

**PANORAMA IMUNOLÓGICO, TRANSCRICIONAL E
MUTACIONAL DO MICROAMBIENTE TUMORAL
EM CARCINOMA OROFARÍNGEO DE CÉLULAS
ESCAMOSAS ASSOCIADO OU NÃO
A INFECÇÃO PELO HPV**

NATALIA SILVA ALVES

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente para
obtenção de Título de Mestre em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Kenneth John Gollob

Coorientador: Dr. Luiz Paulo Kowalski

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino e Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

A474p Alves, Natalia Silva
Panorama imunológico, transcricional e mutacional do microambiente tumoral em carcinoma orofaríngeo de células escamosas associado ou não a infecção pelo HPV/ Natalia Silva Alves - São Paulo, 2021.
114p.
Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.
Orientador: Dr. Kenneth John Gollob

Descritores. 1. Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço/Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck. 2. Papiloma de Células Escamosas/Papilloma. 3. Fenômenos do Sistema Imunológico/Immune System Phenomena. 4. Fenômenos Imunogenéticos/Immunogenetic Phenomena. 5. Imunomodulação/Immunomodulation

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

“For a research worker, the unforgotten moments of life are those rare ones which come after years of plodding work, when the veil over nature’s secret seems suddenly to lift, and when what was dark and chaotic appears in a clear and beautiful light and pattern”.

Gerty R. Cori

Dedico esse trabalho ao meu querido amigo e anjo da guarda que há pouco desencarnou em decorrência de um carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, mas que muito me ensinou em como se reerguer diante das adversidades da vida e a lutar pelos ideais em que se acredita.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos pesquisadores Dr. Kenneth John Gollob e Dr. Luiz Paulo Kowalski pela orientação, oportunidade, ensinamentos e incentivo a pesquisa científica.

Agradeço à banca avaliadora pelo aceite em avaliar esse trabalho e pelas contribuições durante a qualificação e a defesa da dissertação.

Agradeço a todos os integrantes que passaram pelos grupos de Imuno-oncologia Translacional e Biologia Computacional e Bioinformática e demais colaboradores por todas as discussões e contribuições individuais ou coletivas, especialmente àqueles que auxiliaram direta ou indiretamente no desenvolvimento desse trabalho.

Agradeço a minha amiga e colaboradora Gabriela pelo apoio, as muitas discussões de dados e resultados, as análises, mais discussões de dados e resultados e principalmente pela sua amizade! Um obrigado especial também aos amigos Glauco, Juliana, Wallax e Kátia pelo apoio intelectual, carinho e paciência!

Agradeço aos professores e demais profissionais do Programa de Pós-Graduação do A.C. Camargo Cancer Center pela formação acadêmica e científica.

Agradeço às agências de fomento à pesquisa que apoiaram esse projeto: à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (processo n° 2019/11207-1) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Agradeço a todos os queridos amigos que sempre me apoiaram independentemente de estarem fisicamente próximos ou distantes, não apenas durante esse percurso, mas em minha vida. Obrigada pelos momentos de aprendizado, carinho, empatia, companheirismo e principalmente pela amizade!

Agradeço a meus pais Renata Leonor Tavares Silva e Bruno da Silva Nunes, ao meu avô João Francisco da Silva, as minhas irmãs Marina Silva Alves e Aline Silva Nunes pela instrução, o carinho e a força para que essa etapa fosse concluída com muitos aprendizados e boas experiências! Aos demais familiares tão queridos, o meu muito obrigada pelo apoio e carinho!

Por fim, agradeço também com muita consideração aos voluntários que, ao acreditarem no poder transformador e inovador da ciência, cederam as amostras biológicas e tornaram possível a realização desse estudo!

RESUMO

Alves, N. S. **Panorama imunológico, transcricional e mutacional do microambiente tumoral em carcinoma orofaríngeo de células escamosas associado ou não a infecção pelo HPV.** [Dissertação]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2021.

Os tumores de cabeça e pescoço ainda exibem uma alta incidência no Brasil e no mundo. O carcinoma orofaríngeo de células escamosas possui, como um dos seus fatores de risco, a infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV). Pacientes com carcinoma de orofaringe associados a infecção pelo HPV geralmente apresentam um melhor prognóstico e probabilidade de sobrevida quando comparados aos pacientes não infectados pelo HPV. A resposta imune do hospedeiro, o panorama transcricional e mutacional podem esclarecer algumas dessas diferenças observadas entre os tumores de orofaringe relacionados ou não à infecção pelo HPV. Esse estudo abrange uma extensa análise *in silico* a partir de dados disponíveis no repositório público O Atlas do Genoma do Câncer (TCGA ou *The Cancer Genome Atlas*) de 66 pacientes com carcinoma orofaríngeo de células escamosas HPV- e HPV+ (estádios cTNM I, II, III ou IV) em que o panorama transcricional e mutacional foi analisado e comparado. Foi observado nos pacientes HPV- uma predominância na abundância das populações imunes inatas e também estromais (como os fibroblastos) e um padrão de resposta imune inflamatório agudo e associado a lesão celular (em que os marcadores *IL8*, *IL1B* e *IL1A* se mostravam diferencialmente expressos e aumentados nesse grupo). Por outro lado, os pacientes HPV+ apresentaram uma predominância na abundância das populações imunes adaptativas (particularmente de linfócitos T CD8) e um padrão de resposta imune inflamatório crônico (em que os marcadores *IFNG*, *GZMB*, *NFKB2*, *RELB*, *PDCD1* e *CTLA4* se mostravam diferencialmente expressos e aumentados nesse grupo). A análise mutacional apontou duas assinaturas mutacionais (Assinaturas 2 e 13) atribuídas à atividade da família de citidinas deaminases AID/APOBEC como presentes nas amostras analisadas. O grupo HPV+ se mostrou especialmente exposto a Assinatura Mutacional 2. O papel desempenhado pelas APOBECs da família 3 foi melhor investigado no contexto do carcinoma de orofaringe associado à infecção pelo HPV e os genes das APOBEC3s se apresentaram diferencialmente expressos e aumentados nos tumores HPV+. Os dados gerados foram então integrados através da regressão logística binomial que mostrou que o *status* viral positivo se associou a uma resposta imune de padrão mais adaptativo e inflamatório crônico, com infiltração de linfócitos T CD8 no tumor e também com a presença

da Assinatura Mutacional 2. O padrão de resposta imune adaptativo e inflamatório crônico encontrado nos pacientes com tumores HPV+ foi independente da infiltração de linfócitos T CD8 e da Assinatura Mutacional 2 e o infiltrado de linfócitos T CD8 observado nos pacientes com *status* viral positivo também não pareceu ser dependente da Assinatura Mutacional 2. Dessa forma, o presente trabalho demonstrou os principais aspectos que caracterizam os distintos panoramas imunológicos, transcricionais e mutacionais do carcinoma orofaríngeo de células escamosas associado ou não a infecção pelo HPV.

Descritores: Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço, Papiloma de Células Escamosas, Fenômenos do Sistema Imunológico, Fenômenos Imunogenéticos e Imunomodulação.

ABSTRACT

Alves, N. S. **Immunological, transcriptional and mutational panorama of the tumor microenvironment in oropharyngeal squamous cell carcinoma associated or not with HPV infection.** [Dissertation]. São Paulo: Antônio Prudente Foundation; 2021.

Head and neck tumors still exhibit a high incidence in Brazil and worldwide. The oropharyngeal squamous cell carcinoma has, as one of its risk factors, the human papillomavirus (HPV) infection. Patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma HPV-associated generally exhibit a better prognosis and survival probability when compared with patients not infected with HPV. The host's immune response, the transcriptional and mutational landscape may clarify some of these differences observed between oropharyngeal tumors related or not with HPV infection. This study covers an extensive *in silico* analysis based on available data from the public repository The Cancer Genome Atlas (TCGA) of 66 patients with HPV- and HPV+ oropharyngeal squamous cell carcinoma (cTNM stages I, II, III, or IV) in which the transcriptional and mutational panorama was analyzed and compared. A predominance in the innate and stromal immune populations abundance (such as fibroblasts) was observed in HPV- patients, as well as an acute inflammatory immune response pattern associated with cell damage (in which the markers *IL8*, *IL1B*, and *IL1A* were differentiated expressed and increased in this group). On the other hand, the HPV+ patients showed a predominance in the adaptive immune population abundance (particularly CD8 T lymphocytes) and a pattern of chronic inflammatory immune response (in which the *IFNG*, *GZMB*, *NFKB2*, *RELB*, *PDCD1*, and *CTLA4* markers were differentiated expressed and increased in this group). The mutational analysis pointed out two mutational signatures (Signatures 2 and 13) attributed to the activity of the cytidine deaminases AID/APOBEC family as existing in the analyzed samples. The HPV+ group was especially exposed to the Mutational Signature 2. The role played by the third family of APOBECs was better investigated in the context of the oropharyngeal carcinoma associated with HPV infection and the APOBEC3s genes were differentially expressed and increased in the HPV+ tumors. The generated data were then integrated through binomial logistic regression and showed that the positive viral *status* was associated with an adaptive immune response and chronic inflammation pattern, with CD8 T lymphocytes tumoral infiltration, and with the Mutational Signature 2 presence. The adaptive and chronic inflammatory immune response pattern found in HPV+ patients was independent of the CD8 T lymphocytes infiltration and of

the Mutational Signature 2 and the CD8 T lymphocytes infiltration observed in patients with positive viral *status* also did not appear to be dependent on the Mutational Signature 2. Thus, the present work demonstrated the main aspects that characterize the distinct immunological, transcriptional and mutational oropharyngeal squamous cell carcinoma panorama, associated or not with HPV infection.

