com resposta completa (10 casos) ou sem resposta ao tratamento (4 casos).

Proteínas exclusivas no grupo CR	% detecção em CR	% detecção em SR	Proteínas exclusivas no grupo SR	% detecção em CR	% detecção em SR
LRRC31	100%	0%	PADI2	0%	100%
MFI2	90%	0%	PYGL	0%	75%
SELH	90%	0%	BCL2L13	0%	75%
BCKDHA	80%	0%	SERPINE1	0%	75%
SLC25A24	80%	0%			
RAD21	70%	0%			
IRF2BP1	70%	0%			
UBA7	70%	0%			
NUP214	70%	0%			
ACTR1B	70%	0%			

Legenda: CR: resposta completa; SR: sem resposta ou progressão da doença.

4.4 ANÁLISE DE VIAS *IN SILICO*

As proteínas e transcritos diferencialmente expressos foram utilizados para realizar uma análise de vias biológicas e canônicas *in silico* a fim de identificar aquelas associadas com resposta a IC. Apesar de haver sobreposição de apenas um gene/ proteína diferencialmente expressos entre resultados de proteômica e expressão genica, foi possível observar que as principais vias de sinalização alteradas são comuns para ambos os grupos. As principais vias alteradas nos genes e proteínas diferencialmente expressos estão relacionadas ao ciclo celular (Tabela 12).

Tabela 12 - Principais vias canônicas associadas com os genes e proteínas diferencialmente expressos.

Vias Canonicas (KEGG/Reactome)	Transcriptoma		Proteoma	
	P	P-corr	P	P-corr
Cell cycle (KEGG)	<0,001	0,001	<0,001	<0,001
Cell Cycle (Reactome)	<0,001	0,001	<0,001	<0,001
G1/S Transition (Reactome)	<0,001	0,005	<0,001	<0,001
S Phase (Reactome)	<0,001	0,008	<0,001	<0,001
Activation of the pre-replicative complex (Reactome)	<0,001	0,009	<0,001	<0,001
Mitotic G1-G1/S phases (Reactome)	<0,001	0,010	<0,001	<0,001
Cell Cycle, Mitotic (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
DNA Replication Pre-Initiation (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
M/G1 Transition (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
Unwinding of DNA (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
Synthesis of DNA (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
Assembly of the pre-replicative complex (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
DNA strand elongation (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
Orc1 removal from chromatin (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001

Cont/ Tabela 12

Vias Canonicas (KEGG/Reactome)	Transcriptoma		Proteoma	
	P	P-corr	P	P-corr
Switching of origins to a post-replicative state (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
DNA Replication (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
Removal of licensing factors from origins (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
Regulation of DNA replication (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
DNA replication (KEGG)	-	-	<0,001	<0,001
Activation of ATR in response to replication stress (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
Complement and coagulation cascades (KEGG)	-	-	<0,001	<0,001
Regulation of Complement cascade (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
Cell Cycle Checkpoints (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
G2/M Checkpoints (Reactome)	-	-	<0,001	<0,001
Complement cascade (Reactome)	-	-	<0,001	0,001
Apoptotic execution phase (Reactome)	-	-	<0,001	0,002
Apoptosis (Reactome)	-	-	<0,001	0,002
Programmed Cell Death (Reactome)	-	-	<0,001	0,002
Mitotic Anaphase (Reactome)	-	-	<0,001	0,004
Mitotic Metaphase and Anaphase (Reactome)	-	-	<0,001	0,004
Type I hemidesmosome assembly (Reactome)	-	-	<0,001	0,005
M Phase (Reactome)	-	-	<0,001	0,005
Formation of Senescence-Associated Heterochromatin Foci (SAHF) (Reactome)	-	-	<0,001	0,007
Immune System (Reactome)	-	-	<0,001	0,008
Processing of Capped Intron-Containing Pre-mRNA (Reactome)	-	-	<0,001	0,008
Pyruvate metabolism (KEGG)	-	-	<0,001	0,009
mRNA Splicing - Major Pathway (Reactome)	-	-	<0,001	0,010
Metabolism (Reactome)	<0,001	<0,001	-	-
G1/S-Specific Transcription (Reactome)	<0,001	0,002	-	-
Meiosis (Reactome)	<0,001	0,006	-	-
Oocyte meiosis (KEGG)	<0,001	0,007	-	-
Meiotic synapsis (Reactome)	<0,001	0,009	-	-
E2F mediated regulation of DNA replication (Reactome)	<0,001	0,010	-	-

Legenda: P: teste hipergeometrico; P corr: Correcao por Benjamini e Hochberg

5 DISCUSSÃO

Dados epidemiológicos em cânceres de cabeça e pescoço mostram que esses tumores acometem principalmente homens (razão de 2:1) a partir da quinta década de vida (CURADO e HASHIBE 2009; FARSI et al. 2017). Semelhante ao descrito em literatura, a idade média dos pacientes incluídos nesse estudo foi de 52 anos, sendo 97% homens e um paciente do sexo feminino. Estudos avaliando apenas carcinoma de orofaringe relatam maior incidência (aproximadamente 75%) em homens comparado a CCECP geral (ANANTHARAMAN et al. 2018).

O consumo do tabaco e álcool são dois fatores de risco independentes bem estabelecidos no desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço (HASHIBE et al. 2009). Além do risco pelo consumo de cada fator individualmente, um dos estudos epidemiológicos mais robustos descrito por HASHIBE et al. (2009) demonstrou que os efeitos de ambos os fatores são maiores que a soma dos seus efeitos individuais. Em literatura, é relatado que estes comportamentos são responsáveis pela maioria dos casos de carcinomas de cavidade oral (64%), faringe (72%) e laringe (89%) (HASHIBE et al. 2009). Semelhante ao descrito em literatura, a maioria dos pacientes avaliados possui histórico de hábito tabagista (69%, 27/39) e de consumo de álcool (74%, 29/39), sendo que 64% (25/39) dos casos possuem os dois hábitos.

Aproximadamente 70% dos pacientes apresentaram estadiamento clínico avançado (III e IV) e acometimento linfonodal (82%) ao diagnóstico. Um estudo retrospectivo desenvolvido no MD Anderson com uma coorte de 981 pacientes com CCEO também observou que mais de 80% dos pacientes já possuem metástase em linfonodos regionais ao diagnóstico (GUNN et al. 2013).

Na casuística deste estudo, foi verificado que 23 tumores estavam localizados na amígdala (59%) e 15 na base da língua (38%). Dados epidemiológicos indicam que entre os carcinomas de orofaringe, esses são os sítios acometidos com maior frequência (FORASTIERE et al. 2001). Os tumores localizados na amígdala e na base da língua são mais frequentemente acometidos pelo HPV (62%) comparado aos demais sítios da orofaringe (25%) (ANG et al. 2010). Nos tumores da amígdala, o epitélio é infiltrado por linfócitos, tornando assim mais permissivos a partículas virais. Logo, o sistema linfático parece ser um importante fator na patogênese dos carcinomas HPV positivos (LEEMANS et al. 2018). Entre os tumores avaliados no nosso estudo, 47% e 70% dos tumores localizados na amígdala e base língua, respectivamente, eram HPV positivos.

De modo geral a incidência do HPV em CCEO varia entre 60-87%, enquanto tumores de outras localizações anatômicas da cabeça e pescoço tem uma prevalência de apenas 6% (Cancer Genome Atlas Network 2015; LUCAS-ROXBURGH et al. 2017). Nesse estudo também foi observado alta positividade para HPV (expressão da proteína p16) em CCEO (56%). Atualmente, é bem estabelecido que CCEO HPV positivos e negativos são

duas entidades clínico-patológicas distintas, apresentando prognóstico e perfil molecular distintos (LEEMANS et al. 2018). Os CCECP HPV positivos apresentam sobrevida significativamente maior do que pacientes com tumores HPV negativos (ANG et al. 2010; BARROS-FILHO et al. 2018). Em concordância com os dados da literatura, foi possível observar diferença significativa na sobrevida global em 5 anos em relação ao status do HPV, sendo aproximadamente 90% nos casos HPV positivos versus ~30% nos HPV negativos ($P < 0,001$). Também foi possível verificar que a positividade do HPV está associado a maior sobrevida global de acordo com a resposta a terapia de indução. Principalmente no grupo de pacientes com resposta insatisfatória a IC, a sobrevida global nos pacientes HPV positivos foi de 100% em 5 anos, enquanto para o grupo HPV negativo a sobrevida foi de apenas 25 meses. Apesar do HPV ser um bom marcador prognóstico independente, ele não é um marcador específico de resposta a IC (BARROS-FILHO et al. 2018; HAY e NIXON 2018).

O uso da quimioterapia de indução no tratamento do câncer de cabeça e pescoço tem sido cada vez mais utilizado visando a preservação do órgão e melhora na sobrevida. Além desses benefícios, a resposta a IC também auxilia na identificação dos pacientes que possuem maior chance de responder a radio-quimioterapia subsequente (HASEGAWA et al. 2018). Em nosso estudo, 15 pacientes apresentaram resposta completa a IC (38%), todos foram submetidos a tratamento definitivo com radio-quimioterapia e apresentaram resposta completa ao fim do tratamento. Entre os 12 pacientes que não responderam a IC (31%) (doença estável ou progressão)

apenas um apresentou resposta completa ao final deste tratamento. Desta maneira, a resposta a IC pode auxiliar nas decisões da terapia definitiva. Os pacientes que tiveram resposta completa ou parcial a IC também apresentaram sobrevida global significativamente maior em relação aos não respondedores (86% e 75% vs 41%, respectivamente). Hasewaga et al. (2018) avaliaram a sobrevida em 5 anos de 64 pacientes com CCECP tratados com IC (30 CCEO) e observaram um aumento significativo na sobrevida global e livre de doença nos pacientes com resposta completa a IC (HASEGAWA et al. 2018). Em nosso estudo não foi observada associação com a sobrevida livre de doença, possivelmente devido ao número limitado de amostras.

A resistência a quimioterapia é um fator crítico para eficácia dos tratamentos quimioterápicos. A identificação de marcadores de predição de resposta a quimioterápicos é uma ferramenta importante na definição de tratamentos personalizados. Desta maneira, nosso estudo busca desenvolver um painel de marcadores capaz de predizer os tumores que terão benefício no emprego de quimioterapia de indução. Para isso, foi investigada a associação entre o perfil de expressão gênica e proteica e a resposta a IC.

A partir de um estudo prévio do grupo, selecionamos 22 pacientes que foram tratados com quimioterapia de indução e reanalisamos os dados de expressão gênica global (BARROS-FILHOS et al. 2018). A comparação entre o perfil de expressão de acordo com a resposta a IC revelou 200 genes com diferença de expressão entre os tumores não respondedores e

os respondedores, sendo 87 genes com expressão diminuída ($FC < -1,5$) e 113 genes com aumento de expressão ($FC > 1,5$). A partir deste grupo de genes diferencialmente expressos, foram selecionados aqueles não redundantes e com maiores valores de AUC. Esta lista de genes foi utilizada para construir um classificador com potencial de predição de resposta a quimioterapia de indução utilizando o modelo de predição SVM. Esse algoritmo foi capaz de predizer 100% dos tumores que responderam ao tratamento. Os transcritos utilizados neste classificador foram *GPSM2*, *CPNE2*, *FOXRED2*, *BCHE* e *KLKB1*.

Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo descrito com 100% de sensibilidade e especificidade para predizer resposta a quimioterapia de indução em carcinomas de orofaringe, porém esse bom desempenho do classificador precisa ser validado em um número maior de casos. A maioria dos estudos que utilizaram dados de expressão gênica para identificar marcadores de resposta a IC em CCECP avaliaram marcadores independentes (FENG et al. 2011; CHATZKEL et al. 2017; TANG et al. 2018; HASEGAWA et al. 2018). Embora estes estudos revelassem uma associação entre a resposta ao tratamento, não havia força estatística suficiente para estratificar os grupos em RS ou RI. Para o nosso conhecimento, apenas dois estudos do mesmo grupo de autores buscaram identificar marcadores de resposta a IC em CCECP por análise de transcritos (LIAN et al. 2017a, b). Nesses relatos não foram identificados marcadores de resposta, apenas as vias e processos biológicos associados aos genes diferencialmente expressos (LIAN et al. 2017a, b).

O trabalho prévio do nosso grupo que deu origem aos dados de expressão gênica utilizados neste estudo, revelou uma associação entre a expressão do gene *SHANK2* e resposta parcial ao tratamento. Além disso, usando a integração dos dados de expressão de transcritos com o perfil de alteração no número de cópias (CNA), foi possível identificar potenciais genes *drivers* mapeados em 11q13, os quais estão associados a pior prognóstico e resposta a tratamento (BARROS-FILHO et al. 2018). Porém, diferentemente da análise do presente estudo, os marcadores de resposta a terapia não são específicos para IC, uma vez que as modalidades terapêuticas empregadas foram quimioterapia e radioterapia concomitante (34%), quimioterapia neoadjuvante seguido de CCR (28%), cetuximabe e radioterapia (18%) em 33 pacientes com CCEO (BARROS-FILHO et al. 2018).

Um recente estudo avaliou a correlação entre o perfil de expressão de 21 genes e a resposta a quimioterapia de indução com 5-fluorouracil e cisplatina em 64 pacientes com tumores de cabeça e pescoço, sendo 30 com câncer de orofaringe e 34 com câncer de hipofaringe (HASEGAWA et al. 2018). Foi observada uma correlação significativa entre a resposta a terapia e a expressão dos genes *DPD*, *ERCC1*, *XPA*, *TP53*, *BCL2*, *VEGF* e *MDR1*. A análise multivariada revelou o gene *ERCC1* como marcador significativo de predição de resposta a IC, indicando que as vias de reparo do DNA e apoptose podem ser importantes mecanismos envolvidos na resposta a quimioterapia (HASEGAWA et al. 2018). Esse transcrito não foi identificado nas análises do nosso estudo. Apesar desse marcador ser

estatisticamente associado com a resposta a IC, há a necessidade de análises mais robustas ou validação em um grupo maior de pacientes.

Com o objetivo de avaliar o potencial do modelo de predição de resposta baseado em transcritos, buscamos bancos de dados externos, (incluindo o GEO e TCGA) que incluíssem pacientes com CCEO tratados com IC. Infelizmente, estes dados não estavam disponíveis. Sendo assim, aplicamos o classificador nos dados de expressão gênica do TCGA para avaliar o potencial prognóstico desses marcadores. Apesar do tratamento inicial da maioria dos pacientes avaliados no TCGA ter sido cirúrgico, o algoritmo demonstrou bom desempenho para ser aplicado como marcador prognóstico independente do tratamento com uma associação significativa ($P < 0,01$) com sobrevida global e livre de doença.

As funções dos transcritos utilizados neste classificador (*GPSM2*, *CPNE2*, *FOXRED2*, *BCHE* e *KLKB1*) e os mecanismos envolvidos na resposta a terapia são pouco conhecidos em literatura. Até o momento, o gene *GPSM2* não foi associado ao câncer de cabeça e pescoço. Mutações em ambos alelos no gene *GPSM2* (G protein signaling modulator 2) foram associadas a síndrome de Chudley-McCullough (DOHERTY et al. 2012). Esse gene é essencial para a manutenção da polaridade e orientação do fuso celular, os quais são mecanismos cruciais o desenvolvimento dos tecidos (YASUMI et al. 2005). *GPSM2* já foi descrito como associado ao câncer de mama, hepatocelular e renal (FUKUKAWA et al. 2010; LIU et al. 2015; HE et al. 2017). Utilizando experimentos in vitro para modular a expressão de *GPSM2* em linhagens celulares de carcinoma hepatocelular,

HE et al. (2017) relataram sua ação na expressão de proteínas centrais envolvidas na ativação de quinases. O aumento de expressão desse gene foi associado ao crescimento celular e potencial metastático do carcinoma hepatocelular por meio da ativação da via de sinalização PI3K/AKT (HE et al. 2017). Semelhante ao descrito em literatura, neste estudo o aumento de expressão de *GPSM2* foi associado com pior prognóstico, sendo detectado nos tumores que não apresentaram resposta satisfatória a IC. Estes resultados sugerem que, assim como em outros tumores, o gene *GPSM2* pode desempenhar um importante papel na agressividade dos tumores de orofaringe.

O gene *CPNE2* utilizado no classificador apresentou aumento de expressão nos tumores que não respondem a quimioterapia de indução, estando associado a pior prognóstico. O copine-2 (*CPNE2*) pertencente à família de proteínas Copine e sua função parece estar associada a regulação de eventos moleculares na interface da membrana celular e citoplasma (PERESTENKO et al. 2015). Para o nosso conhecimento e até o momento esse gene não foi associado a nenhum tipo de câncer. A falta de informações sobre sua função demonstra a necessidade de melhor explorá-lo para entender os mecanismos relacionados com a resposta a quimioterapia em CCECP.

Outro gene utilizado no classificador pouco descrito em literatura é o *FOXRED2* (FAD - dependent oxidoreductase domain containing 2) (HUNTER et al. 2014; NAGY et al. 2017). HUNTER et al. (2014) avaliaram a expressão de *FOXRED2* em 23 linhagens tumorais e descreveram aumento

de sua expressão em diversos tipos tumorais, como carcinoma de células não pequenas de pulmão, câncer colorretal e mama. Os autores demonstraram que o *FOXRED2* participa das vias de ativação de resposta a drogas ativadas por hipóxia (HAP, do inglês, *hypoxia-activated prodrugs*) em tumores humanos, sendo capaz de ativar essa resposta enzimaticamente (HUNTER et al. 2014). No nosso estudo foi observado aumento de expressão desse gene nos tumores de que não responderam a IC, sugerindo que ele pode desempenhar um papel contrário na metabolização de agentes quimioterápicos do que o observado em HAP. Além disso, esses resultados podem levantar a hipótese de que esses pacientes apresentariam benefícios maiores com o emprego de drogas tipo HAP ao invés de quimioterápicos. NAGY et al. (2017) avaliaram a expressão gênica global de carcinoma de células não pequenas de pulmão a fim de estabelecer uma assinatura genica de acordo com a mutação em *KRAS*. Contrário aos nossos achados, os autores descreveram uma assinatura com cinco genes, entre eles *FOXRED2*, a qual foi associada a maior sobrevida em pacientes que apresentavam aumento de expressão.

O aumento de expressão do gene *KLKB1* foi descrita em carcinoma de nasofaringe, câncer de pulmão e leucemia, sendo também investigado no contexto de biópsias líquidas (HEO et al. 2007; PENG et al. 2011; ADAMOPOULOS et al. 2015). PENG et al. (2011) avaliaram o plasma de pacientes com carcinoma de nasofaringe por espectrometria de massas e observaram aumento de expressão das proteínas *KLKB1* e *TAT* por *western blot* nos pacientes em relação aos controles. Outro estudo realizado por

ADAMOPOULOS et al. (2015) também evidenciou o potencial do *KLKB1* como biomarcador. Os autores avaliaram os níveis de expressão do transcrito *KLKB1* no sangue de pacientes diagnosticados com leucemia linfocítica crônica e controles saudáveis sendo detectado um aumento significativo dos níveis desse transcrito nos casos em relação aos controles (ADAMOPOULOS et al. 2015). No presente estudo, observamos aumento de expressão de *KLKB1* nos pacientes com resposta insatisfatória ao tratamento, estando associado a pior prognóstico. Apesar da função da proteína não ter sido explorada em tumores de orofaringe, esse gene é um potencial marcador nesses tumores. Em adição, também verificamos o potencial do *KLKB1* ser secretado no meio extracelular quando realizada a análise de secretoma *in silico*. Verificamos que em todos os bancos de dados utilizados o *KLKB1* apresenta-se secretado. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que *KLKB1* é um candidato importante para predição de resposta a IC e tem potencial para ser utilizado como marcador de resposta ao tratamento em biópsias líquidas.

No presente estudo, foi observado aumento de expressão de *BCHE* em tumores responsivos a quimioterapia de indução e conseqüentemente com melhor prognóstico. Semelhante aos nossos achados, NORO et al. (2018) descreveram o aumento da expressão da proteína BCHE no soro de pacientes com carcinoma do trato urinário, o qual foi significativamente associado a maior sobrevida global e livre de doença. Um dos únicos estudos descritos em literatura que investigou BCHE em CCECP, avaliou a expressão e o nível da atividade proteica de BCHE em 57 CCECP e o tecido

adjacente (50 de laringe e sete em outras topografias) pelas técnicas de RT-qPCR e *western-blot*. Entretanto, em discordância aos nossos achados, os autores descreveram que o aumento da atividade dessa proteína estava associado a menor sobrevida global (CASTILLO-GONZÁLEZ et al. 2015). O gene *BCHE* codifica uma enzima colinesterase membro da família de proteínas carboxilesterase/ lipase tipo B, a qual possui ampla especificidade de substrato e está envolvida na desintoxicação de venenos, pesticidas e no metabolismo de drogas incluindo aspirina (BOYKO et al. 2019). O mecanismo de ação do *BCHE* associado com resistência a drogas no câncer não foi amplamente investigado em literatura. Nós relatamos o aumento da expressão deste gene associado a melhor resposta a IC; porém, o mecanismo de interação precisa ser melhor estudado. Semelhante aos nossos achados, GAO et al. (2017) relataram uma potencial relação entre a expressão de *BCHE* e resposta a tratamento incluindo o uso de platina em câncer de ovário. Utilizando dados públicos e posterior validação por RT-qPCR em linhagens celulares, os autores relataram que a diminuição da expressão de *BCHE* estava associada a resistência a cisplatina e carboplatina.

Nossos resultados sugerem que *BCHE* se mostrou um importante marcador de resposta a IC em tumores de orofaringe, uma vez que além de ser um dos componentes do classificador de predição de resposta, esse gene também foi observado como uma das proteínas com potencial de ser secretada em fluídos corporais, como plasma e saliva. Em nosso estudo, esta proteína foi um dos marcadores identificados na análise de secretoma

(PCSK5, RET, PRPH2, CST6 e BCHE). PRABHU et al. (2011) avaliaram a expressão da proteína BCHE no plasma de 39 pacientes com câncer oral e 20 controles utilizando ensaios de medição por espectrofotometria. Além de um aumento significativo no nível de BCHE no sangue de pacientes, os autores também descreveram uma correlação entre o aumento do nível desta proteína no plasma e estágios mais avançados da doença (PRABHU et al. 2011).

Os genes diferencialmente expressos entre os tumores com RS e RI foram utilizados para identificar proteínas potencialmente secretadas por carcinomas de orofaringe, de acordo com a resposta a IC. As moléculas secretadas pelas células tumorais são potenciais biomarcadores em plasma/soro ou fezes e estão envolvidas em importantes processos biológicos, como defesa imune, remodelamento da matriz e sinalização celular (SCHAAIJ-VISSER et al. 2013). A análise de predição *in silico* resultou em 45 proteínas potencialmente secretadas por CCEO obtidas a partir de 109 genes que apresentaram expressão aumentada em RI e 38 proteínas a partir de 86 genes em RS. A busca pelas proteínas ou mRNA em banco de dados de vesículas extracelulares e plasma provenientes de amostras de pacientes com câncer resultou em 17 e 18 moléculas em casos com RI e RS, respectivamente. A análise realizada em nosso estudo revelou quatro potenciais marcadores para RI (CR1, KLKB1, FBLN1 e MOB1A) e cinco em RS (PCSK5, RET, PRPH2, CST6 e BCHE).