Keywords: Squamous Cell Carcinoma of Head and Neck, Papilloma, Immune System Phenomena, Immunogenetic Phenomena and Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reprodução anatômica das principais regiões em Cabeça e Pescoço acometidas pelo carcinoma de células escamosas.	2
Figura 2	Reprodução anatômica das regiões que constituem a orofaringe.	4
Figura 3	Genoma do vírus do papiloma humano.....	7
Figura 4	Principais componentes da imunovigilância e resposta imune antitumoral.	13
Figura 5	Localização e mecanismo de ação da família de citidinas deaminases APOBEC..	23
Figura 6	Fluxograma que apresenta o delineamento experimental <i>in silico</i> desse estudo...	27
Figura 7	Curva de sobrevida global em função do <i>status</i> viral.	33
Figura 8	Principais marcadores de inflamação/citotoxicidade e supressão/exaustão.	34
Figura 9	Principais marcadores pró e anti-inflamatórios.	36
Figura 10	Comparação entre os <i>scores</i> imune, estromal e de pureza de tumor entre os grupos.	37
Figura 11	Infiltrado inflamatório em tumores de pacientes HPV- e HPV+.	38
Figura 12	Infiltrado inflamatório em tumores de pacientes HPV- e HPV+.	39
Figura 13	Assinaturas mutacionais extraídas pela abordagem <i>de novo</i> do <i>software</i> MutationalPatterns.	40
Figura 14	Assinaturas mutacionais extraídas pela abordagem <i>de novo</i> do <i>software</i> SomaticSignatures.	41
Figura 15	Assinaturas mutacionais extraídas pela abordagem <i>de novo</i> do <i>software</i> signeR. .	42

Figura 16	Assinaturas mutacionais extraídas pela abordagem <i>de novo</i> do <i>software</i> SigProfiler.	43
Figura 17	Comparação das similaridades apresentadas pelas assinaturas extraídas <i>de novo</i> com as 30 assinaturas descritas pelo COSMIC (v2).	44
Figura 18	Comparação entre os padrões de assinaturas mutacionais em cada grupo (HPV- e HPV+) selecionados e analisados pela abordagem <i>fitting</i> realizada pelo <i>software</i> deconstructSigs.	45
Figura 19	Comparação dos níveis de expressão dos diversos membros da família APOBEC3s.	46
Figura 20	Representação gráfica dos DEGs a partir de um <i>Volcano Plot</i>	47
Figura 21	<i>Heatmap</i> do perfil transcricional imune do carcinoma orofaríngeo de células escamosas.	49
Figura 22	<i>Heatmaps</i> dos perfis inflamatórios e perfil transcricional por ABOBEC3s do carcinoma orofaríngeo de células escamosas.	51
Figura 23	Matrizes de correlação entre os <i>scores</i> gerados pelo <i>software</i> ESTIMATE e os valores de expressão normalizados das APOBEC3s.	53
Figura 24	Fluxograma delineando os principais achados encontrados nesse trabalho.	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Informações clínicas e histopatológicas das amostras de carcinoma de células escamosas de orofaringe disponíveis no TCGA.	32
Tabela 2	Regressão logística simples e múltipla das variáveis selecionadas.	55

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AJCC	Comitê Conjunto Americano sobre o Câncer (<i>American Joint Committee on Cancer</i>)
AID/APOBEC	Citidina deaminase induzida por ativação / apolipoproteína B tipo polipeptídeo catalítico de edição do RNAm (<i>Activation Induced cytidine Deaminase / APOlipoprotein B mRNA Editing Catalytic polypeptide-like</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAM	Mapas de alinhamento binário (<i>Binary Alignment Map</i>)
BER	Reparo por excisão de base (<i>Base Excision Repair</i>)
CDKN2A	Inibidor 2a da quinase dependente de ciclina (<i>Cyclin Dependent Kinase iNhibitor 2A</i>)
CDR3	Região determinante de complementaridade hipervariável 3 (<i>Complementarity-Determining Region 3</i>)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CI	Intervalo de confiança (<i>Confidence Interval</i>)
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
COSMIC	Catálogo de mutações somáticas no câncer (<i>Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer</i>)
COX2	Ciclo-oxigenase-2 (<i>CycloOXYgenase 2</i>)
cTNM	Estadiamento clínico TNM (<i>Clinical TNM Staging</i>)
DAMP	Padrões moleculares associados a danos (<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>)
DEGs	Genes diferencialmente expressos (<i>Differentially Expressed Genes</i>)
DNaseq	Sequenciamento de DNA (<i>DNA sequencing</i>)
EBV	Vírus Epstein-Barr (<i>Epstein-Barr Virus</i>)
FDA	Administração de comidas e remédios (<i>Food and Drug Administration</i>)
FPKM	Fragments por quilo base por milhão (<i>Fragments Per Kilobase Million</i>)
HBV	Vírus da hepatite B (<i>Hepatitis B Virus</i>)
HIF	Fatores induzidos por hipóxia (<i>Hypoxia-Inducible Factors</i>)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana (<i>Human Immunodeficiency Virus</i>)
HLA	Antígeno leucocitário humano (<i>Human Leukocyte Antigen</i>)

HNSC	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (<i>Head-Neck Squamous Cell</i>)
HPV	Vírus do papiloma humano (<i>Human PapillomaVirus</i>)
IFN	Interferon
IFN-α	Interferon alfa
IFN-β	Interferon beta
IFN-γ	Interferon gama
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade (<i>Major Histocompatibility Complex</i>)
microRNAseq	Sequenciamento de microRNA (<i>microRNA sequencing</i>)
MMR	Defeitos no reparo de DNA por pareamento incorreto (<i>DNA Mismatch Repair</i>)
NCI	Instituto Nacional do Câncer (<i>National Cancer Institute</i>)
NGS	Sequenciamento de nova geração (<i>Next Generation Sequencing</i>)
NHGRI	Instituto nacional de pesquisa do genoma humano (<i>National Human Genome Research Institute</i>)
NK cell	Célula exterminadora natural (<i>Natural Killer cell</i>)
NMF	Fatoração de matriz não negativa (<i>Non-negative Matrix Factorization</i>)
OPSCC	Carcinoma orofaríngeo de células escamosas (<i>Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma</i>)
OR	Razão de chances (<i>Odds Ratio</i>)
ORF	Fase de leitura aberta (<i>Open Reading Frame</i>)
p16^{INK4a}	Proteína p16
PCR	Reação em cadeia da polimerase (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PD-1	Proteína de morte celular programada 1 (<i>Programmed cell Death protein 1</i>)
PDK1	Proteína quinase-1 dependente de fosfoinosítídeo (<i>Phosphoinositide-Dependent Kinase-1</i>)
PD-L1	Ligante de morte programada 1 (<i>Programmed Death-Ligand 1</i>)
PET-Scan	Tomografia por emissão de pósitrons (<i>Positron Emission Tomography</i>)
PIP₃	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (<i>Phosphatidylinositol-3,4,5-trisPhosphate</i>)
pRB	Proteína do retinoblastoma (<i>RetinoBlastoma protein</i>)

PRR	Receptores de reconhecimento padrão (<i>Pattern Recognition Receptors</i>)
cTNM	Estadiamento clínico TNM (<i>Clinical TNM Staging</i>)
RNA_m	RNA mensageiro
RNAseq	Sequenciamento de RNA (<i>RNA sequencing</i>)
SBS	Substituição de base única (<i>Single Base Substitution</i>)
SNV	Variantes de nucleotídeo único (<i>Single-Nucleotide Variants</i>)
ssGSEA	Análise de enriquecimento de conjunto de genes de amostra única (<i>single-sample Gene Set-Enrichment Analysis</i>)
TAM	Macrófagos associados ao tumor (<i>Tumor-Associated Macrophages</i>)
TCGA	O atlas do genoma do câncer (<i>The Cancer Genome Atlas</i>)
TCGA-MC3	Descrição de mutações multicêntricas em vários tipos de câncer do TCGA (<i>TCGA Multi-Center Mutation Calling in Multiple Cancers</i>)
TCR	Receptor de célula T (<i>T-Cell Receptor</i>)
T_{fh}	Célula T auxiliar folicular (<i>T follicular helper cell</i>)
TILs	Linfócitos infiltrantes tumorais (<i>Tumor Infiltrating Lymphocytes</i>)
TLS	Síntese de DNA translesão (<i>Translesion DNA Synthesis</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa (<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>)
TNM	Tumor, nodo, metástase
Treg	Célula T regulatória
UICC	União para o controle internacional do câncer (<i>Union for International Cancer Control</i>)
UNG	Uracil DNA glicosilase (<i>Uracil-DNA Glycosylase</i>)
URR	Região regulatória a montante (<i>Upstream Regulatory Region</i>)
UV	Ultravioleta
Vif	Fator de Infectividade Viral (<i>Viral Infectivity Factor</i>)

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aspectos epidemiológicos e biológicos sobre o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço	1
1.2	Considerações sobre o carcinoma orofaríngeo de células escamosas	3
1.3	Aspectos da atuação do vírus do papiloma humano no carcinoma de células escamosas de orofaringe e cabeça e pescoço	6
1.4	Mecanismos de resposta imunológica para o combate e controle de tumores em geral e do carcinoma orofaríngeo de células escamosas	11
1.5	Propriedades relacionadas às características moleculares distintas entre tumores de orofaringe HPV- e HPV+	16
1.6	Impacto mutacional e molecular associado a atividade da família de citidinas deaminases APOBEC3s	20
2.	OBJETIVOS	25
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
3.	MATERIAL E MÉTODOS	26
3.1	Obtenção dos dados	26
3.2	Classificação do <i>status</i> viral em HPV- e HPV+	27
3.3	Classificação do <i>status</i> de tabagismo	28
3.4	Normalização e comparação de genes imunes	28
3.5	Determinação dos <i>scores</i> imune, estromal e de pureza de tumor	28
3.6	Estimativa da abundância de infiltrado inflamatório	29
3.7	Análise mutacional	29
3.8	Análise de expressão diferencial	29
3.9	Forma de análise de resultados	30
4.	RESULTADOS	31
5.	DISCUSSÃO	57

5.1	Algumas características clínicas se apresentaram distintas entre os pacientes com tumores HPV- e HPV+.....	57
5.2	O carcinoma orofaríngeo HPV+ apresentou infiltração inflamatória mais extensa e um padrão de resposta imune mais inflamatório crônico enquanto que o HPV- apresentou um padrão de resposta imune mais inflamatório agudo	58
5.3	Foi observado diferenças no panorama mutacional apresentado em tumores HPV- e HPV+.....	66
5.4	A família de citidinas deaminases APOBEC3 exibiu níveis de expressão e comportamento distintos entre os pacientes HPV- e HPV+	69
5.5	A associação entre o <i>status</i> viral com um perfil transcriptômico inflamatório crônico e com a infiltração de linfócitos T CD8 abre uma série de perspectivas para esse trabalho	74
6.	CONCLUSÃO	79
7.	REFERÊNCIAS	80

ANEXOS

Anexo 1 Documento de permissão para uso das Figuras 1 e 2 nessa dissertação

Anexo 2 Documento de permissão para uso da Figura 5B nessa dissertação

Anexo 3 Documentos da aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa

APÊNDICES

Apêndice 1 Matriz com os valores quantificados da similaridade entre as assinaturas mutacionais extraídas *de novo* e as assinaturas mutacionais presentes no catálogo COSMIC (v2)

Apêndice 2 Quadro com os valores de log₂FoldChange e p-valor ajustado da análise diferencial de genes conduzida pelo *software* DESeq2

Apêndice 3 Quadro com os valores do coeficiente de correlação de Spearman e p-valor das correlações entre os scores gerados pelo *software* ESTIMATE e os valores de expressão normalizados das APOBEC3s dos pacientes com tumores HPV- (à esquerda) e HPV+ (à direita)

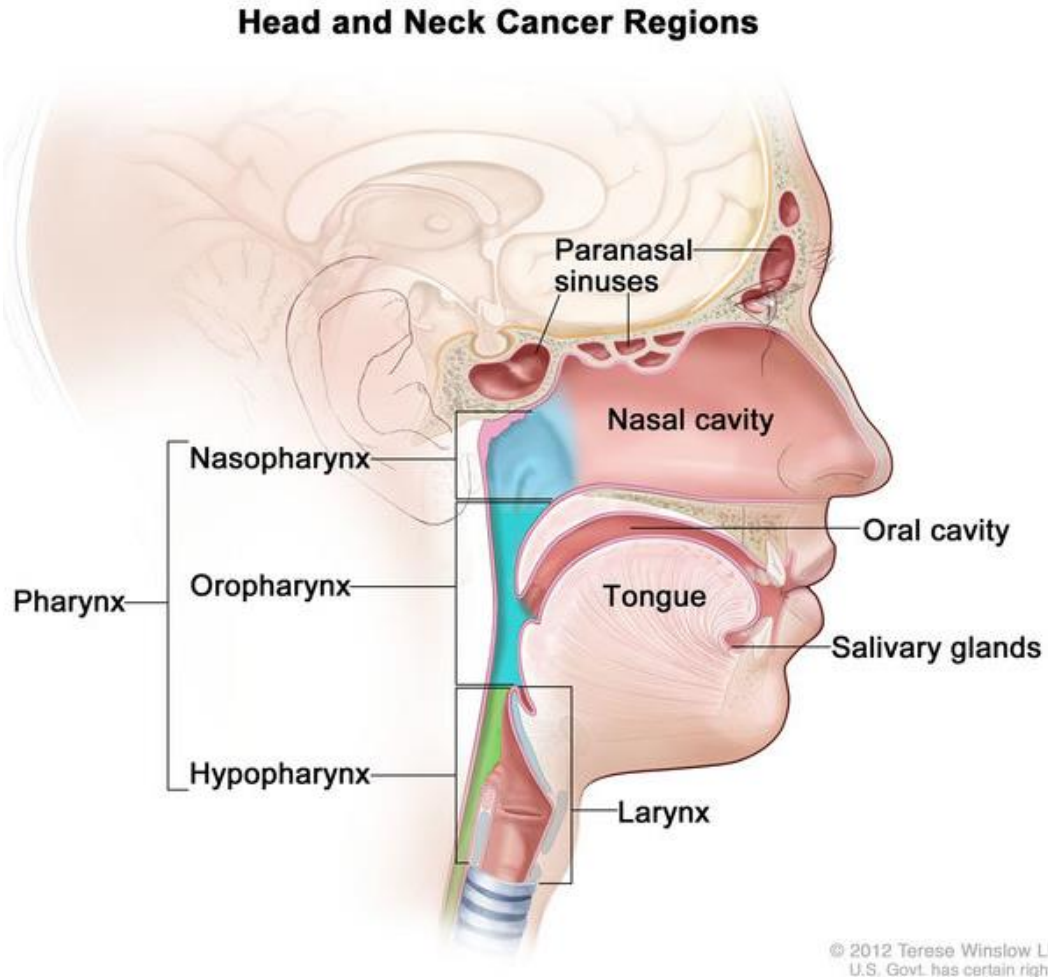
1. INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E BIOLÓGICOS SOBRE O CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO

Um dos grandes desafios atuais para os sistemas de saúde de vários países está no controle das doenças não transmissíveis crônicas tais como as neoplasias. No mundo, os casos de câncer foram responsáveis pela segunda maior causa de mortes por doenças não transmissíveis, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares. Apenas no ano de 2018, foram estimados 18,1 milhões de novos casos de câncer e 9,6 milhões de mortes em todo o mundo ^{1,2}. Já no Brasil e no ano de 2018, o Instituto Nacional do Câncer estimou aproximadamente 580.000 novos casos e 197.000 mortes devidos às neoplasias ³, e para cada ano no triênio 2020-2022, o Instituto Nacional do Câncer estimou aproximadamente 625.000 novos casos de câncer (450.000 sem considerar os tumores de pele não melanoma) ⁴. Os avanços da medicina aliados ao aumento da expectativa de vida observado em vários países, além dos hábitos de vida relacionados ao tabagismo, sedentarismo, estilo de vida estressante, contato com agentes infecciosos além de outros exemplos explica, em parte, tal aumento dos casos de câncer em todo o mundo ^{5,6}.

Os tumores de cabeça e pescoço são caracterizados como um grupo de neoplasias malignas que acometem o trato aerodigestivo superior que, por sua vez, é constituído pela cavidade nasal (e seios paranasais), faringe (incluindo nasofaringe, orofaringe e hipofaringe), lábio, cavidade oral, glândulas salivares e laringe (Figura 1) ^{7,8}. Mais de 90% desses tumores são classificados como carcinomas de células escamosas (carcinomas epidermóides), caracterizados pela presença de células achatadas e delgadas que recobrem epitélios como a superfície da pele, trato gastrointestinal e respiratório, além de diversos órgãos abdominais ⁹⁻¹². Tal fato pode sugerir que os carcinomas de cabeça e pescoço são relativamente homogêneos, porém, trabalhos mais recentes que comparam o perfil genômico e transcriptômico entre as diferentes localizações na região de cabeça e pescoço demonstrou que tais tumores são, em essência, heterogêneos e com diferentes padrões de expressão de proteínas já bem conhecidas na oncologia como o EGFR, p53, proteína do retinoblastoma (pRb ou *RetinoBlastoma protein*) além da própria influência causadas pela infecção do vírus do papiloma humano (HPV ou

Human Papillomavirus), que não é igualmente prevalente em todas as regiões de cabeça e pescoço ¹³.



Fonte: © (2012) Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights.

Legenda: *Head and Neck Cancer Regions*: regiões de câncer de cabeça e pescoço, *Pharynx*: faringe, *Nasopharynx*: nasofaringe, *Oropharynx*: orofaringe, *Hypopharynx*: hipofaringe, *Paranasal sinuses*: seios paranasais, *Nasal cavity*: cavidade nasal, *Oral cavity*: cavidade oral, *Tongue*: língua, *Salivary glands*: glândulas salivares e *Larynx*: laringe.

Figura 1 – Reprodução anatômica das principais regiões em cabeça e pescoço acometidas pelo carcinoma de células escamosas. São indicadas as áreas da cavidade nasal (e seios paranasais), faringe (incluindo nasofaringe, orofaringe e hipofaringe), língua, cavidade oral, glândulas salivares e laringe. A permissão para reprodução dessa imagem encontra-se no Anexo 1.

A incidência mundial do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço está em torno de 600.000 casos anuais, com uma taxa de mortalidade que alterna de 40 à 50%, além de ser muito mais incidente na população masculina comparada à feminina ^{14,15}. Dos tumores de

cabeça e pescoço, em relação ao carcinoma epidermoide oral e de orofaringe, durante o ano de 2018 foram estimadas aproximadamente 14.700 novos casos e 5.900 mortes no Brasil ³, e para o triênio 2020-2022, foram estimados 15.190 novos casos de carcinoma em cavidade oral e orofaringe ⁴.

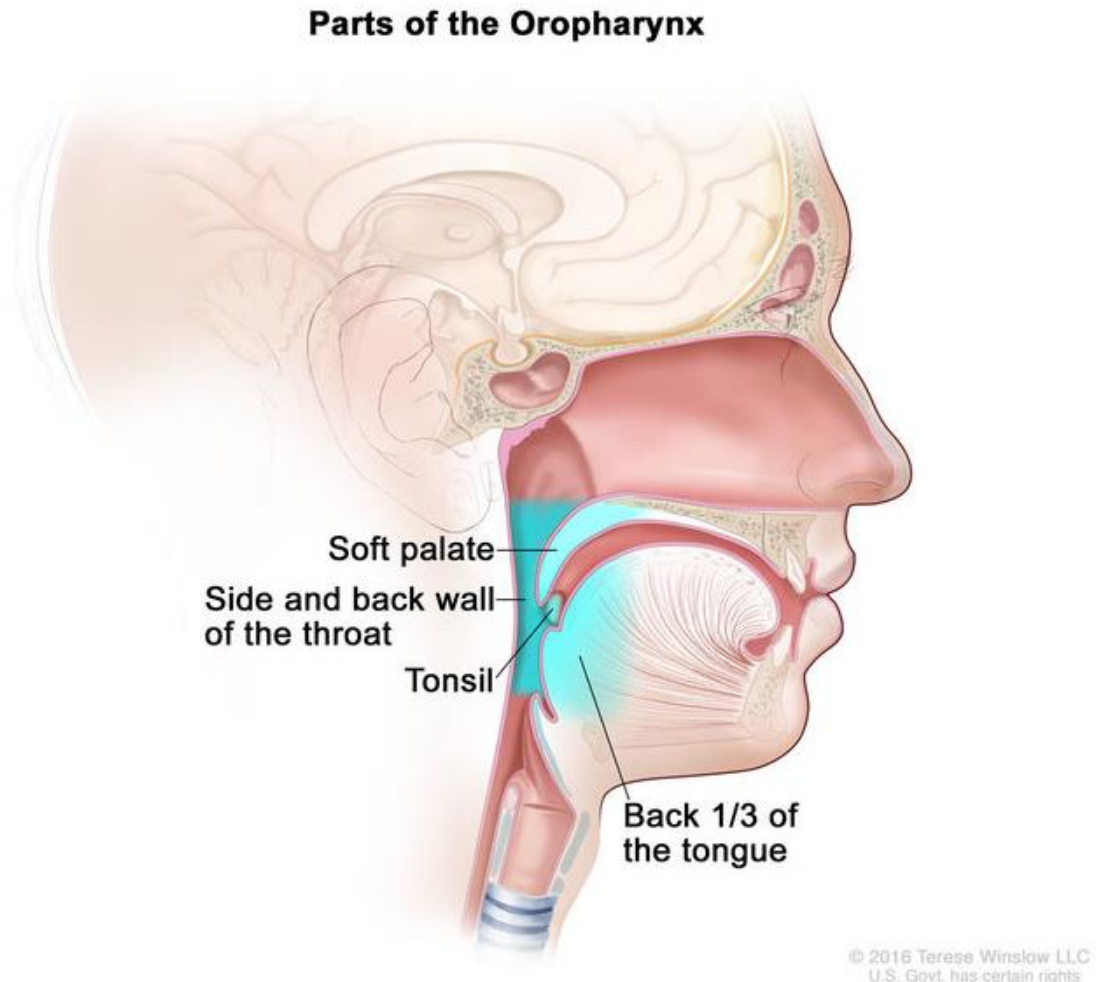
Um aspecto importante ao se estudar tumores é o sistema Tumor, Nodo, Metástase (TNM) de classificação de tumores malignos desenvolvida por Pierre Denoix entre 1943 e 1952. Esse sistema de classificação é frequentemente revisado e publicado como protocolo de classificação clínica ou patológica de tumores pela União para o Controle Internacional do Câncer (UICC ou *Union for International Cancer Control*), órgão afiliado à Organização Mundial da Saúde, além de também ser incorporado ao Comitê Conjunto Americano sobre o Câncer (AJCC ou *American Joint Committee on Cancer*). O propósito desse sistema é de padronizar os sistemas de classificação e facilitar no planejamento do tratamento além de prover informações sobre o prognóstico do paciente. Tal classificação pode ocorrer a partir das características clínicas do tumor (estadiamento clínico, cTNM ou TNM) ou a partir da análise de material biológico obtido por excisão cirúrgica (estadiamento patológico, pTNM). No sistema TNM, avalia-se a extensão do tumor primário (T), a presença/ausência e extensão do comprometimento linfonodal (N) e a presença/ausência de metástases distantes. Para cada um desses itens, subclassificações são descritas. A classificação final do sistema TNM varia em cinco amplas categorias que variam de 0 a IV, em que quanto maior for o seu valor, maior será a gravidade atribuída ao caso ¹⁶⁻¹⁸.