Os marcadores com aumento de expressão nos pacientes que não responderam a quimioterapia de indução potencialmente secretados (CR1,

KLKB1, FBLN1 e MOB1A) poderiam auxiliar na conduta clínica e decisões terapêuticas. Para isso, são necessários estudos de validação em biópsias líquidas de pacientes com CCEO. Até o momento nenhum deles foi associado a resposta à quimioterapia, entretanto, *FBLN1* já foi relatado em câncer coloretal e hepatocelular como potencial marcador presente em biópsias líquidas (HOLMILA et al. 2017; WATANY et al. 2018). WATANY et al. (2018) demonstraram que a quantificação dos níveis proteicos de FBLN1 presentes no soro é capaz de diferenciar os pacientes com câncer colorretal daqueles com pólipos benignos com 91,8% de sensibilidade e 100% de especificidade (WATANY et al. 2018). Em adição, o CR1 também já foi avaliado no sangue de pacientes com carcinoma de nasofaringe (HE et al. 2012). HE et al. (2012) avaliaram a expressão de *CR1* nas células do sangue periférico de 145 pacientes com carcinoma de nasofaringe e 110 controles por RT-qPCR. Os autores detectaram um pequeno aumento, porém significativo, nos níveis de expressão desse gene em pacientes em relação aos controles. Esse marcador também foi associado com pior sobrevida global (HE et al. 2012). Polimorfismos neste gene CR1 (complement receptor 1) já foram associados ao câncer gástrico e de não pequenas células de pulmão, porém até o momento não foi associado com resposta a tratamento (YU et al. 2014; ZHAO et al. 2015).

Para nosso conhecimento, apesar do MOB1A desempenhar um importante papel no desenvolvimento tumoral, ele ainda não foi investigado em literatura no contexto de biópsias líquidas. As funções desse gene serão discutidas detalhadamente mais adiante (HERGOVICH et al. 2011).

Conforme discutido previamente, o KLKB1 também já relatado em literatura como potencial marcador de biópsia líquida em nasofaringe e leucemia (PENG et al. 2011; ADAMOPOULOS et al. 2015). Em resumo, apesar dos mecanismos desses marcadores não terem sido investigados no conceito de resposta a quimioterapia, eles são potenciais biomarcadores e devem ser explorados no contexto de biópsias líquidas.

Dentre os cinco marcadores com aumento de expressão em tumores respondedores a IC (PCSK5, RET, PRPH2, CST6 e BCHE), o *BCHE* foi associado a resistência a um dos agentes quimioterápicos administrados em IC. Semelhante ao observado neste estudo, foi relatada que a diminuição da sua expressão está associada a resistência à cisplatina e carboplatina (GAO et al. 2017). Estes achados sugerem que o aumento de expressão dessa proteína no plasma de pacientes com CCEO poderia ser um bom marcador de boa resposta a IC. Além do *BCHE*, a desregulação de expressão do *RET* também já foi associada a resposta a terapia, porém ele está envolvido nas vias de ação de terapias monoclonais do EGFR (LIN et al. 2016). O proto-oncogene RET tem sido vastamente estudado em diversos tipos de câncer, inclusive tumores de cabeça e pescoço, em especial o câncer de tireoide (ERNANI et al. 2016; GRÜLLICH 2018). Em linhagens celulares de câncer de cabeça e pescoço, LIN et al. (2016) demonstraram que o silenciamento de RET in vivo e in vitro inibe a proliferação e invasão celulares. Em adição, a inibição de RET promove a redução da fosforilação de EGFR e ativação da via de sinalização downstream a ele. Deste modo, os autores demonstraram que a inibição da sinalização deste gene aumenta

significativamente a sensibilidade de células tumorais de CP ao tratamento com inibidores de EGFR (erlotinib) (LIN et al. 2016).

O PRPH2 (peripherin 2), um dos cinco potenciais marcadores de biópsia líquida, ainda não foi associado com câncer. Ele codifica uma proteína membro da família de transmembranas. A maioria das proteínas dessa família mediam sinais de transdução nas células, participando de diversos processos de regulação do desenvolvimento celular, ativação e crescimento (MCLEAN e ROBERTSON 2011). Outros membros dessa família de proteínas já foram associados com neuroblastoma (MCLEAN e ROBERTSON 2011).

Para nosso conhecimento, o único estudo que avaliou o papel da CST6 (cystatin M) em câncer de orofaringe foi desenvolvido por VIGNESWARAN et al. em 2003. Os autores relataram um nível de expressão de CST6 40 vezes maior na metástase de CCEO comparado ao tumor primário (VIGNESWARAN et al. 2003). Outro estudo desenvolvido pelo mesmo grupo, relatou que o silenciamento de CST6 in vivo em células de câncer oral promoveram maior potencial de invasão e motilidade pelas vias dependentes de cisteína e proteinases (VIGNESWARAN et al. 2006). Atualmente, é descrito em literatura que o CST6 é um supressor de metástases e a perda da sua expressão está associada a progressão do tumor primário para metástase (JOHNSTONE et al. 2018).

Para nosso conhecimento *PCSK5* não foi avaliado em fluidos corporais de pacientes com câncer, porém já foi relatada associação com alguns tipos de câncer, como diminuição de expressão em câncer de

pulmão e mutações em câncer de mama, melanoma e corretal (DEMIDYUK et al. 2013; BAJIKAR et al. 2017). Em linhagens agressivas de câncer de mama, o PCSK5 ectópico inibiu o potencial de invasão das células e reduziu a taxa de metástases no pulmão de ratos (BAJIKAR et al. 2017). A atividade de supressor tumoral desta proteína relatado em outros tipos de tumores, pode também ser aplicado para os CCEO, já que os casos com melhor prognóstico apresentaram aumento de sua expressão.

Considerando as evidências da literatura e os achados deste estudo, torna-se evidente a necessidade de desenvolver estudos futuros avaliando a potencial aplicabilidade clínica desses marcadores em fluídos corporais de pacientes com CCEO. O uso desta estratégia não invasiva poderia auxiliar na estratificação dos pacientes com maior potencial de resposta ao tratamento e nas decisões terapêuticas.

As mesmas etapas de análises aplicadas aos dados de expressão gênica, foram utilizados para construção do modelo preditor de resposta de quimioterapia de indução com os dados de espectrometria de massas. A partir das proteínas diferencialmente expressas entre os tumores com resposta satisfatória e não satisfatória a IC, foi possível desenvolver um classificador capaz de prever 100% dos tumores que responderam ao tratamento utilizando quatro proteínas, HNRNPA0, TXNL1, MYO1B e CDKN2A.

O gene *CDKN2A* codifica a proteína p16-INK4a que desempenha um papel crítico na progressão do ciclo celular, diferenciação, senescência e apoptose. Mutações ou desregulação da sua atividade funcional são

frequentemente associados a diversos tipos de cânceres (JIAO et al. 2018; LEEMANS et al. 2018). Atualmente, é amplamente estabelecido que o aumento da expressão da proteína p16 em tumores de orofaringe está associado a um perfil tumoral específico. Diversos estudos já descreveram uma associação entre a presença do HPV e melhor resposta a terapias em CCEO, incluindo quimioterapia de indução, assim como melhor prognóstico e maior sobrevida global (SAITO et al. 2016; PSYRRI et al. 2017; BARROS-FILHO et al. 2018; LEE et al. 2018). Além da alteração da expressão do p16 devido a infecção pelo HPV, a perda no número de cópias do gene *CDKN2A*, também foi descrito como um fator independente de predição de pior sobrevida em tumores de cabeça e pescoço (CHEN et al. 2018). Em concordância com o estabelecido em literatura, o *CDKN2A* apresentou aumento de expressão nos tumores que responderam satisfatoriamente a IC e apresentaram melhor prognóstico. Essa proteína desempenha um papel importante no modelo de predição de resposta desenvolvido neste estudo, pois além dele ter um alto potencial prognóstico independente, em conjunto com as outras três proteínas aumenta o poder preditivo do algoritmo. Além disso, a caracterização da expressão do p16 já é estabelecido na rotina clínica de estadiamento dos tumores de orofaringe, o que facilita a implementação de outros marcadores para análise.

A proteína HNRNPA0 presente no classificador apresentou aumento de expressão nos tumores com resposta satisfatória a IC. Essa proteína pertence a subfamília A/B de ribonucleoproteínas nucleares heterogeneamente expressas (hnRNPs). Os hnRNPs são moléculas que se

ligam ao RNA formando um complexo nuclear, e parecem estar envolvidas no processamento de pré-mRNA no núcleo assim como em outros aspectos do metabolismo e transporte dos mRNAs (YOUNG et al. 2014). WEI et al. (2015) avaliaram uma família com histórico de suscetibilidade para vários tipos de cânceres, sendo identificadas mutações no *HNRNPA0* e *WIF1*, os quais foram associadas a alto risco de predisposição ao câncer (WEI et al. 2015). Além disso, análises dos alvos *downstream* às mutações nesse gene demonstraram que o *HNRNPA0* altera os padrões de expressão das vias de sinalização de PI3 kinase e ERK/MAPK (WEI et al. 2015). CANNELL et al. (2015) desenvolveram um estudo de grande impacto no entendimento dos mecanismos de ação do *HNRNPA0* envolvidos na resistência a cisplatina. Os autores demonstraram que a proteína de ligação ao RNA hnRNPA0 é o “sucessor” do p53 (em tumores com mutações em *TP53*) no controle de *checkpoints* do ciclo celular. Atuando como o p53, o hnRNPA0 é ativado pelo *checkpoint kinase* (MK2) sendo capaz de controlar o ciclo celular por meio de diversos mRNAs alvos distintos. A ativação dessa via de sinalização leva a resistência a cisplatina em câncer de pulmão (CANNELL et al. 2015). Além disso, os autores também avaliaram uma pequena coorte de paciente com câncer de pulmão e relataram que pacientes com expressão diminuída de hnRNPA0 apresentaram benefício clínico em receber quimioterapia adjuvante, enquanto aqueles com aumento de expressão não foram beneficiados (CANNELL et al. 2015). Apesar desses dados demonstrarem a importância desse gene no mecanismo de resistência a cisplatina, para nosso conhecimento, não há estudo disponível em literatura explorando

essas vias em tumores de cabeça e pescoço. Nossos dados mostram resultados contraditórios ao observado no estudo de CANNELL et al. (2015), uma vez que observamos aumento de expressão da proteína HNRNPA0 em pacientes com boa resposta a quimioterapia. Esses achados evidenciam a necessidade de melhor explorar os mecanismos de ação desta proteína em tumores de orofaringe.

Neste estudo, observamos aumento de expressão da proteína MYO1B em CCEO com pior prognóstico e não responsivos a quimioterapia de indução. Semelhante aos nossos resultados, o aumento da expressão de *MYO1B* está fortemente associado a pior prognóstico em CCECP (YAMADA et al. 2018). Essa proteína pertence a uma família de miosinas associadas a membrana (class I) e atuam como um *link* entre as membranas e actinas do citoesqueleto em diversos processos celulares (YAMADA et al. 2014). Um estudo *in vivo* e *in vitro* demonstrou que o silenciamento de *MYO1B* inibe significativamente a capacidade migratória e invasiva de células tumorais de CCECP por meio da regulação de vias de sinalização de ativação mitótica (SHIMIZU et al. 2012). A expressão de MYO1B foi significativamente associada a metástases linfonodais em CCECP e o silenciamento dessa proteína em modelos animais inibe metástases linfonodais (OHMURA et al. 2015). Apesar da associação com agressividade tumoral dessa proteína ter sido bastante investigada em CCECP, não temos conhecimento de estudos que avaliaram seu papel na resposta ao tratamento desses tumores. Entretanto, um estudo em adenocarcinoma de reto descreveu uma associação de *MYO1B* e resposta a terapia (MILLINO et al. 2017). Utilizando

dados de expressão gênica, os autores desenvolveram um painel composto por oito transcritos (incluindo MYO1B) para prever resposta a CRT pré-operatória com 85,7% de acurácia, 90% de sensibilidade e 82% de especificidade (MILLINO et al. 2017).

A associação entre TXLN1 com resistência a cisplatina foi investigada em tumores gástricos (XU et al. 2014; NI et al. 2015). Usando ensaios *in vivo* com linhagens celulares de tumor gástrico, XU et al. (2014) descreveram que o TXLN1 regula negativamente XRCC1 (proteína com papel central na regulação da apoptose e danos ao DNA induzidos por cisplatina) pela via de ubiquitina-protease. Em um segundo estudo relatou que a expressão de *TXLN1* é significativamente menor nas linhagens celulares resistentes a cisplatina comparado as sensíveis (NI et al. 2015). Os autores também mostraram que a inibição desse gene resultou em maior taxa de resistência a cisplatina. Em nosso estudo, os CCEO que responderam ao tratamento de indução também apresentaram aumento de expressão.

Utilizando as proteínas diferencialmente expressas entre os tumores respondedores e não respondedores, foi realizada uma análise *in silico* para identificar as proteínas que apresentavam potencial de serem secretadas no meio extracelular e possivelmente detectadas em fluidos corporais. A partir de 56 proteínas com aumento de expressão nos RI e 127 em RS, foram obtidas 34 (RI) e 113 (RS) proteínas potencialmente secretadas por tumores de orofaringe. Para identificar as proteínas com potencial de serem secretados por vesículas extracelulares utilizamos os bancos de dados do Vesiclepedia ou Exocarta, sendo identificadas 16 de RI e 36 de RS.

Também realizamos uma comparação com o banco de dados de proteínas previamente descritas no plasma de pacientes com câncer (Plasma Proteome), o que resultou em 17 em RI e 35 em RS. Para selecionar as moléculas com maior potencial de serem secretadas, filtramos as proteínas presentes em todos os bancos de dados avaliados, resultando em oito potenciais marcadores secretados em RI e 19 em RS.

A maioria dos estudos que investigou potenciais marcadores proteicos em fluídos corporais utilizando a metodologia de espectrometria de massas foi desenvolvido em pacientes com câncer oral (WINCK et al. 2015; WU et al. 2015; KAWAHARA et al. 2016). WINCK et al. (2015) avaliaram as proteínas totais da saliva e de vesículas extracelulares da saliva de 24 pacientes com carcinomas da cavidade oral e 10 indivíduos saudáveis por espectrometria de massas. As 44 proteínas diferencialmente expressas identificadas estavam relacionadas com resposta imune, inflamatória e inibidores de peptidase. Nas vesículas extracelulares foram identificadas proteínas associadas ao sistema inflamatório, crescimento e proliferação celular. Os autores também relataram que a proteína PPIA apresentou diminuição de expressão na saliva dos pacientes sendo um candidato promissor a marcador prognóstico. Os dados proteômicos foram capazes de classificar os carcinomas orais com acurácia de 90% e revelaram que alterações no processo imune estão presentes no carcinoma oral (WINCK et al. 2015).

Outro estudo desenvolvido a fim de identificar marcadores de biópsia líquida foi desenvolvido por YAMASHITA et al. (2016). Os autores avaliaram

as concentrações de um marcador prévio (*midkine*) no soro de 103 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, e relataram associação dos níveis séricos de *midkine* com o potencial maligno, prognóstico e resposta a quimioterapia (YAMASHITA et al. 2016). Infelizmente, até o momento nenhum dos marcadores descritos foi validado em uma coorte maior de pacientes com tumores de cabeça e pescoço. Esses estudos demonstram o potencial de aplicabilidade e importância que o estabelecimento de marcadores detectáveis em biópsias líquidas possui na prática clínica. Em vista disso, fica clara a necessidade de investigar o potencial dos marcadores, identificados neste estudo, no sangue periférico ou saliva de uma grande coorte de pacientes com CCEO, uma vez que eles poderiam auxiliar na tomada de decisões terapêuticas.

Os transcritos e proteínas diferencialmente expressos entre os tumores responsivos e não responsivos foram integrados com o objetivo de selecionar marcadores presentes em ambas análises, porém apenas um alvo em comum foi identificado, MOB1A. Em ambas análises de expressão de transcritos e proteínas, essa molécula apresentou aumento de expressão nos tumores não responsivos a quimioterapia de indução. Apesar de haver sobreposição de apenas três amostras avaliadas por ambas metodologias, esse marcador se mostrou consistente. O gene *MOB1A* pertence a uma família de proteínas MOB altamente conservada em eucariotos e codifica uma proteína central na regulação da via de sinalização Hippo (HERGOVICH et al. 2013). MOB1A e MOB1B se ligam as quinases NDR/LATS controlando as funções do ciclo celular, apoptose e duplicação

do centrômero. Além disso, a via de sinalização Hippo também está envolvida em diversas funções biológicas, como morfogêneses, mitose e controle do ciclo celular (HERGOVICH et al. 2013). A perda dessa proteína resulta em maior proliferação celular (KULABEROGLU et al. 2017). Apesar dos nossos resultados serem contraditórios, uma vez que neste estudo o aumento de expressão está associado a pior prognóstico, o papel que esta proteína desempenha em tumores de orofaringe e sua participação nos mecanismos de resposta a quimioterapia precisam ser melhor investigados.

Apesar de haver apenas uma sobreposição de alvos, a análise de vias *in silico* resultou em vias biológicas comuns para ambos grupos de proteínas e transcritos. As principais vias canônicas alteradas estão associadas a regulação do ciclo celular, sendo destacadas as vias de Cell cycle, G1/S Transition e S Phase ($P < 0,01$). Estudos investigando as vias associadas com resposta a IC em CCECP são escassos em literatura. LIAN et al. (2017b) avaliaram o perfil de expressão gênica de tumores de hipofaringe de acordo com a resposta a quimioterapia de indução e as vias associadas. A análise de vias demonstrou que os genes diferencialmente expressos (entre tumores sensíveis e não sensíveis a IC) estavam envolvidos nas vias de sinalização do metabolismo de gorduras, crescimento celular e apoptose (LIAN et al. 2017b). Os autores identificaram que a via MAPK desempenha um papel central na sensibilidade a quimioterapia; outras vias identificadas foram Wnt e Jak-STAT (LIAN et al. 2017b). A regulação da proliferação celular é um processo complexo e primariamente regulado por fatores de crescimento externos secretados pelas células

adjacentes e a via de sinalização de MAPK está envolvida em uma série de cascatas de quinases que desempenham um papel crítico na proliferação celular e anti-apoptose (LIAN et al. 2017b).

Um estudo semelhante do mesmo grupo acima descrito, avaliou as vias associadas aos genes diferencialmente de acordo com a resposta a IC em tumores de laringe (LIAN et al. 2017a). Os autores relataram que a análise de vias sugeriu que esses genes participam de processos fisiológicos, incluindo diferenciação celular, metabolismo, transdução de sinal e organização de componentes celulares.

Em resumo, os resultados obtidos neste estudo revelaram diversos marcadores com potencial para serem aplicados na prática clínica, auxiliando na tomada de decisões terapêuticas de forma mais personalizada. Entretanto, nosso estudo tem algumas limitações incluindo a necessidade de validação dos alvos dos classificadores em um grupo de amostras tumorais independentes. A investigação dos potenciais marcadores relatados em nosso estudo também poderiam ser testados em biópsias líquidas, como saliva ou plasma/soro. Além disso, a falta de dados públicos disponíveis aumenta a dificuldade da validação independente dos resultados de predição de resposta a IC. Apesar das limitações, este estudo apresenta resultados promissores que podem originar estudos adicionais visando a validação e futuras aplicações clínicas.

6 CONCLUSÕES

- Foram identificados 200 genes diferencialmente expressos entre os CCEO de pacientes que apresentaram RS e RI à quimioterapia de indução, sendo 87 genes com expressão diminuída e 113 com expressão aumentada nos pacientes RI em relação a RS;
- O modelo de predição desenvolvido foi capaz de estratificar pacientes de acordo com a resposta a quimioterapia de indução, utilizando cinco marcadores *GPSM2*, *CPNE2*, *FOXRED2*, *BCHE* e *KLKB1*;
- O modelo preditivo de resposta baseado em transcritos utilizando os dados do TCGA revelou bom desempenho para ser aplicado como marcador de prognóstico independente do tratamento;
- A análise *in silico* dos transcritos que codificam proteínas potencialmente secretadas permitiu a identificação de quatro potenciais marcadores secretados em RI (*CR1*, *KLKB1*, *FBLN1* e *MOB1A*) e cinco em RS (*PCSK5*, *RET*, *PRPH2*, *CST6* e *BCHE*);
- O perfil proteômico de pacientes com RI comparado com os RS permitiu a identificação de 183 proteínas diferencialmente expressas, sendo que 127 proteínas apresentaram expressão diminuída e 56 expressão aumentada nos casos RI;
- O classificador composto pelas proteínas *CDKN2A*, *HNRNPA0*, *MYO1B* e *TXNL1A* foi capaz de estratificar 100% dos pacientes de

acordo com a resposta a quimioterapia de indução;

- A análise *in silico* para determinar as proteínas com potencial de serem secretadas nos fluídos corporais resultou em oito potenciais marcadores de RI e 19 de RS;
- A análise integrada entre os transcritos e proteínas diferencialmente expressos revelou a sobreposição de apenas uma molécula, MOB1A;
- A análise de vias de sinalização biológicas *in silico* com os dados de transcriptoma e proteoma resultou em vias alteradas comuns para ambos os grupos, em geral relacionadas a regulação do ciclo celular.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Cancer Statistics Center-Estimated new cases: pharynx**. 2018. Available from: <URL:<https://bit.ly/2YXFvrs>> [2018 nov 12]

Adamopoulos PG, Kontos CK, Papageorgiou SG, Pappa V, Scorilas A. KLKB1 mRNA overexpression: a novel molecular biomarker for the diagnosis of chronic lymphocytic leukemia. **Clin Biochem** 2015; 48:849-54.

Aebersold R, Mann M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature** 2003; 422:198-207.

Aebersold R, Mann M. Mass-spectrometric exploration of proteome structure and function. **Nature** 2016; 537:347-55.

Akervall J, Brun E, Dictor M, Wennerberg J. Cyclin D1 overexpression versus response to induction chemotherapy in squamous cell carcinoma of the head and neck—preliminary report. **Acta Oncol** 2001; 40:505-11.

Alter BP. Fanconi's anemia, transplantation, and cancer. **Pediatr Transplant** 2005; 9:81-6.

Anantharaman D, Billot A, Waterboer T, et al. Predictors of oropharyngeal cancer survival in Europe. **Oral Oncol** 2018; 81:89-94.

Ang KK, Harris J, Wheeler R, et al. Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. **N Engl J Med** 2010; 363:24-35.

Argiris A. Induction chemotherapy for head and neck cancer: will history repeat itself? **J Natl Compr Canc Netw** 2005; 3:393-403.

Bader AG, Kang SY, Zhao L, Vogt PK. Oncogenic PI3K deregulates transcription and translation. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:921-9.

Bajikar SS, Wang CC, Borten MA, Pereira EJ, Atkins KA, Janes KA. Tumor suppressor inactivation of GDF11 occurs by precursor sequestration in triple-negative breast cancer. **Dev Cell** 2017; 43:418-435.e13.