1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O CARCINOMA OROFARÍNGEO DE CÉLULAS ESCAMOSAS

Dentre os carcinomas epidermóides, o carcinoma orofaríngeo de células escamosas (OPSCC ou *oropharyngeal squamous cell carcinoma*) tem adquirido evidência devido à sua associação com o HPV e em consequência disso, os carcinomas de células escamosas orais e de orofaringe tem sido classificados como carcinomas distintos com características clínicas e histopatológicas diferenciadas ¹².

A orofaringe é constituída pelo palato mole, tonsilas palatinas, pilares tonsilares, parede posterior da orofaringe e base da língua (Figura 2) e nela, muitos tipos de neoplasias podem se desenvolver, desde tumores benignos, lesões pré-cancerosas (tais como as hiperplasias,

leucoplasias e eritroplasias) e neoplasias malignas, com predomínio do carcinoma de células escamosas ^{11,19,20}.



Fonte: © (2016) Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights.

Legenda: *Parts of the Oropharynx*: partes da orofaringe, *Soft palate*: palato mole, *Side and back wall of the throat*: parte lateral e posterior da garganta, *Tonsil*: tonsila e *Back 1/3 of the tongue*: base de língua (um terço da parte posterior da língua).

Figura 2 – Reprodução anatômica das regiões que constituem a orofaringe. São indicadas as áreas do palato mole, a parte lateral e posterior da garganta, as tonsilas e a base da língua (aproximadamente um terço da língua). A permissão para reprodução dessa imagem encontra-se no Anexo 1.

Os principais agentes etiológicos relacionados ao desenvolvimento do carcinoma orofaríngeo de células escamosas são a exposição ao tabaco e tabaco sem fumo (consumido através da mastigação, inalação ou contato com a mucosa oral e orofaríngea) em ação sinérgica com o álcool ²¹⁻²⁴.

Apesar de que muitos tumores de cabeça e pescoço ainda são mais incidentes em pacientes mais idosos, o carcinoma orofaríngeo de células escamosas, ao longo dos últimos

anos, tem apresentado maior incidência em populações mais jovens, especialmente abaixo dos 45 anos e que não foram expostos aos tradicionais hábitos de risco tais como tabagismo e alcoolismo^{25,26}. Tal transição ocorre principalmente devido ao aumento das infecções pelo HPV nessa população^{27,28}.

Os principais sintomas do carcinoma orofaríngeo de células escamosas são caracterizados por uma lesão ulcerada que não cicatriza, disfagia, odinofagia, dificuldade de movimentar a língua, perda de peso, aparecimento de nódulos no pescoço, tosse com hemoptise entre outros. O diagnóstico e estadiamento do tumor pode ser realizado através da combinação de exame físico e análise do histórico do paciente, tomografia por emissão de pósitrons (*PET-Scan* ou *Positron Emission Tomography*), ressonância magnética, biópsia e até mesmo por meio de outras estratégias não invasivas como as biópsias líquidas e a detecção de DNA tumoral circulante, tecnologia ainda em desenvolvimento e alvo de estudos intensos, embora com baixas taxas de sucesso^{29,30}.

As formas disponíveis de tratamento variam desde as já tradicionais técnicas estabelecidas tais como a cirurgia (inclusive por cirurgia robótica transoral)^{31,32}, além de radioterapia ou associação de quimioterapia com radioterapia (neoadjuvante ou concomitante). Tal forma padrão de tratamento de tumores de orofaringe (químio e/ou radioterapia definitiva ou pós-operativa) pode também levar ao desenvolvimento de efeitos colaterais que variam desde aqueles relacionados à toxicidade aguda (mucosite e perda de paladar) à problemas crônicos como disfunção renal, perda de audição, disfagia, arteriosclerose entre outros efeitos³³.

Atualmente, também empregam-se terapias mais refinadas e modernas como a terapia alvo e a imunoterapia por meio do uso de Cetuximabe (anticorpo α -EGFR), Nivolumabe (anticorpo α -PD-1) e Pembrolizumabe (anticorpo α -PD-1) com inclusive aprovação da agência de vigilância sanitária americana (FDA ou *Food and Drug Administration*)^{29,34-36} e da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), que também aprova a administração de Pembrolizumabe, Nivolumabe e Cetuximabe em tumores de cabeça e pescoço com doença recidivada ou metastática³⁷⁻³⁹. Dessa forma, essas novas abordagens de terapia surgiram para explorar novos pontos de vulnerabilidade dos tumores e melhorar a qualidade de vida dos pacientes. A proteína de morte celular programada 1 (PD-1 ou *Programmed Death 1*) é um importante componente dos mecanismos de regulação da resposta imune, exibindo um papel fundamental na auto tolerância, além de regular a ativação de diversas populações imunes como as de linfócitos T e B⁴⁰. O ligante de morte programada 1 (PD-L1 ou *Programmed Death-Ligand 1*) é um biomarcador capaz de interagir com o seu receptor PD-1 cuja interação permite

as células tumorais escaparem da resposta imune. Entre 50-60% dos tumores de cabeça e pescoço expressam PD-L1. Entre os tumores de cabeça e pescoço HPV+, 70% expressam PD-L1 ⁴¹. Por essa razão, esses imunoterápicos já foram aprovados para tratamento em cabeça e pescoço, porém muitos outros testes clínicos envolvendo estratégias imunoterápicas estão atualmente em andamento ⁴². Apesar de que os tumores de orofaringe HPV+ possuem melhor prognóstico quando comparados aos tumores HPV-, as recomendações de terapia ainda são atualmente similares entre os dois grupos ³³.

Os carcinomas em orofaringe podem ser classificados de acordo com as características moleculares e epidemiológicas que eles apresentam (HPV+ e HPV-). Enquanto os tumores em orofaringe HPV- são epidemiologicamente similares a outros carcinomas de células escamosas de etiologia associada ao tabagismo e etilismo também encontrados em outras localizações do trato aerodigestivo superior, os tumores em orofaringe HPV+ se desenvolvem devido a exposição a infecção pelo vírus do HPV de forma independente ao consumo de tabaco e de bebidas alcoólicas ^{43,44}.

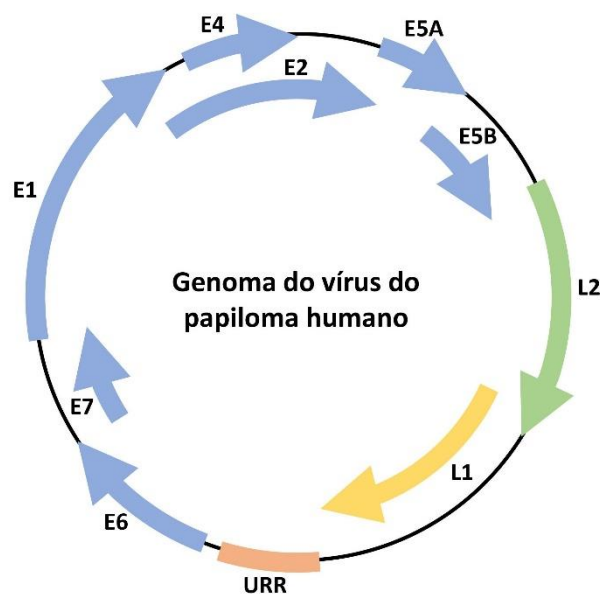
1.3 ASPECTOS DA ATUAÇÃO DO VÍRUS DO PAPILOMA HUMANO NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE OROFARINGE E CABEÇA E PESCOÇO

Os vírus podem, por diferentes mecanismos moleculares, induzir o desenvolvimento tumoral. Próximo de um quinto da incidência mundial de câncer está associada a alguma infecção viral ⁴⁵. Tais tumores são desencadeados a partir da infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV ou *Epstein-Barr Virus*), vírus da hepatite B (HBV ou *Hepatitis B Virus*), HPV além de outras espécies virais cujo papel molecular no desenvolvimento tumoral desperta cada vez mais o interesse da comunidade médica e científica.

A princípio, a família *Papovaviridae* abrangia os papillomavírus e os polyomavírus que são estruturalmente semelhantes, porém, devido a diferenças genéticas observadas por sequenciamento, tal família foi dividida em duas distintas famílias: a *Polyomaviridae* e a *Papillomaviridae*, em que o último inclui o vírus do papiloma humano ^{46,47}.

Os papillomavírus possuem características genéticas e estruturais similares. São formados por um capsídio icosaédrico não-envelopado, constituído por 72 capsômeros pentaméricos cujo diâmetro total aproxima-se de 52 a 55 nm, que envolve uma dupla fita de DNA de aproximadamente 8.000 pares de base complexados a histonas celulares. O genoma

dos HPVs contém oito fases de leitura aberta (ORF ou *Open Reading Frame*), dividida em três partes funcionais: a região inicial (E ou *early* que contém os genes *E1*, *E2*, *E4*, *E5* que se subdivide em *E5A* e *E5B*, *E6* e *E7*) codificadora de proteínas necessárias para a replicação e transcrição viral, a região tardia (L ou *late* que contém os genes *L1* e *L2*) codificadora de proteínas estruturais necessárias para a formação do capsídeo viral e uma região regulatória a montante (URR ou *Upstream Regulatory Region*) necessária para a regulação da replicação e transcrição do DNA viral (Figura 3) ⁴⁸⁻⁵². Os oncogenes virais *E6* e *E7* são os mais conhecidos e patogênicos descritos em HPV ⁵³.



Legenda: URR (*Upstream Regulatory Region*): região regulatória a montante.

Figura 3 – Genoma do vírus do papiloma humano. O genoma do vírus do papiloma humano é formado pelos genes E (*early* ou iniciais) que são os primeiros a serem transcritos e estão relacionados à virulência do HPV. São eles os genes, *E1*, *E2*, *E4*, *E5* (que se subdivide em *E5A* e *E5B*), *E6* e *E7*. Os genes L (*late* ou tardios) são genes expressos mais tardiamente e que codificam para proteínas estruturais que formam o capsídeo viral (*L1* e *L2*). Tais genes não são considerados virulentos.

Os papilomavírus são conhecidos por infectarem os epitélios mucoso e cutâneo de muitas espécies de vertebrados (que podem originar no aparecimento lesões) e pela capacidade de induzir proliferação celular (que pode promover o desenvolvimento de tecidos neoplásicos) ⁴⁸. A relação entre a infecção pelo HPV e o desenvolvimento tumoral foi primeiro descrita para o câncer cervical ^{48,54,55}, entretanto, mais recentemente, tal relação também foi relatada para o carcinoma orofaríngeo de células escamosas ^{48,56,57}.

De forma interessante, vários tumores do trato aerodigestivo superior estão tradicionalmente relacionados à exposição a tabaco e álcool. Uma vasta campanha de saúde

pública do governo dos Estados Unidos conseguiu reduzir as taxas de tabagismo na população de 40% durante a década de sessenta a até 20% nos dias mais recentes. Consequentemente, a incidência de tumores de cavidade oral, laringe e hipofaringe diminuiu ⁵⁸. Já no Brasil, a mortalidade associada ao uso do tabaco caiu em 57,8% (95%IC = 54,1% - 61,2%) entre os anos de 1990 e 2017 ⁵⁹, parte disso devido ao sucesso de sucessivas campanhas educativas e desencorajadoras do uso de tabacos no país. Porém o mesmo comportamento não foi observado para o carcinoma orofaríngeo de células escamosas, cuja incidência aumentou nos últimos anos ^{60,61}, chegando a um impressionante aumento de 225% na taxa de incidência para tumores de orofaringe HPV+ entre os anos de 1984 e 2004, enquanto que para os tumores de orofaringe HPV-, foi observado uma queda de até 50% na incidência durante o mesmo período ⁶². Um outro estudo com quase 4.000 indivíduos recentemente diagnosticados com carcinoma orofaríngeo de células escamosas, comprovou que a maioria desses casos eram formados por pacientes não expostos aos tradicionais hábitos de risco de tabagismo e etilismo ⁶³. Tal é a relevância da infecção pelo HPV que no ano de 2008, foram estimados 85.000 casos de carcinoma orofaríngeo de células escamosas em todo o mundo, desses, pelo menos 22.000 seriam HPV+ ⁶⁴.

A transmissão do HPV ocorre principalmente por meio do contato pele com pele. Diferente dos tumores associados à infecção do HPV em outras localizações, os tumores de cabeça e pescoço associados a infecção pelo HPV são transmitidos pela via oral, principalmente pelo contato da região oral com a região anogenital (vagina, pênis, ânus) ^{65,66}. Diferenças no comportamento sexual também foram descritas em relação à infecção do HPV. Grupos de indivíduos mais jovens (com menos de 55 anos de idade) apresentaram maior chance de se infectarem pelo HPV quando comparados à grupos mais velhos. O mesmo estudo mostrou que indivíduos jovens ou de meia idade praticavam mais sexo oral do que indivíduos mais velhos ⁶⁷. Quanto ao gênero, a soro-prevalência do HPV é maior em mulheres do que em homens e a transmissão do HPV de mulheres para homens parece ocorrer mais comumente do que de homens para mulheres ⁶⁸. Um outro estudo ocorrido nos Estados Unidos mostrou uma maior prevalência de infecção do HPV por vias orais em homens do que em mulheres ⁶⁹. Uma metanálise inclusive sugeriu que o aumento de parceiros sexuais também está relacionado com um risco aumentado de desenvolvimento de tumores de cabeça e pescoço ⁷⁰. A transmissão vertical de HPV também tem sido recentemente documentada. Em aproximadamente 32% de crianças nascidas de mães infectadas por HPV genital, foram detectados DNA viral, em que inclusive, mais da metade dessas crianças compartilhavam o mesmo tipo de HPV detectado em suas mães ⁷¹.

A vasta maioria dos indivíduos portadores de HPV controlam a infecção viral por meio do sistema imune e não chegam a desenvolver o carcinoma ⁷². Apesar de que a expressão dos genes dos capsídeos virais *L1* e *L2* auxiliam na proliferação viral, isso não é o suficiente para induzir a carcinogênese, que ocorre apenas com a integração do DNA viral e consequentemente a expressão dos oncogenes *E6* e *E7*, que se ligam às proteínas supressoras de tumor p53 e pRb, respectivamente ^{53,72}.

Além disso, a expressão dos genes virais *E6* e *E7* pode ser identificada através da expressão da proteína p16^{INK4a}, marcador que pode ser detectado por meio de um ensaio de imuno-histoquímica. Esse é o biomarcador mais difundido para a detecção de HPV em tecidos tumorais, uma vez que é altamente expresso em tumores de cabeça e pescoço HPV+ ⁷³. Essa proteína (do gene *CDKN2A*, inibidor 2A da quinase dependente de ciclina ou *Cyclin Dependent Kinase iNhibitor 2A*) exerce função no controle do ciclo celular ao inativar quinases dependentes de ciclina. Tais quinases podem fosforilar a proteína supressora de tumor de retinoblastoma pRB, que levaria ao bloqueio do ciclo celular ⁷⁴. Células que expressam o gene viral *E7*, apresentam alta transcrição do gene *CDKN2A* ⁷⁵. Dessa forma, a expressão de p16^{INK4a} indica a presença de integração do DNA viral no genoma da célula hospedeira ^{53,76}. Isso permite a distinção entre apenas identificar a presença de DNA viral e de fato identificar tecidos tumorais que estão expressando oncogenes virais ⁷⁷.

Atualmente, existem mais de 150 tipos de HPV descritos, em que a maioria está relacionada com o desenvolvimento de verrugas e outras condições benignas. Porém alguns tipos podem levar à formação de tumores. Vários desses tipos de HPV foram classificados em duas categorias principais quanto à carcinogênese: os de alto risco e os de baixo risco. Dessa classificação, 15 foram identificados como os tipos de alto risco mais prevalentes: HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35, HPV39, HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58, HPV59, HPV68, HPV73 e HPV82. E além disso, 12 foram denominados como os de baixo risco: HPV6, HPV11, HPV40, HPV42, HPV43, HPV44, HPV54, HPV61, HPV70, HPV72, HPV81 e HPVCP6108, ^{48,78,79}. O tipo HPV16 seguido pelos tipos HPV18 e HPV33 são os mais prevalentes e carcinogênicos na população mundial ^{48,57,80,81}. O tipo HPV16 está presente em um total de aproximadamente 85% dos casos de carcinoma orofaríngeo de células escamosas HPV+ ⁸². Em todo o mundo, cerca de 291 milhões de mulheres carregam DNA proveniente de HPV e dessas, cerca de 32% estão infectadas pelos tipos HPV16 ou HPV18 ou ambos ⁷⁹.

Pacientes com carcinoma orofaríngeo de células escamosas HPV+ (cuja prevalência recentemente se apresentou em torno de 59,1% em uma coorte brasileira) ⁸³ apresentam

características clínicas distintas (usualmente são indivíduos que não são/foram fumantes e não fazem uso crônico de álcool) de pacientes com esse mesmo carcinoma e HPV- (que geralmente apresentam ou apresentaram hábitos de tabagismo e etilismo). É observado também um melhor prognóstico e resposta aos tratamentos (em geral) em pacientes HPV+ possivelmente devido aos efeitos imunogênicos causados pela presença do vírus no organismo ^{26,84,85}. Além disso, tumores HPV+ tendem a apresentar características histopatológicas distintas de tumores HPV-, tais como baixa diferenciação, pouca queratinização e fenótipo basalóide (subtipo raro de carcinoma de células escamosas de comportamento agressivo) ⁸⁶. Entretanto tais características histopatológicas entre tumores de orofaringe HPV+ e HPV-, apesar de poderem auxiliar na definição do *status* de HPV, não são completamente confiáveis. As principais formas de detecção do HPV em tumores de orofaringe são por imuno-histoquímica (por meio da detecção da proteína p16^{INK4a}), hibridização *in situ* (que permite a identificação específica do tipo de HPV) e Reação em Cadeira da Polimerase (PCR ou *Polymerase Chain Reaction*) ⁸⁷. Para uma maior acurácia e identificação do tipo de HPV infectante, dois testes podem ser realizados (imuno-histoquímica seguida de PCR ou hibridização *in situ*) ⁸⁸. Mais recentemente, a tecnologia oferecida pelo sequenciamento de nova geração (NGS ou *Next Generation Sequencing*) emergiu com o potencial de não apenas identificar a infecção pelo HPV, como também permitir uma caracterização mais fina que possibilita distinguir até mesmo variantes dentro de um tipo de HPV+. Um estudo recente inclusive demonstrou que se pode categorizar os tumores HPV+ a partir da presença de genes do HPV integrados ou não-integrados no genoma do hospedeiro. O subgrupo com o DNA viral integrado coincide com um padrão específico de metilação do DNA e expressão de genes humanos e virais específicos e que desempenham importante papel durante a carcinogênese ⁸⁹.

A infecção pelo HPV pode ser prevenida através da vacinação. Atualmente no Brasil, há duas vacinas aprovadas pela ANVISA. Ambas são igualmente eficazes na prevenção da infecção pelo HPV (especialmente contra o HPV16 e HPV18) diferindo apenas na quantidade de tipos de HPV na qual conferem proteção. A vacina bivalente Cervarix[®] da GlaxoSmithKline ⁹⁰ confere proteção contra os tipos de alto risco HPV16 e HPV18 e a vacina quadrivalente Gardasil[®] da Merck Sharp & Dohme ⁹¹ confere proteção contra os tipos de alto risco HPV16 e HPV18 além dos tipos de baixo risco HPV6 e HPV11, que estão relacionados com o desenvolvimento de verrugas benignas genitais. Desde que esses dois tipos de baixo risco tem sido detectados com uma certa frequência em tumores de orofaringe, sugere-se que talvez nessa localização, tais tipos não atuam de forma benigna ⁸⁷.