Barros-Filho MC, Reis-Rosa LA, Hatakeyama M, et al. Oncogenic drivers in 11q13 associated with prognosis and response to therapy in advanced oropharyngeal carcinomas. **Oral Oncol** 2018; 83:81-90.

Bastos de Souza TR, Pinto CA, da Cunha Mercante AM, Nishimoto IN, Brasilino de Carvalho M, Kowalski LP. Long-term results of surgical treatment for advanced oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Head Neck** 2014; 36:1146-54.

Boyko KM, Baymukhametov TN2, Chesnokov YM, et al. 3D structure of the natural tetrameric form of human butyrylcholinesterase as revealed by cryoEM, SAXS and MD. **Biochimie** 2019; 156:196-205.

Bolt R, Foran B, Murdoch C, Lambert DW, Thomas S, Hunter KD. HPV-negative, but not HPV-positive, oropharyngeal carcinomas induce fibroblasts to support tumour invasion through micro-environmental release of HGF and IL-6. **Carcinogenesis** 2018; 39:170-9.

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; 68:394-424.

Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. **TNM classification of malignant tumors**. 8th ed. New York: Wiley-Blackwell; 2017. Pharynx; p.22-30.

Brockstein B, Haraf DJ, Rademaker AW, et al. Patterns of failure, prognostic factors and survival in locoregionally advanced head and neck cancer treated with concomitant chemoradiotherapy: a 9-year, 337-patient, multi-institutional experience. **Ann Oncol** 2004; 15:1179-86.

Cabelguenne A, Blons H, de Waziers I, et al. p53 alterations predict tumor response to neoadjuvant chemotherapy in head and neck squamous cell carcinoma: a prospective series. **J Clin Oncol** 2000; 18:1465-73.

Calais G, Alfonsi M, Bardet E, et al. Randomized trial of radiation therapy versus concomitant chemotherapy and radiation therapy for advanced-stage oropharynx carcinoma. **J Natl Cancer Inst** 1999; 91:2081-6.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature** 2015; 517:576-82.

Cannell IG, Merrick KA, Morandell S, et al. A Pleiotropic RNA-binding protein controls distinct cell cycle checkpoints to drive resistance of p53-defective tumors to chemotherapy. **Cancer Cell** 2015; 28:623-37.

Castellsagué X, Alemany L, Quer M, et al. HPV involvement in head and neck cancers: comprehensive assessment of biomarkers in 3680 patients. **J Natl Cancer Inst** 2016; 108:djv403.

Castillo-González AC, Nieto-Cerón S, Pelegrín-Hernández JP, et al. Dysregulated cholinergic network as a novel biomarker of poor prognostic in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **BMC Cancer** 2015; 15:385.

Carnielli CM, Macedo CCS, De Rossi T, et al. Combining discovery and targeted proteomics reveals a prognostic signature in oral cancer. **Nat Commun** 2018; 9:3598.

Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. **J Clin Oncol** 2011; 29:4294-301.

Chatzkel J, Lewis JS Jr, Ley JC, et al. Correlation of Ki-67 proliferative antigen expression and tumor response to induction chemotherapy containing cell cycle-specific agents in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck Pathol** 2017; 11:338-45.

Chen AY, Zhu J, Fedewa S. Temporal trends in oropharyngeal cancer treatment and survival: 1998-2009. **Laryngoscope** 2014; 124:131-8.

Chen WS, Bindra RS, Mo A, et al. CDKN2A Copy Number Loss Is an Independent Prognostic Factor in HPV-negative head and neck squamous cell carcinoma. **Front Oncol** 2018; 4:8:95.

Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. **J Dent Res** 2008; 87:14-32.

Choi WH, Hu KS, Culliney B, et al. Cancer of the oropharynx. In: Harrison LB, Sessions RB, Hong WK, editors. **Head and neck cancer: a multidisciplinary approach**. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott, William & Wilkins, 2009. p.285-335.

Cosway B, Paleri V, Wilson J. Biomarkers predicting chemotherapy response in head and neck squamous cell carcinoma: a review. **J Laryngol Otol** 2015; 129:1046-52.

Cullen KJ, Schumaker L, Nikitakis N, et al. beta-Tubulin-II expression strongly predicts outcome in patients receiving induction chemotherapy for locally advanced squamous carcinoma of the head and neck: a companion analysis of the TAX 324 trial. **J Clin Oncol** 2009; 27:6222-8.

Curado M P, Hashibe M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. **Curr Opin Oncol** 2009; 21:194-200.

Dahlstrand H, Näsman A, Romanitan M, Lindquist D, Ramqvist T, Dalianis T. Human papillomavirus accounts both for increased incidence and better prognosis in tonsillar cancer. **Anticancer Res** 2008; 28:1133-8.

Dahlstrom KR, Calzada G, Hanby JD, et al. An evolution in demographics, treatment, and outcomes of oropharyngeal cancer at a major cancer center: a staging system in need of repair. **Cancer** 2013; 119:81-9.

Demidyuk IV, Shubin AV, Gasanov EV, et al. Alterations in gene expression of proprotein convertases in human lung cancer have a limited number of scenarios. **PLoS One** 2013; 8:e55752.

Denis F, Garaud P, Bardet E, et al. Final results of the 94-01 French Head and Neck Oncology and Radiotherapy Group randomized trial comparing radiotherapy alone with concomitant radiochemotherapy in advanced-stage oropharynx carcinoma. **J Clin Oncol** 2004; 22:69-76.

Descamps G, Wattiez R, Saussez S. Proteomic study of HPV-positive head and neck cancers: preliminary results. **Biomed Res Int** 2014; 2014:430906.

Dey KK, Pal I, Bharti R, et al. Identification of RAB2A and PRDX1 as the potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma using mass spectrometry-based comparative proteomic approach. **Tumour Biol** 2015; 36:9829-37.

Doherty D, Chudley AE, Coghlan G, et al. GPSM2 mutations cause the brain malformations and hearing loss in Chudley-McCullough syndrome. **Am J Hum Genet** 2012; 90:1088-93.

Ernani V, Kumar M, Chen AY, Owonikoko TK. Systemic treatment and management approaches for medullary thyroid cancer. **Cancer Treat Rev** 2016; 50:89-98.

Farsi NJ, Rousseau MC, Schlecht N. Aetiological heterogeneity of head and neck squamous cell carcinomas: the role of human papillomavirus infections, smoking and alcohol. **Carcinogenesis** 2017; 38:1188-95.

Feng Z, Guo W, Zhang C, et al. CCND1 as a predictive biomarker of neoadjuvant chemotherapy in patients with locally advanced head and neck squamous cell carcinoma. **PLoS One** 2011; 6:e26399.

Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science** 1989; 4926:64-71.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. **N Engl J Med** 2001; 345:1890-900.

Fukukawa C, Ueda K, Nishidate T, Katagiri T, Nakamura Y. Critical roles of LGN/GPSM2 phosphorylation by PBK/TOPK in cell division of breast cancer cells. **Genes Chromosomes Cancer** 2010; 49:861-72.

Gan SJ, Dahlstrom KR, Peck BW, et al. Incidence and pattern of second primary malignancies in patients with index oropharyngeal cancers versus index nonoropharyngeal head and neck cancers. **Cancer** 2013; 119:2593-601.

Gao Y, Liu X, Li T, et al. Cross-validation of genes potentially associated with overall survival and drug resistance in ovarian cancer. **Oncol Rep** 2017; 37:3084-92.

Gourin CG, Xia ZS, Han Y, et al. Serum protein profile analysis in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2006; 132:390-7.

Grønhøj Larsen C, Gyldenløve M, Jensen DH, et al. Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. **Br J Cancer** 2014; 110:1587-94.

Grüllich C. Cabozantinib: Multi-kinase Inhibitor of MET, AXL, RET, and VEGFR2. **Recent Results Cancer Res** 2018; 211:67-75.

Gunn GB, Debnam JM, Fuller CD, et al. The impact of radiographic retropharyngeal adenopathy in oropharyngeal cancer. **Cancer** 2013; 119:3162-9.

Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. **N Engl J Med** 2008; 359:1143-54.

Hasegawa Y, Goto M, Hanai N, Ozawa T, Hirakawa H. Predictive biomarkers for combined chemotherapy with 5-fluorouracil and cisplatin in oro-and hypopharyngeal cancers. **Mol Clin Oncol** 2018; 8:378-86.

Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, 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; 18:541-50.

Hay A, Nixon IJ. Recent advances in the understanding and management of oropharyngeal cancer. **F1000Res** 2018; 7:F1000.

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; 33:3227-34.

He JR, Xi J, Ren ZF, et al. Complement receptor 1 expression in peripheral blood mononuclear cells and the association with clinicopathological features and prognosis of nasopharyngeal carcinoma. **Asian Pac J Cancer Prev** 2012; 13:6527-31.

He XQ, Zhang YF, Yu JJ, et al. High expression of G-protein signaling modulator 2 in hepatocellular carcinoma facilitates tumor growth and metastasis by activating the PI3K/AKT signaling pathway. **Tumour Biol** 2017; 39:1010428317695971.

Heo SH, Lee SJ, Ryoo HM, Park JY, Cho JY. Identification of putative serum glycoprotein biomarkers for human lung adenocarcinoma by multilectin affinity chromatography and LC-MS/MS. **Proteomics** 2007; 7:4292-302.

Hergovich A. MOB control: reviewing a conserved family of kinase regulators. **Cell Signal** 2011; 23:1433-40.

Hergovich A. Regulation and functions of mammalian LATS/NDR kinases: looking beyond canonical Hippo signalling. **Cell Biosci** 2013; 3:32.

Hitt R, López-Pousa A, Martínez-Trufero J, et al. Phase III study comparing cisplatin plus fluorouracil to paclitaxel, cisplatin, and fluorouracil induction chemotherapy followed by chemoradiotherapy in locally advanced head and neck cancer. **J Clin Oncol** 2005; 23:8636-45.

Holmila R, Sklias A, Muller DC, et al. Targeted deep sequencing of plasma circulating cell-free DNA reveals Vimentin and Fibulin 1 as potential epigenetic biomarkers for hepatocellular carcinoma. **PLoS One** 2017; 12:e0174265.

Hu S, Yu T, Xie Y, et al. Discovery of oral fluid biomarkers for human oral cancer by mass spectrometry. **Cancer Genomics Proteomics** 2007; 4:55-64.

Hunter FW, Jaiswal JK, Hurley DG, et al. The flavoprotein FOXRED2 reductively activates nitro-chloromethylbenzindolines and other hypoxia-targeting prodrugs. **Biochem Pharmacol** 2014; 89:224-35.

Ishiguro R, Fuji M, Yamashita T, et al. CCND1 amplification predicts sensitivity to chemotherapy and chemoradiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. **Anticancer Res** 2003; 23:5213-20.

Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2006. **CA Cancer J Clin** 2006; 56:106-30.

Jiao Y, Feng Y, Wang X. Regulation of tumor suppressor gene CDKN2A and encoded p16-INK4a protein by covalent modifications. **Biochemistry (Mosc)** 2018; 83:1289-98.

Johnstone CN, Pattison AD, Gorringer KL, et al. Functional and genomic characterisation of a xenograft model system for the study of metastasis in triple-negative breast cancer. **Dis Model Mech** 2018; 11:dmm032250.

Karagiannis GS, Pavlou MP, Diamandis EP. Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. **Mol Oncol** 2010; 4:496-510.

Kaskas NM, Moore-Medlin T, McClure GB, Ekshyyan O, Vanchiere JA, Nathan CA. Serum biomarkers in head and neck squamous cell cancer. **JAMA Otolaryngol Head Neck Surg** 2014; 140:5-11.

Kawahara R, Bollinger JG, Rivera C, et al. A targeted proteomic strategy for the measurement of oral cancer candidate biomarkers in human saliva. **Proteomics** 2016; 16:159-73.