Tais vacinas foram desenvolvidas com o principal propósito de prevenir a infecção pelo HPV e consequentemente o desenvolvimento de câncer cervical ou de verrugas nas regiões anal e genital. Entretanto, a proteção conferida por tais vacinas contra o desenvolvimento de carcinoma orofaríngeo de células escamosas ainda não está completamente clara. Porém, um estudo demonstrou que a vacinação contra o HPV reduziu a prevalência com uma eficiência de 93% (95% IC = 62,5% - 99,7%) de infecções orais por HPV nos indivíduos vacinados⁹². Apesar de não haver muitos estudos dedicados a este tema, são promissoras as chances de proteção contra o desenvolvimento de carcinoma orofaríngeo de células escamosas relacionado à infecção pelo HPV em indivíduos vacinados.

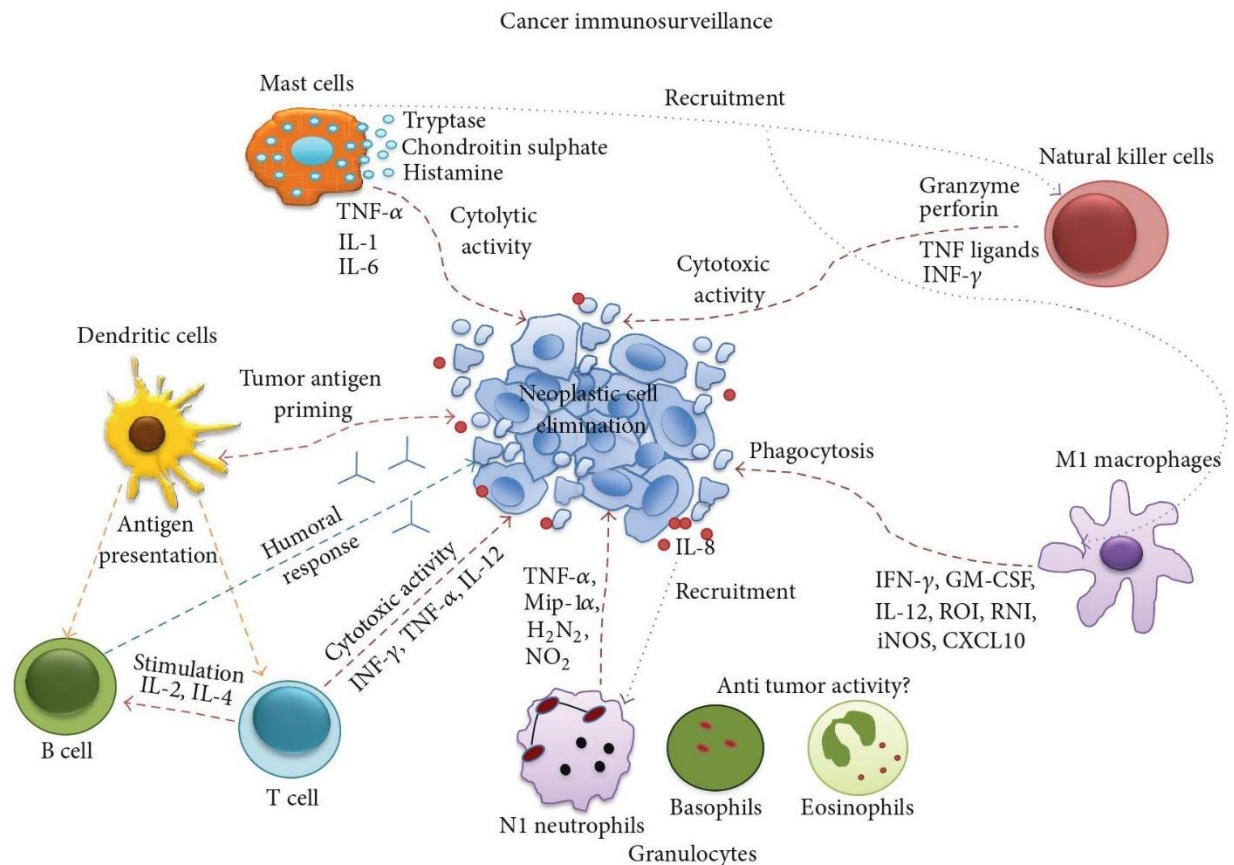
A proteção oferecida pelas vacinas disponíveis demonstra que existe uma batalha a nível celular e molecular para o controle das infecções virais e do desenvolvimento tumoral no organismo humano.

1.4 MECANISMOS DE RESPOSTA IMUNOLÓGICA PARA O COMBATE E CONTROLE DE TUMORES EM GERAL E DO CARCINOMA OROFARÍNCEO DE CÉLULAS ESCAMOSAS

A resposta imune é formada, de uma forma geral, por duas respostas que se comunicam: a resposta imune inata e a resposta imune adaptativa. A resposta imune inata é formada por um grupo de células e moléculas que exercem uma defesa não específica e rápida contra patógenos (entre minutos a horas após a exposição)⁹³ e reconhecem motivos conservados presentes nos patógenos. Das células que compõe a imunidade inata, destacam-se o papel desempenhado pelos leucócitos fagocíticos (neutrófilos e macrófagos), as células dendríticas e as células exterminadoras naturais (células NK ou *Natural Killer*). As células dendríticas são especializadas em capturar e apresentar antígenos para ativar as células T *naïve* da imunidade adaptativa que se diferenciam em diversos subtipos celulares^{94,95}. A parte não celular da imunidade inata é formada por várias citocinas⁹⁶, quimiocinas⁹⁷ e outros mediadores que recrutam e regulam as células imunes e até mesmo outros tipos celulares como fibroblastos e células endoteliais⁹⁴.

A resposta imune adaptativa é formada por células e moléculas que reconhecem regiões específicas dos patógenos nomeadas como antígenos. Após o reconhecimento dos antígenos, as células da resposta imune adaptativa (linfócitos T e B) são ativadas e se expandem gerando clones da célula original e juntamente com isso, capazes de reconhecer e responder a um

antígeno específico. Até o momento de sua ativação, as células da imunidade adaptativa permanecem em seu estado *naïve*. Por ser uma resposta específica, a organização da resposta adaptativa pode levar de dias a semanas até estar completamente montada. O número de vezes que um indivíduo é exposto a aquele antígeno pode também influenciar no tempo necessário requerido para a montagem da resposta adaptativa. A resposta imune adaptativa humoral é formada principalmente pelos anticorpos produzidos por células B que se diferenciaram em plasmócitos após sua ativação. Já a resposta imune adaptativa celular é constituída principalmente pelas células T que se subdividem em dois grandes grupos importantes: as células CD8⁺ e as células CD4⁺. Um subgrupo das células CD4⁺ dá origem as células T regulatórias (Tregs) que balanceiam os efeitos inflamatórios promovidos pelas células efetoras. Antígenos capturados por células da imunidade inata (células apresentadoras de antígenos: células dendríticas, macrófagos ou células de Langerhans) podem ser processados e apresentados para as células da imunidade adaptativa via complexo principal de histocompatibilidade (MHC ou *Major Histocompatibility Complex*) que é poligênico e altamente polimórfico e permite a interação com uma vasta gama de antígenos possíveis. O MHC de classe I geralmente apresenta antígenos (de células tumorais, células infectadas por vírus e outras falhas endógenas intracelulares) para as células CD8⁺. Já o MHC de classe II apresenta antígenos (de patógenos que foram processados por células apresentadoras de antígenos) para as células CD4⁺ ^{94,98}. Esse conjunto de mecanismos imunes forma um sistema de imunovigilância responsável pela a proteção do organismo contra a presença de organismos estranhos exógenos ou endógenos como as células tumorais (Figura 4).



Fonte: Adaptado de CHIMAL-RAMÍREZ (2013),⁹⁹.

Legenda: *Cancer immunosurveillance*: imunovigilância tumoral, *Mast cells*: mastócitos, *Tryptase*: triptase, *Chondroitin sulfate*: sulfato de condroitina, *Histamine*: histamina, *Cytolytic activity*: atividade citolítica, *Recruitment*: recrutamento, *Cytotoxic activity*: atividade citotóxica, *Granzyme*: granzima, *perforin*: perforina, *TNF ligands*: ligantes de TNF, *Natural killer cells*: células NK, *Dendritic cells*: células dendríticas, *Antigen presentation*: apresentação de antígeno, *Tumor antigen priming*: ativação por antígeno tumoral, *Neoplastic cell elimination*: eliminação de células neoplásicas, *Phagocytosis*: fagocitose, *M1 macrophages*: macrófagos M1, *B cell*: célula B, *Stimulation IL-2/IL-4*: estimulação por IL2 e IL4, *Humoral response*: resposta humoral, *T cell*: célula T, *Cytotoxic activity*: atividade citotóxica, *Granulocytes*: granulócitos, *N1 neutrophils*: neutrófilos N1, *Anti tumor activity?*: atividade antitumoral?, *Basophils*: basófilos, *Eosinophils*: eosinófilos.

Figura 4 – Principais componentes da imunovigilância e resposta imune antitumoral. Os componentes da imunidade inata (células NK, células dendríticas, macrófagos e mastócitos) atuam em sincronia com os componentes da imunidade adaptativa (células T e B). As diversas estratégias antitumorais da resposta imune são coordenadas por várias substâncias secretadas no ambiente tumoral pelas células tumorais e imunes que podem ativar e estimular a infiltração de outras populações celulares. Cada população imune desempenha o seu papel dentro da complexa teia que forma a resposta imune antitumoral. Dentre as diversas populações que contribuem para tal resposta, destacam-se aqui os papéis desempenhados pelos mastócitos (que induzem citólise), pela citotoxicidade mediada pelas células NK e linfócitos T, pela resposta humoral mediada pelos linfócitos B, pela fagocitose mediada por macrófagos além da contribuição das células dendríticas na apresentação de antígenos tumorais que acabam por ativar a resposta imune adaptativa antitumoral estruturada por células T e B. Na Figura

acima, as setas tracejadas em vermelho indicam efeito antitumoral direto, enquanto que as setas tracejadas em azul indicam efeito antitumoral indireto e as setas pontilhadas indicam o recrutamento de outras populações imunes.

As funções protetoras desempenhadas pelo sistema imune dependem de uma resposta imune integrada, por meio da atuação de diversas células e moléculas da imunidade inata e adaptativa. Os linfócitos T CD8⁺ (ou citotóxicos), bem como as células NK exercem importante papel efetor na imunidade celular. Os linfócitos T CD4⁺ (ou auxiliar) colaboram na regulação da resposta imune, promovem uma expansão clonal linfocitária além de direcionar algumas respostas. Por outro lado, os linfócitos T reguladores são encarregados pela supressão da resposta imune e controle da autoimunidade. Além disso, diversos outros componentes da resposta imune celular contribuem para as respostas imunes em geral, tais como as células dendríticas, macrófagos, monócitos entre outros^{100,101}. No tocante à imunidade tumoral, um componente chave para o reconhecimento de células alteradas é o antígeno leucocitário humano (HLA ou *human leukocyte antigen*) o MHC humano, que apresenta antígenos tumorais às células T. Muitos tumores podem reduzir esse reconhecimento através da diminuição da expressão de HLA¹⁰².