Keck MK, Zuo Z, Khattri A, et al. Integrative analysis of head and neck cancer identifies two biologically distinct HPV and three non-HPV subtypes. **Clin Cancer Res** 2015; 21:870-81.

Kim R, Hahn S, Shin J et. al. The effect of induction chemotherapy using docetaxel, cisplatin, and fluorouracil on survival in locally advanced head and neck squamous cell carcinoma: a meta-analysis. **Cancer Res Treat** 2016; 48:907-16.

Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2005; 14:467-75.

Kulaberoglu Y, Lin K, Holder M, et al. Stable MOB1 interaction with Hippo/MST is not essential for development and tissue growth control. **Nat Commun** 2017; 8:695.

Kumar B, Cordell KG, D'Silva N, et al. Expression of p53 and Bcl-xL as predictive markers for larynx preservation in advanced laryngeal cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2008a; 134:363-9.

Kumar B, Cordell KG, Lee JS, et al. EGFR, p16, HPV titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. **J Clin Oncol** 2008b; 26:3128-37.

Kundu S, Ramshankar V, Verma AK, et al. Association of DFNA5, SYK, and NELL1 variants along with HPV infection in oral cancer among the prolonged tobacco-chewers. **Tumour Biol** 2018; 40:1010428318793023.

Lampri ES, Chondrogiannis G, Ioachim E, et al. Biomarkers of head and neck cancer, tools or a gordian knot? **Int J Clin Exp Med** 2015; 8:10340-57.

Lee YS, Johnson DE, Grandis JR. An update: emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck. **Expert Opin Emerg Drugs** 2018; 30:1-17.

Leemans CR, Braakhuis B J, Brakenhoff R H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer** 2011; 11:9-22.

Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. The molecular landscape of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer** 2018; 18:269-82.

Leoncini E, Vukovic V, Cadoni G, et al. Tumour stage and gender predict recurrence and second primary malignancies in head and neck cancer: a multicentre study within the INHANCE consortium. **Eur J Epidemiol** 2018; 33:1205-18.

Lian M, Shi Q, Fang J, et al. In vivo gene expression profiling for chemosensitivity to docetaxel-cisplatin-5-FU (TPF) triplet regimen in laryngeal squamous cell carcinoma and the effect of TPF treatment on related geneexpression in vitro. **Acta Otolaryngol** 2017a; 137:765-72.

Lian M, Wang H, Fang J, et al. Microarray gene expression analysis of chemosensitivity for docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil (TPF) combined chemotherapeutic regimen in hypopharyngeal squamous cell carcinoma. **Chin J Cancer Res** 2017b; 29:204-12.

Licitra L, Bernier J, Grandi C, et al. Cancer of the larynx. **Crit Rev OncolHematol** 2003; 47:65-80.

Lin C, Lu W, Ren Z, et al. Elevated RET expression enhances EGFR activation and mediates EGFR inhibitor resistance in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Lett** 2016; 377:1-10.

Lin SJ, Chang KP, Hsu CW, et al. Low-molecular-mass secretome profiling identifies C-C motif chemokine 5 as a potential plasma biomarker and 115 therapeutic target for nasopharyngeal carcinoma. **J Proteomics** 2013; 94:186-201.

Liu X, Wang J, Sun G. Identification of key genes and pathways in renal cell carcinoma through expression profiling data. **Kidney Blood Press Res** 2015; 40:288-97.

Lowy DR, Munger K. Prognostic implications of HPV in oropharyngeal cancer. **N Engl J Med** 2010; 363:82-4.

Lorch JH, Goloubeva O, Haddad RI, et al. Induction chemotherapy with cisplatin and fluorouracil alone or in combination with docetaxel in locally advanced squamous-cell cancer of the head and neck: long-term results of the TAX 324 randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2011; 12:153-9.

Lucas-Roxburgh R, Benschop J, Lockett B, van den Heever U, Williams R, Howe L. The prevalence of human papillomavirus in oropharyngeal cancer in a New Zealand population. **Plos One** 2017; 12:e0186424.

Martin D, Abba MC, Molinolo AA, et al. The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. **Oncotarget** 2014; 5:8906-23.

McLaughlin-Drubin ME, Münger K. Oncogenic activities of human papillomaviruses. **Virus Res** 2009; 143:195-208.

McLean JR, Robertson J. Isoform-specific expression and ratio changes accompany oxidant-induced peripherin aggregation in a neuroblastoma cell line. **Brain Res** 2011; 1422:57-65.

Mendenhall WM, Werning JW, Pfister DG. Treatment of head and neck cancer. In: DeVita VT Jr, Lawrence TS, Rosenberg SA, editors. **Cancer: principles and practice of oncology**. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p.729-80.

Millino C, Maretto I, Pacchioni B, et al. Gene and microRNA expression are predictive of tumor response in rectal adenocarcinoma patients treated with preoperative chemoradiotherapy. **J Cell Physiol** 2017; 232:426-35.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. **Estimativa/2018/2019 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2018.

[NCI] National Cancer Institute. **Oropharyngeal Cancer Treatment (Adult) (PDQ®): health professional version**. Published online: February 6, 2019. Available from: <URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65723/>> [2019 fev 12]

Nagy A, Pongor LS, Szabó A, Santarpia M, Gyórfy B. KRAS driven expression signature has prognostic power superior to mutation status in non-small cell lung cancer. **Int J Cancer** 2017; 140(4):930-7.

Ni P, Xu W, Zhang Y, et al. TXNL1 induces apoptosis in cisplatin resistant human gastric cancer cell lines. **Curr Cancer Drug Targets** 2015; 14:850-9.

Nickel W. The mystery of nonclassical protein secretion: a current view on cargo proteins and potential export routes. **Eur J Biochem** 2003; 270:2109-19.

Nishimura T, Newkirk K, Sessions RB, et al. Immunohistochemical staining for glutathione S-transferase predicts response to platinum-based chemotherapy in head and neck cancer. **Clin Cancer Res** 1996; 2:1859-65.

Noro D, Koie T, Hashimoto Y, et al. Significance of preoperative butyrylcholinesterase level as an independent predictor of survival in patients with upper urinary tract urothelial carcinoma treated with nephroureterectomy. **Jpn J Clin Oncol** 2018; 48:184-9.

Ohmura G, Tsujikawa T, Yaguchi T, et al. Aberrant Myosin 1b Expression Promotes Cell Migration and Lymph Node Metastasis of HNSCC. **Mol Cancer Res** 2015; 13:721-31.

Pandey A, Mann M. Proteomics to study genes and genomes. **Nature** 2000; 405:837-46.

Peng PH, Wu CC, Liu SC, et al. Quantitative plasma proteome analysis reveals aberrant level of blood coagulation-related proteins in nasopharyngeal carcinoma. **J Proteomics** 2011; 74:744-57.

Perestenko P, Watanabe M, Beusnard-Bee T, Guna P, McIlhinney J. The second C2-domain of copine-2, copine-6 and copine-7 is responsible for their calcium dependent membrane association. **FEBS J** 2015; 282:3722-36.

Perrone F, Bossi P, Cortelazzi B, et al. TP53 mutations and pathologic complete response to neoadjuvant cisplatin and fluorouracil chemotherapy in resected oral cavity squamous cell carcinoma. **J Clin Oncol** 2010; 28:761-6.

Pérez-Sayáns M, Somoza-Martín JM, Barros-Angueira F, Reboiras-López MD, Gándara Rey JM, García-García A. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review). **Oncol Rep** 2009; 22:1277-82.

Perisanidis C, Perisanidis B, Wrba F, et al. Evaluation of immunohistochemical expression of p53, p21, p27, cyclin D1, and Ki67 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 2012; 41:40-6.

Picotti P, Rinner O, Stallmach R, et al. High-throughput generation of selected reaction-monitoring assays for proteins and proteomes. **Nature Methods** 2010; 7:43-6.

Pignon JP, Bourhis J, Domenge C, et al. Chemotherapy added to locoregional treatment for head and neck squamous-cell carcinoma: three meta-analyses of updated individual data. MACH-NC Collaborative Group. meta-analysis of chemotherapy on head and neck cancer. **Lancet** 2000; 355:949-55.

Posner MR, Haddad RI, Wirth L, et al. Induction chemotherapy in locally advanced squamous cell cancer of the head and neck: evolution of the sequential treatment approach. **Semin Oncol** 2004; 31:778-85.

Posner MR, Hershock DM, Blajman CR, et al. Cisplatin and fluorouracil alone or with docetaxel in head and neck cancer. **N Engl J Med** 2007; 357:1705-15.

Prabhu K, Naik D, Ray S, Vadiraj, Rao A, Kamath A. Significance of serum butyrylcholinesterase levels in oral cancer. **Australas Med J** 2011; 4:374-8.

Priante AV, Castilho EC, Kowalski LP. Second primary tumors in patients with head and neck cancer. **Curr Oncol Rep** 2011; 13:132-7.

Psyrris A, Fortpied C, Koutsodontis G, et al. Evaluation of the impact of tumor HPV status on outcome in patients with locally advanced unresectable head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) receiving cisplatin, 5-fluorouracil with or without docetaxel: a subset analysis of EORTC 24971 study. **Ann Oncol** 2017; 28:2213-8.

Pytynia KB, Dahlstrom KR; Sturgis EM. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. **Oral Oncol** 2014; 50:380-6.

Rosenberg OS, Greene MH, Alter BP. Cancer incidence in persons with Fanconi anemia. **Blood** 2003; 101:822-6.

Saito Y, Ando M, Fujimoto C, et al. Human papillomavirus 16 physical status and the TP53 codon 72 Ppolymorphism in Japanese HPV-positive oropharyngeal cancer patients. **ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec** 2016; 78:46-54.

Sarode GS, Batra A, Sarode SC, Yerawadekar S, Patil S. Oral cancer-related inherited cancer syndromes: a comprehensive review. **J Contemp Dent Pract** 2016; 17:504-10.

Schaaij-Visser TB, de Wit M, Lam SW, Jiménez CR. The cancer secretome, current status and opportunities in the lung, breast and colorectal cancer context. **Biochim Biophys Acta** 2013; 1834:2242-58.

Sepiashvili L, Hui A, Ignatchenko V, et al. Potentially novel candidate biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma identified using an integrated cell line-based discovery strategy. **Mol Cell Proteomics** 2012; 11:1404-15.

Sepiashvili L, Waggott D, Hui A, et al. Integrated omic analysis of oropharyngeal carcinomas reveals human papillomavirus (HPV)-dependent regulation of the activator protein 1 (AP-1) pathway. **Mol Cell Proteomics** 2014; 13:3572-84.

Sepiashvili L, Bruce JP, Huang SH, O'Sullivan B, Liu FF, Kislinger T. Novel insights into head and neck cancer using next-generation "omic" technologies. **Cancer Res** 2015; 75:480-6.

Shimizu R, Ibaragi S, Eguchi T, et al. Nicotine promotes lymph node metastasis and cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Oncol** 2019; 54:283-94.

Sindhu SK, Bauman JE. Current concepts in chemotherapy for head and neck cancer. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am** 2019; 31:145-54.

Slebos RJ, Jehmlich N, Brown B, et al. Proteomic analysis of oropharyngeal carcinomas reveals novel HPV-associated biological pathways. **Int J Cancer** 2013; 132:568-79.

Strati A, Koutsodontis G, Papaxoinis G, et al. Prognostic significance of PD-L1 expression on circulating tumor cells in patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Ann Oncol** 2017; 28:1923-33.

Spector ME, Rosko AJ, Swiecicki PL, Chad Brenner J, Birkeland AC. From VA Larynx to the future of csiRNA increases cysteine proteinases and legumain activities, cell proliferation and in vitro invasion. **Life Sci** 2006; 78:898-907.