Apesar dos vários mecanismos de atuação descritos, muitos tumores desenvolvem mecanismos de escape dessa imunovigilância. De fato, o desenvolvimento tumoral ocorre devido ao acúmulo de alterações que permitem às células tumorais evadirem a resposta imune¹⁰³. Muitos tumores emergem a partir de ambientes de inflamação crônica em que mediadores inflamatórios como IL-6, GM-CSF, IL-1 β , IL-23 e TNF- α , bem como várias quimiocinas, podem ser explorados pelas células neoplásicas. Além disso, as células tumorais também produzem outras citocinas como o TGF- β , que suprime a ativação de células T e de células NK, além de atuar na diferenciação das células T regulatórias, e a IL-10 que inibe a maturação de células dendríticas e a ativação de células T, células NK, neutrófilos e macrófagos¹⁰³⁻¹⁰⁵.

Pacientes com carcinoma orofaríngeo de células escamosas HPV+, em geral, apresentam melhor prognóstico e resposta ao tratamento quando comparados aos pacientes HPV-, possivelmente devido às proteínas virais produzidas que potencializam a resposta imune, fazendo com que os tumores HPV+ sejam considerados “quentes” (*hot tumors*)^{106,107}.

A influência que a infecção pelo vírus do papiloma humano exerce no desenvolvimento do carcinoma orofaríngeo de células escamosas ainda é alvo de intensos estudos. Algumas particularidades da infecção pelo vírus do HPV permitem que ele escape da resposta imune. Enquanto várias proteínas virais são expressas em baixos níveis nas camadas mais basais das células epiteliais, nas regiões mais superficiais, onde a vigilância imune é mais escassa, elas são

altamente expressas. Outra estratégia empregada é pela liberação de forma não lítica dos capsídeos virais, que por sua vez infectam as células adjacentes de forma “silenciosa”, sem despertar a resposta imune ¹⁰⁸. O HPV também é capaz de suprimir a resposta mediada por interferon (IFN) ¹⁰⁹ e também perturbar a apresentação de antígeno mediada pelo MHC de classe I ¹¹⁰. Consequentemente, a migração e ativação de células de Langerhans (importante grupo de células apresentadoras de antígenos localizadas em tecidos epiteliais) fica prejudicada ¹¹¹.

Apesar da carência de estudos sobre a prevalência de infecções por HPV em tumores de cabeça e pescoço, sabe-se a partir de estudos relacionados à infecção do HPV na região cervical, que a maioria das mulheres infectadas consegue eliminar a infecção através de uma resposta imune bem-sucedida. Aproximadamente 10% dessas mulheres desenvolve infecção persistente e uma porcentagem menor ainda (5-10 a cada 100.000 mulheres) desenvolve lesões malignas. A evasão da resposta imune a partir da estimulação viral e/ou repressão de algumas vias de sinalização é uma das características principais de muitas infecções virais, incluindo o HPV ¹¹². Entre 10-15% das mulheres apresentam falhas na organização da resposta imune e consequentemente desenvolvem infecção persistente ¹¹³. A integração do genoma viral na célula hospedeira causa instabilidade genômica e também leva ao acúmulo de mutações que podem levar à imortalização celular e ao desenvolvimento tumoral. Isso ocorre uma vez que a integração do genoma viral pode causar a perturbação da fase de leitura aberta (ORF ou *Open Reading Frame*) do gene *E2* (que regula a expressão dos genes virais *E6* e *E7*) que resulta no aumento da expressão desses genes ¹¹⁴.

No que toca a resposta imune sistêmica, pacientes com tumores de orofaringe HPV+ apresentam, em sangue periférico, número mais elevado de células T CD4⁺ e CD8⁺ que são específicas para HPV16 quando comparado à pacientes HPV- ou doadores saudáveis. Tais respostas específicas para HPV foram demonstradas ao se estimular os linfócitos com peptídeos provenientes das proteínas E6 e E7 de HPV16 ^{115,116}.

Em relação a resposta imune local, destaca-se o papel desempenhado pelos linfócitos infiltrantes tumorais (TILs ou *tumor infiltrating lymphocytes*). Um estudo analisando o infiltrado inflamatório por imuno-histoquímica envolvendo 280 (220 HPV+ e 60 HPV-) pacientes com carcinoma de células escamosas de tonsila e base de língua demonstrou que uma alta porcentagem de CD8⁺ TILs está relacionado a um aumento de sobrevida global e livre de doenças em pacientes HPV+. No grupo de pacientes HPV-, a alta porcentagem de CD8⁺ TILs associou-se apenas a um aumento de sobrevida global ¹¹⁷. Tais resultados também foram observados a partir de estudos *in silico* com dados do Atlas do Genoma do Câncer (TCGA ou

The Cancer Genome Atlas) em que altos níveis de assinaturas gênicas de células T em tumores de cabeça e pescoço HPV+ está associado com o aumento da sobrevida global quando comparados aos tumores HPV- ^{118,119}.

Outro estudo mostrou que os tumores em orofaringe causados por uma infecção pelo HPV apresentam maior infiltrado inflamatório do que os tumores de cabeça e pescoço causados por uma infecção pelo HPV ¹²⁰. As células citotóxicas CD8⁺ TILs de tumores de cabeça e pescoço HPV+ apresentam altos níveis de infiltração e ativação celular, com consequente alta produção de citocinas efetoras ¹²¹. A resposta imune também tem mostrado a atuação de outras células no combate ao tumor. Linfócitos T, incluindo CD4⁺ auxiliar, CD4⁺ regulatória e CD8⁺ contribuem com a produção de uma variedade de citocinas estimuladoras como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucinas IL-5 e IL-4 ¹¹⁵.

Outra população que desempenha importante função na homeostase imune e cujas funções são incessantemente pesquisadas e detalhadas em estudos atuais são as células T regulatórias cuja atuação equilibra os efeitos inflamatórios, o que evita uma resposta imune excessiva. Os estudos publicados sugerem que o balanço entre as células T efetoras e as células T regulatórias são a chave para explicar por que alguns pacientes possuem melhor prognóstico enquanto outros progredem na doença. Dentre os estudos identificados, já foi observado que um alto número de células Foxp3⁺ (como as Tregs), CD4⁺ e CD8⁺ e que são específicas para HPV16, foram encontradas em infiltrados de tumores de cabeça e pescoço ¹¹⁵. Outro estudo observou que um alto nível de células CD8⁺ TILs e uma alta razão CD8⁺/Treg está associado com o melhor prognóstico clínico em pacientes com carcinoma de células escamosas de tonsila HPV+ e HPV- ¹²².

1.5 PROPRIEDADES RELACIONADAS ÀS CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DISTINTAS ENTRE TUMORES DE OROFARINGE HPV- E HPV+

Além das características epidemiológicas, patológicas e clínicas, os tumores de orofaringe HPV+ e HPV- também possuem características moleculares distintas. Os tumores HPV+ são mais sensíveis à radioterapia e algumas das possíveis explicações para essa diferença se encontra no panorama molecular distinto entre os tumores HPV+ e HPV- ¹²³. Alterações nas vias de reparo de DNA, controle do ciclo celular, vias de sinalização mitogênica além das diferenças no microambiente tumoral são algumas das possíveis explicações para essa distinção

na resposta à radioterapia. Um bom exemplo disso é que a expressão do gene *SMG-1* (que desempenha um importante papel na resposta à danos no DNA) é menos expresso em tumores HPV+ devido a hipermetilação de seu promotor e conseqüente repressão da expressão desse gene. Experimentalmente em um sistema *in vitro*, a depleção do gene *SMG-1* em células HPV- torna essas células muito mais sensíveis à radiação e a alta expressão desse gene em células HPV+ as torna mais resistentes à radiação ¹²⁴. Algumas diferenças entre os tumores HPV+ e HPV- também foram encontradas em relação à regulação do ciclo celular. Mutações no conhecido gene supressor de tumor *TP53* são muito mais encontradas em tumores HPV- e quase inexistentes em tumores HPV+ ^{125,126}.

A integração do DNA viral no genoma do hospedeiro pode levar à carcinogênese, dessa forma muitos estudos buscam investigar a influência da infecção do HPV no desenvolvimento do carcinoma de orofaringe bem como também no desenvolvimento de aberrações genéticas, tais como alterações nas vias relacionadas ao ciclo celular, ao reparo e replicação de DNA, além da sensibilidade ao tratamento (químico e radioterapia). Muitos estudos buscam identificar alterações frequentes que podem explicar as distinções observadas em relação ao prognóstico e a resposta a terapia entre as populações de tumores. Algumas das estratégias empregadas buscam, por exemplo, identificar as diferenças entre tumores HPV+ em orofaringe com tumores HPV+ em outras localizações, tumores em orofaringe HPV+ versus tumores HPV-, tumores em orofaringe relacionados a infecção pelo HPV e também estratificado pelos hábitos de tabagismo e por fim, tumores em orofaringe (HPV+ e HPV-) com tecido normal ⁸⁷.

Do ponto de vista molecular, os tumores HPV+ demonstram uma certa semelhança. Alguns estudos compararam o perfil molecular de tumores HPV+ de câncer cervical, tumores HPV+ de orofaringe e tumores HPV- de orofaringe. Surpreendentemente, dois grupos principais foram identificados, um grupo dos tumores HPV+ e um grupo dos tumores HPV-. Esse mesmo estudo comparou as diferenças causadas pela infecção do HPV em tumores de orofaringe e cavidade oral HPV+ e HPV-. Não foram notadas diferenças significativas entre tumores HPV+ e HPV- na região da cavidade oral. Porém quando lesões tumorais HPV+ e HPV- localizadas em orofaringe foram comparados entre si, foram encontradas diferenças significativas do padrão de expressão gênica associado a replicação e reparo de DNA, ciclo celular e sensibilidade a quimioterapia e radioterapia ¹²⁷. Um outro trabalho reforça essas similaridades entre tumores de orofaringe e cérvix quando comparados com tumores de orofaringe HPV-. Uma das modificações transcricionais mais comumente encontradas em tumores HPV+ abrange a redução da expressão de genes envolvidos com a resposta imune (como algumas interleucinas e proteínas induzidas por interferon) ^{73,128}.