Tahari AK, Alluri KC, Quon H, Koch W, Wahl RL, Subramaniam RM. FDG PET/CT imaging of oropharyngeal squamous cell carcinoma: characteristics of human papillomavirus-positive and -negative tumors. **Clin Nucl Med** 2014; 39:225-31.

Tang X, Hu YJ, Ju WT, et al. Elevated growth differentiating factor 15 expression predicts long-term benefit of docetaxel, cisplatin and 5-fluorouracil induction chemotherapy in patients with oral cancer. **Oncol Lett** 2018; 15:8118-8124.

Temam S, Flahault A, Perie S, et al. p53 gene status as a predictor of tumor response to induction chemotherapy of patients with locoregionally advanced squamous cell carcinomas of the head and neck. **J Clin Oncol** 2000; 18:385-94.

Thibodeau BJ, Geddes TJ, Fortier LE, et al. Gene expression characterization of HPV positive head and neck cancer to predict response to Chemoradiation. **Head Neck Pathol** 2015; 9:345-53.

Vathipadiekal V, Wang V, Wei W, et al. Creation of a human secretome: a novel composite library of human secreted proteins: validation using ovarian cancer gene expression data and a virtual secretome array. **Clin Cancer Res** 2015; 21:4960-9.

Vidal L, Gillison ML. Human papillomavirus in HNSCC: recognition of a distinct disease type. **Hematol Oncol Clin North Am** 2008; 22:1125-42.

Vigneswaran N, Wu J, Zacharias W. Upregulation of cystatin M during the progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma from primary tumor to metastasis. **Oral Oncol** 2003; 39:559-68.

Vigneswaran N, Wu J, Nagaraj N, James R, Zeeuwen P, Zacharias W. Silencing of cystatin M in metastatic oral cancer cell line MDA-686Ln by siRNA increases cysteine proteinases and legumain activities, cell proliferation and in vitro invasion. **Life Sci** 2006; 78:898-907.

Xu W, Wang S, Chen Q, et al. TXNL1-XRCC1 pathway regulates cisplatin-induced cell death and contributes to resistance in human gastric cancer. **Cell Death Dis** 2014; 5:e1055.

Yamada A, Mamane A, Lee-Tin-Wah J, et al. Catch-bond behaviour facilitates membrane tubulation by non-processive myosin 1b. **Nat Commun** 2014; 5:3624.

Yamada Y, Koshizuka K1, Hanazawa T, et al. Passenger strand of miR-145-3p acts as a tumor-suppressor by targeting MYO1B in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Oncol** 2018; 52:166-18.

Yamashita T, Shimada H, Tanaka S, et al. Serum midkine as a biomarker for malignancy, prognosis, and chemosensitivity in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Med** 2016; 5:415-25.

Yasumi M, Sakisaka T, Hoshino T, et al. Direct binding of Lgl2 to LGN during mitosis and its requirement for normal cell division. **J Biol Chem** 2005; 280:6761-5.

Young DJ, Stoddart A, Nakitandwe J. Knockdown of Hnrnpa0, a del(5q) gene, alters myeloid cell fate in murine cells through regulation of AU-rich transcripts. **Haematologica** 2014; 99:1032-40.

Yu X, Rao J, Lin J, Zhang Z, Cao L, Zhang X. Tag SNPs in complement receptor-1 contribute to the susceptibility to non-small cell lung cancer. **Mol Cancer** 2014; 13:56.

Watany MM, Elmashad NM, Badawi R, Hawash N. Serum FBLN1 and STK31 as biomarkers of colorectal cancer and their ability to noninvasively differentiate colorectal cancer from benign polyps. **Clin Chim Acta** 2018; 483:151-5.

Wei C, Peng B, Han Y, et al. Mutations of HNRNPA0 and WIF1 predispose members of a large family to multiple cancers. **Fam Cancer** 2015; 14:297-306.

Winck FV, Prado Ribeiro AC, Ramos Domingues R, et al. Insights into immune responses in oral cancer through proteomic analysis of saliva and salivary extracellular vesicles. **Sci Rep** 2015; 5:16305.

Wu CC, Chu HW, HSU CW, Chang KP, Liu HP. Saliva proteome profiling reveals potential salivary biomarkers for detection of oral cavity squamous cell carcinoma. **Proteomics** 2015; 15:3394-404.

Zhang Y, Koneva LA, Virani S, et al. Subtypes of HPV-positive head and neck cancers are associated with HPV characteristics, copy number alterations, PIK3CA mutation, and pathway signatures. **Clin Cancer Res** 2016; 22:4735-45.

Zhao L, Zhang Z, Lin J, et al. Complement receptor 1 genetic variants contribute to the susceptibility to gastric cancer in Chinese population. **J Cancer** 2015; 6:525-30.

Zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:342-50.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



A.C. Camargo Cancer Center
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **18/04/2017**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2352/17** intitulado: **“Perfil proteômico de carcinomas de orofaringe de pacientes responsivos e não responsivos ao tratamento neoadjuvante.”**

Pesquisador responsável: Luiz Paulo Kowalski.
Aluna: Julia Bette Homem de Mello (Doutorado)

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 26 de abril de 2017.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Caires Serrano
2ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Apêndice 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE



TERMO DE DISPENSA DO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Referente à análise do projeto de pesquisa intitulado: Perfil proteômico de carcinomas de orofaringe de pacientes responsivos e não responsivos ao tratamento neoadjuvante

Eu, Dr Luiz Paulo Kowalski, CRM 36404, Pesquisador Responsável pelo presente Projeto de Pesquisa a ser conduzido na Fundação Antonio Prudente - AC Camargo Cancer Center localizado Rua Professor Antonio Prudente, 211 – Departamento de Cabeça e Pescoço – São Paulo – SP, 01509-900, por este termo, solicito ao Comitê de Ética desta instituição a **dispensa** do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em razão desta pesquisa apresentar caráter retrospectivo, por se tratar de levantamento de dados junto à prontuários e banco de materiais biológicos. Comprometo-me:

- a preservar a privacidade dos participantes de pesquisa cujos dados serão coletados;
- que as informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do projeto em questão;
- que as informações somente serão divulgadas de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o participante da pesquisa.

Esperando ter atendido satisfatoriamente às exigências desse Comitê, aguardamos retorno.

Atenciosamente,



Dr Luiz Paulo Kowalski
Data: 01/03/2017

Rua Professor Antônio Prudente, 211 • Liberdade • São Paulo / SP • CEP 01509-900
(11) 2189-5000 • www.accamargo.org.br

Diretrizes para Projetos Retrospectivos 2016 - Versão 1 (Resolução CNS/MS nº 466/12)

Apêndice 2 - Lista completa dos transcritos diferencialmente expressos entre os tumores de pacientes não respondedores ao tratamento em relação ao grupo respondedor.

Transcritos com expressão diferencial entre os grupos					
Transcrito	Fold-change	Valor de p	Transcrito	Fold-change	Valor de p
<i>FLRT3</i>	-4,74	0,019	<i>OR10A2</i>	1,54	0,026
<i>SPINK6</i>	-4,71	0,019	<i>PCDHB1</i>	1,54	0,021
<i>CWH43</i>	-4,60	0,048	<i>SMAD4</i>	1,54	0,042
<i>BBOX1</i>	-4,51	0,011	<i>ZNF318</i>	1,54	0,017
<i>BCHE</i>	-4,03	0,016	<i>ZNF551</i>	1,54	0,042
<i>PQLC2L</i>	-3,75	0,001	<i>ELK1</i>	1,56	0,035
<i>PPP1R9A</i>	-3,66	0,023	<i>HIRIP3</i>	1,56	0,003
<i>TSPAN8</i>	-3,63	0,032	<i>LINC02210</i>	1,56	0,029
<i>NLRP2</i>	-3,08	0,016	<i>MRPL30</i>	1,56	0,030
<i>RYR2</i>	-2,98	0,006	<i>POLA1</i>	1,56	0,039
<i>SLC35F3</i>	-2,95	0,038	<i>SLC15A3</i>	1,56	0,043
<i>SLCO1A2</i>	-2,87	0,022	<i>VSIG1</i>	1,56	0,040
<i>CST6</i>	-2,84	0,011	<i>ARHGEF15</i>	1,59	0,020
<i>LRRC17</i>	-2,74	0,032	<i>GPR182</i>	1,59	0,046
<i>PCSK1</i>	-2,74	0,006	<i>HMG2P4</i>	1,59	0,012
<i>MAB21L4</i>	-2,71	0,038	<i>TRMT5</i>	1,59	0,036
<i>C11orf88</i>	-2,69	0,011	<i>MOB1A</i>	1,61	0,037
<i>NAP1L2</i>	-2,69	0,023	<i>FAM182A</i>	1,61	0,012
<i>KLF8</i>	-2,68	0,008	<i>RNMT</i>	1,61	0,013
<i>CA2</i>	-2,59	0,016	<i>SERINC4</i>	1,61	0,026
<i>STK31</i>	-2,58	0,050	<i>SMC2</i>	1,61	0,048
<i>SCGB1D1</i>	-2,57	0,019	<i>SNRNP40</i>	1,61	0,005
<i>PLA2G3</i>	-2,50	0,024	<i>C17orf53</i>	1,64	0,034
<i>SEMA3E</i>	-2,40	0,038	<i>C1orf115</i>	1,64	0,028
<i>PRPH2</i>	-2,37	0,028	<i>CDK2</i>	1,64	0,023
<i>ATP10D</i>	-2,33	0,008	<i>CR1</i>	1,64	0,040
<i>CSAG2</i>	-2,20	0,041	<i>ERI2</i>	1,64	0,050
<i>GPSM1</i>	-2,13	0,007	<i>FOXD4</i>	1,64	0,042
<i>DCBLD1</i>	-2,12	0,004	<i>GPSM2</i>	1,64	0,026
<i>ALDH1A3</i>	-2,10	0,038	<i>SSBP3</i>	1,64	0,019

<i>ENDOD1</i>	-2,10	0,009	<i>UNG</i>	1,64	0,019
<i>FAM227B</i>	-2,09	0,039	<i>ZBTB18</i>	1,64	0,038
<i>KRT80</i>	-2,08	0,024	<i>C2orf15</i>	1,67	0,038
<i>VEPH1</i>	-2,06	0,029	<i>IFNA6</i>	1,67	0,048
<i>C20orf85</i>	-2,05	0,022	<i>ATAD2</i>	1,69	0,050
<i>SALL1</i>	-2,02	0,032	<i>DDX31</i>	1,69	0,042
<i>SYT14</i>	-1,99	0,025	<i>FAM71B</i>	1,69	0,023
<i>CCDC40</i>	-1,95	0,021	<i>LINC01560</i>	1,69	0,005
<i>PRMT8</i>	-1,94	0,026	<i>LIPE</i>	1,69	0,027
<i>CCDC112</i>	-1,93	0,003	<i>ZNF75A</i>	1,69	0,011
<i>LAYN</i>	-1,93	0,044	<i>CADPS2</i>	1,72	0,048
<i>PCSK5</i>	-1,91	0,044	<i>CDH5</i>	1,72	0,028
<i>YOD1</i>	-1,91	0,040	<i>CROCC</i>	1,72	0,040
<i>C1QL2</i>	-1,88	0,022	<i>HMGN2</i>	1,72	0,022
<i>RET</i>	-1,87	0,029	<i>INPP5F</i>	1,72	0,026
<i>QDPR</i>	-1,85	0,010	<i>VIRMA</i>	1,72	0,038
<i>NR2E1</i>	-1,84	0,043	<i>AFAP1</i>	1,75	0,018
<i>PODNL1</i>	-1,84	0,033	<i>CLDN3</i>	1,75	0,025
<i>ZNF138</i>	-1,83	0,004	<i>FAM118A</i>	1,75	0,029
<i>ADCY7</i>	-1,82	0,019	<i>METTL27</i>	1,75	0,048
<i>B3GNT4</i>	-1,78	0,044	<i>RRM2</i>	1,75	0,035
<i>DCUN1D5</i>	-1,78	0,010	<i>DSCR8</i>	1,79	0,024
<i>SULF2</i>	-1,77	0,048	<i>PRSS38</i>	1,79	0,042
<i>ZNF433</i>	-1,76	0,045	<i>STRC</i>	1,79	0,034
<i>ANKRD42</i>	-1,75	0,018	<i>ERRFI1</i>	1,82	0,043
<i>PPP1R36</i>	-1,75	0,024	<i>ORC1</i>	1,82	0,027
<i>FAM229B</i>	-1,74	0,049	<i>STAG1</i>	1,82	0,007
<i>LRP12</i>	-1,72	0,046	<i>B3GLCT</i>	1,85	0,044
<i>BRSK2</i>	-1,70	0,006	<i>C5</i>	1,85	0,033
<i>DNAI2</i>	-1,70	0,030	<i>NOTCH1</i>	1,85	0,011
<i>NDP</i>	-1,69	0,040	<i>AGMAT</i>	1,89	0,011
<i>TRIM13</i>	-1,67	0,019	<i>TCF19</i>	1,89	0,021
<i>ANKRD50</i>	-1,66	0,042	<i>ALG10B</i>	1,92	0,040
<i>ESYT3</i>	-1,66	0,023	<i>CCNE2</i>	1,92	0,033
<i>C11orf65</i>	-1,65	0,038	<i>PRPS2</i>	1,92	0,045
<i>GYG1</i>	-1,65	0,028	<i>FAM153C</i>	1,96	0,005

<i>UBXN8</i>	-1,65	0,012	<i>APOBEC3D</i>	2,00	0,043
<i>GOLGA4</i>	-1,64	0,045	<i>HAND2-AS1</i>	2,00	0,045
<i>RUNX2</i>	-1,64	0,038	<i>KLKB1</i>	2,00	0,028
<i>HMBOX1</i>	-1,62	0,031	<i>BMP7</i>	2,04	0,036
<i>INTS4P1</i>	-1,61	0,005	<i>PLCE1</i>	2,04	0,029
<i>ANKLE1</i>	-1,58	0,009	<i>RMI2</i>	2,04	0,034
<i>MARVELD3</i>	-1,58	0,024	<i>SLC1A6</i>	2,04	0,028
<i>NTSR2</i>	-1,58	0,040	<i>WDR76</i>	2,04	0,020
<i>MSRB2</i>	-1,57	0,020	<i>FAM111B</i>	2,08	0,011
<i>REXO2</i>	-1,57	0,017	<i>GUCY1B1</i>	2,08	0,044
<i>PTS</i>	-1,56	0,015	<i>PLEKHH2</i>	2,08	0,023
<i>SAMD15</i>	-1,56	0,044	<i>FOXRED2</i>	2,13	0,001
<i>DSE</i>	-1,54	0,048	<i>HAND2</i>	2,13	0,015
<i>FAM174A</i>	-1,54	0,025	<i>MIR600HG</i>	2,13	0,017
<i>EPM2AIP1</i>	-1,53	0,038	<i>RNF32</i>	2,13	0,020
<i>NFAT5</i>	-1,53	0,037	<i>SSX2IP</i>	2,13	0,030
<i>SLC25A13</i>	-1,53	0,034	<i>MKI67</i>	2,17	0,016
<i>ACAT1</i>	-1,52	0,048	<i>RASIP1</i>	2,17	0,015
<i>FRYL</i>	-1,52	0,023	<i>CD207</i>	2,27	0,022
<i>IDI2</i>	-1,52	0,036	<i>FAM153B</i>	2,38	0,011
<i>KLHL4</i>	-1,51	0,049	<i>SYCE2</i>	2,38	0,049
<i>ADGRG6</i>	1,52	0,043	<i>ABI3BP</i>	2,56	0,024
<i>ARHGEF39</i>	1,52	0,044	<i>RIBC2</i>	2,56	0,038
<i>CDYL</i>	1,52	0,013	<i>RPTN</i>	2,56	0,033
<i>CPNE2</i>	1,52	0,013	<i>OLFM1</i>	2,70	0,005
<i>DNAJB8</i>	1,52	0,014	<i>C4orf19</i>	2,78	0,028
<i>FBLN1</i>	1,52	0,034	<i>MROH2A</i>	2,78	0,047
<i>RHPN2</i>	1,52	0,041	<i>BTNL9</i>	2,86	0,029
<i>ZNF615</i>	1,52	0,014	<i>TDRD10</i>	3,13	0,016
<i>DCLRE1B</i>	1,54	0,021	<i>ASPN</i>	3,70	0,027
<i>FAM120AOS</i>	1,54	0,036	<i>STAG3</i>	3,70	0,020
<i>GPD2</i>	1,54	0,047	<i>GPC3</i>	3,85	0,006
<i>ITGB3BP</i>	1,54	0,032	<i>SMC1B</i>	4,00	0,037
<i>NSMCE3</i>	1,54	0,013	<i>SOHLH1</i>	4,55	0,036

Apêndice 3 - Lista completa das proteínas diferencialmente expressas entre os tumores de pacientes não respondedores ao tratamento em relação ao grupo respondedor.

Proteínas com expressão diferencial entre os grupos					
Proteína	Fold-change	Valor de p	Proteína	Fold-change	Valor de p
KRT15	-15,63	0,001	ME2	-1,64	0,008
KRT19	-6,25	0,001	PSME1	-1,64	0,015
DPYSL5	-5,56	0,021	SEC23B	-1,64	0,048
CDKN2A	-5,00	0,000	SMC1A	-1,64	0,025
CALML5	-4,76	0,014	TMEM109	-1,64	0,023
KRT8	-4,55	0,012	AKR1A1	-1,61	0,029
HIST1H1C	-2,94	0,039	MCCC2	-1,61	0,014
TACSTD2	-2,94	0,000	CAND1	-1,59	0,012
MCM5	-2,86	0,001	CTNBL1	-1,59	0,020
HIST1H1E	-2,63	0,043	ECI1	-1,59	0,045
UBXN1	-2,56	0,017	PPP1CC	-1,59	0,040
HADH	-2,44	0,001	PSMB2	-1,59	0,033
MCM6	-2,44	0,014	RAB14	-1,59	0,031
PSME2	-2,44	0,016	RPRD1B	-1,59	0,031
RPA3	-2,33	0,001	STAT1	-1,59	0,045
HLA-DRB1	-2,27	0,021	U2SURP	-1,59	0,026
API5	-2,22	0,000	ARF3	-1,56	0,017
H2AFZ	-2,17	0,045	ARF1	-1,56	0,017
H2AFV	-2,17	0,045	CCAR2	-1,56	0,011
MAL2	-2,17	0,018	MARS	-1,56	0,008
MCM3	-2,13	0,011	MRPL23	-1,56	0,041
STMN1	-2,13	0,025	NUP188	-1,56	0,028
CAPG	-2,08	0,003	PFKL	-1,56	0,011
DDX46	-2,08	0,002	RUVBL2	-1,56	0,006
FH	-2,08	0,009	SNX5	-1,56	0,018
GART	-2,08	0,001	SON	-1,56	0,006
MCM2	-2,08	0,015	MRPL13	-1,54	0,031
PSAP	-2,08	0,049	TNPO3	-1,54	0,028
RCC2	-2,08	0,002	VPS4B	-1,54	0,021
TNFAIP2	-2,08	0,039	DDX1	-1,52	0,020

AGL	-2,04	0,006	LMNB1	-1,52	0,043
C12orf10	-2,04	0,006	MATR3	-1,52	0,020
FMR1	-2,04	0,014	TXNL1	-1,52	0,005
MCM7	-2,04	0,049	XRCC6	-1,52	0,020
POLD1	-2,04	0,048	XRN2	-1,52	0,010
PSMB10	-2,04	0,003	YBX1	1,57	0,023
PSMG2	-2,04	0,027	CAT	1,58	0,046
ADRM1	-2,00	0,016	RPL31	1,58	0,037
CDK1	-2,00	0,002	DHRS7	1,59	0,026
DBI	-2,00	0,004	MYH9	1,60	0,019
H1FX	-2,00	0,039	CFH	1,67	0,046
GALK1	-1,96	0,045	RHOV	1,67	0,016
PMPCB	-1,92	0,004	CP	1,70	0,026
TMPO	-1,92	0,024	UNC45A	1,70	0,026
AK2	-1,89	0,003	FAM83H	1,74	0,036
ERAP1	-1,89	0,033	PCYT1A	1,74	0,008
GTPBP1	-1,89	0,005	CD44	1,79	0,006
NADK2	-1,89	0,033	BASP1	1,80	0,009
EIF4B	-1,85	0,017	SERPINA3	1,80	0,045
LAP3	-1,85	0,014	LAMB1	1,81	0,017
MDH1	-1,85	0,028	IGHM	1,86	0,011
PDXK	-1,85	0,022	PLG	1,87	0,043
PTCD1	-1,85	0,003	C4B	1,90	0,044
ATP5MF	-1,85	0,003	PTK7	1,90	0,038
UFD1	-1,85	0,016	TPM4	1,93	0,026
ALDH2	-1,82	0,014	MMP9	1,98	0,046
ASNA1	-1,82	0,003	TGFBI	2,01	0,021
BOLA2	-1,82	0,033	KRT6C	2,02	0,027
CDC73	-1,82	0,018	KRT9	2,04	0,046
IDH2	-1,82	0,005	PXDN	2,04	0,025
IPO9	-1,82	0,041	C9	2,08	0,044
NUMA1	-1,82	0,029	MRPL44	2,11	0,010
SARS	-1,82	0,024	HP	2,12	0,007
BUB3	-1,79	0,004	HSPH1	2,13	0,026
HNRNPA0	-1,79	0,002	ITGB4	2,14	0,036
MAGOHB	-1,79	0,008	TUBA4A	2,14	0,008
BLVRA	-1,75	0,041	KRT6A	2,15	0,033

PAXX	-1,75	0,021	LTF	2,17	0,046
CNDP2	-1,75	0,004	MYO1B	2,18	0,001
MOB1A	-1,75	0,022	FSCN1	2,24	0,036
MOB1B	-1,75	0,022	MPO	2,36	0,027
MT-CO2	-1,75	0,043	C8G	2,40	0,013
PEBP1	-1,75	0,020	DSG1	2,40	0,006
PYCARD	-1,75	0,040	MYH11	2,43	0,029
DHX15	-1,72	0,022	C4BPA	2,52	0,017
DSG2	-1,72	0,031	KRT16	2,59	0,016
HDAC1	-1,72	0,017	KRT14	2,61	0,009
THUMPD1	-1,72	0,045	TPBG	2,76	0,015
ABCD3	-1,69	0,036	FGG	2,87	0,019
OAS3	-1,69	0,035	NAMPT	2,91	0,049
RBM12B	-1,69	0,022	FGB	2,93	0,034
SAMHD1	-1,69	0,006	PRTN3	2,93	0,031
HECTD3	-1,67	0,027	DEFA1	3,24	0,033
HUWE1	-1,67	0,003	DEFA3	3,24	0,033
PA2G4	-1,67	0,017	MIF	3,73	0,002
RBMX	-1,67	0,011	PC	3,78	0,001
RBMXL1	-1,67	0,011	LAMA3	3,85	0,010
TRIM28	-1,67	0,011	KRT17	4,13	0,005
AKR7A2	-1,64	0,019	JUP	4,13	0,005
HNRNPAB	-1,64	0,032	LAMB3	4,35	0,019
HNRNPD	-1,64	0,031	DMD	4,87	0,013
KPNA2	-1,64	0,021			