Um estudo com dados de *microarray* (microarranjos de DNA, tecnologia que possibilita a avaliação do padrão diferencial de expressão gênica, porém não tão aprofundada como a de um *RNAseq* ou sequenciamento de RNA) entre carcinomas de orofaringe HPV+ e HPV- e dados de epitélio oral normal, identificou vários genes cuja expressão está associada a infecção pelo HPV em tumores de orofaringe. Foi demonstrado que os genes envolvidos com a regulação do ciclo celular (*CDKN2A*), diferenciação celular (*SFRP4*) e reparo de DNA (*RAD51API*) estavam aumentados nos tumores HPV+ quando comparados com o epitélio normal. Enquanto nos tumores HPV- os genes envolvidos com a proliferação celular (*AKRIC3*) e regulação da transcrição (*SNAPC1*) estavam aumentados quando comparados ao epitélio normal. De forma interessante, os genes envolvidos na estrutura nuclear e meiose (*SYCP2*), reparo de DNA (*RFC5*) e regulação da transcrição (*ZNF238*) estavam aumentados nos tumores HPV+ quando comparados aos tumores HPV- e tecido normal ¹²⁹.

Além das diferenças no padrão de expressão gênica, tumores HPV+ e HPV- demonstram também padrões de alterações cromossômicas distintas. Amplificações e alterações cromossômicas são mais frequentemente encontradas em tumores de orofaringe HPV- do que nos tumores HPV+. Dessas alterações mais comumente encontradas nos tumores HPV-, os ganhos na região 11q13 e as perdas nas regiões 3p, 9p e 18q se destacam. Já a perda da região 16p predomina entre os tumores HPV+ de orofaringe. A partir dessa observação de que tumores de orofaringe HPV- apresentam maior número de alterações e amplificações cromossômicas, foi sugerido que a progressão até a malignidade requer um menor número de alterações genéticas em tumores de orofaringe HPV- ^{126,130}.

Inicialmente, quando muitos estudos procuravam investigar as mutações somáticas presentes em genes conhecidos e comumente mutados como a *TP53* ^{131,132}, vários outros padrões mutacionais foram também encontrados em genes e em condições clínicas particulares que envolviam substituições de uma única base (que são as mais frequentemente encontradas em genomas tumorais) ou pequenas inserções ou deleções (*indels*: de *insertions* e *deletions* em inglês). Há seis tipos de substituições de única base descritos no DNA (C>A, C>G, C>T, T>A, T>C e T>G) ¹³³ e muitos desses estudos iniciais descreveram padrões mutacionais únicos, também considerando as bases 5' e 3' imediatamente adjacentes à substituição ¹³⁴, como nos casos de câncer de pele associados com histórico de exposição à radiação UV (ultravioleta) cujas mutações C>T ocorrem principalmente em dímeros de pirimidinas, padrão que tipicamente se forma após exposição do DNA a radiação UV ¹³⁵ ou como nos casos de câncer de pulmão com histórico de tabagismo (com forte predominância de mutações C>A gerada após a exposição a um dos carcinógenos presentes no tabaco, o benzopireno) ¹³⁶.

Tais mutações somáticas podem ocorrer de forma frequente em tumores devido a exposições a fatores mutagênicos internos e externos, erros no reparo de DNA, erros na incorporação de nucleotídeos incorretos por parte da maquinaria de replicação de DNA e modificações enzimáticas do DNA ¹³⁷. Tais fatores podem gerar combinações únicas de mutações inseridas em um determinado contexto de trinucleotídeos, o que define uma assinatura mutacional. Várias assinaturas mutacionais descritas foram reunidas e estão publicamente disponíveis no banco de dados do Catálogo de Mutações Somáticas no Câncer (COSMIC ou *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*) (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>) que conta com diversas assinaturas mutacionais descritas em genomas tumorais ^{134,138}. Algumas dessas assinaturas, são inclusive, associadas com processos específicos como a Assinatura 1 de substituição de base única (SBS ou *Single Base Substitution*), que está presente em quase todos os tipos de câncer e está relacionada com o processo de envelhecimento celular (“*clock-like mutational signature*”) ¹³⁹, a Assinatura 4, que está relacionada à exposição ao tabaco ¹⁴⁰ e as Assinaturas 2 e 13, que estão relacionadas com a atividade da família de citidinas deaminases induzida por ativação/apolipoproteína B tipo polipeptídeo catalítico de edição do RNAm (AID/APOBEC ou *Activation Induced Cytidine Deaminase/APOlipoprotein B mRNA Editing Catalytic polypeptide-like*) ^{134,141}, que são enzimas que tem o DNA como seu substrato e desempenham importante função de proteção contra infecções virais ¹⁴², porém, quando desreguladas, também são descritas como responsáveis pela formação de mutações em diversos genomas de câncer ¹⁴³, em especial naqueles tumores com infecções virais como o HPV ¹⁴⁴ e o EBV ¹⁴⁵.

Quando se fala do perfil molecular apresentados por células tumorais, não se pode deixar de mencionar a importância desempenhada pelo banco de dados público TCGA. Esse atlas do perfil molecular tumoral foi resultado de um projeto público que visou catalogar e disponibilizar gratuitamente dados de mais de trinta tipos de câncer de todo o mundo. Tal projeto foi criado em 2005 e atualmente é mantido e supervisionado pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI ou *National Cancer Institute*) e pelo Instituto Nacional de Pesquisa do Genoma Humano (NHGRI ou *National Human Genome Research Institute*) do governo norte-americano. Os dados presentes nesse banco fornecem um abrangente panorama para a análise de dados a partir do uso de dados de *RNAseq* (sequenciamento de RNA), *microRNAseq* (sequenciamento de microRNA), *DNAseq* (sequenciamento de DNA) além de dados sobre o estado de metilação do DNA. A investigação dos dados presentes no TCGA por grupos de todo o mundo permitiu o desenvolvimento de análises multidimensionais que envolvem estratégias que utilizam desde tipos individuais de câncer, a até mesmo análises abrangentes de *pan-cancer* (tipo de análise

cujo objetivo é determinar as alterações genômicas e celulares que sejam diferentemente ou semelhantemente encontradas em diversos tipos de tumores) que por fim, permitem a ampliação dos conhecimentos sobre os mecanismos envolvidos na tumorigênese ¹⁴⁶. Além disso, o TCGA contém um vasto banco de dados consideravelmente completo com diversos tipos de informações (dados clínicos, dados de sequenciamento de transcriptoma, exoma, entre outros) que permitem o emprego de diversas estratégias de análises que elucidem o panorama transcriptômico, genético e clínico de um mesmo grupo de pacientes.

1.6 IMPACTO MUTACIONAL E MOLECULAR ASSOCIADO A ATIVIDADE DA FAMÍLIA DE CITIDINAS DEAMINASES APOBEC3s

Existem diversos mecanismos de imunidade inata que variam desde a produção de moléculas sinalizatórias, além da indução de cascatas proteolíticas até a atuação de células fagocíticas em organismos multicelulares. Porém nos últimos 20 anos, um novo mecanismo de imunidade inata começou a ser descrito: a atuação de uma família de citidinas deaminases que defendem o organismo de agentes infecciosos virais e retroelementos endógenos. Nesse contexto, destaca-se a família de enzimas AID/APOBEC que é formada por onze genes conservados evolutivamente ¹⁴⁷ que desempenham importante função biológica em diversos eventos e tecidos.

As APOBECs podem ser encontradas em várias espécies de vertebrados. Os membros ancestrais da família das APOBECs são encabeçados pela AID e APOBEC2 e enquanto as origens da APOBEC4 ainda não estão muito claras, as APOBEC1 e APOBEC3 são os membros mais jovens na escala evolutiva ^{148,149}. As APOBEC3s são, inclusive, exclusivamente encontradas em mamíferos, mas o número de genes que fazem parte do subgrupo das APOBEC3s pode variar de acordo com a espécie ¹⁵⁰. Os primatas são os mamíferos com o maior número de genes de APOBEC3s já conhecido, são sete genes no total ¹⁵¹. Os camundongos possuem, por exemplo, um único gene de APOBEC3. Já os suínos possuem dois genes de APOBEC3s, enquanto os ovinos possuem três genes de APOBEC3s e os felinos possuem quatro genes APOBEC3s, por exemplo ^{152,153}.

Com a exceção das APOBEC2 e APOBEC4 que ainda não estão completamente caracterizadas, as demais enzimas atuam em diferentes funções que variam de processos responsáveis pela diversidade de anticorpos a partir da hipermutação somática como faz a AID, edição de RNAm como faz a APOBEC1 até a atuação na resposta imune inata contra agentes

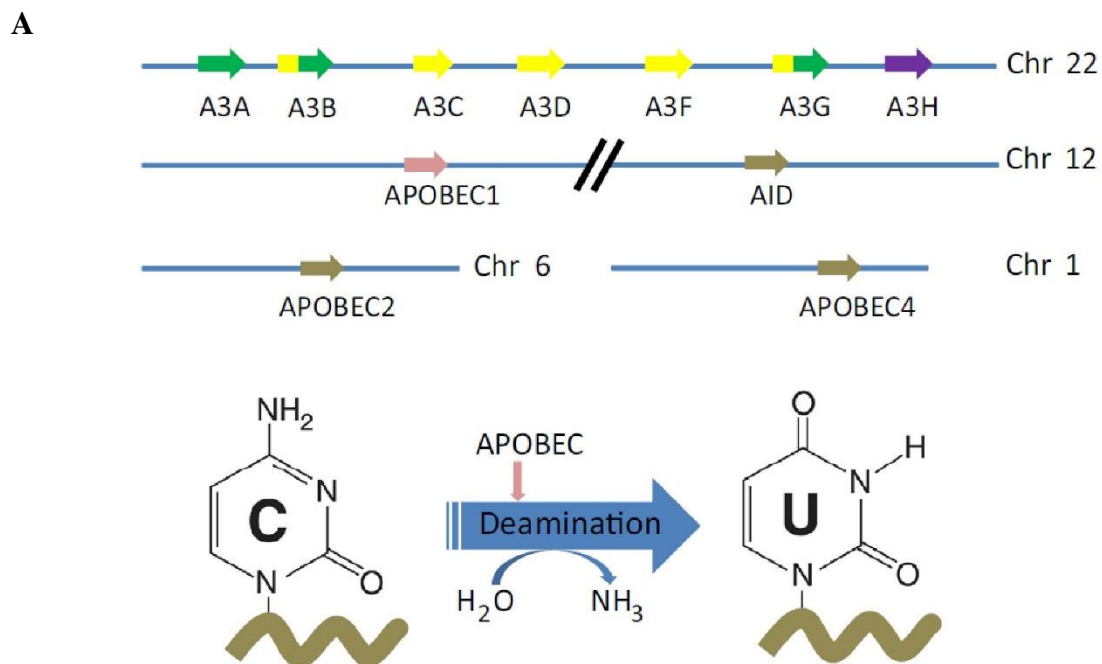
infeciosos virais e retroelementos endógenos como ocorre pela família de sete membros das APOBEC3s^{142,154} (Figura 5B). A localização dos genes das onze APOBECs descritas em humanos pode também variar. *AID* e *APOBEC1* estão codificadas pelo cromossomo 12^{155,156} enquanto que as *APOBEC2* e *APOBEC4* estão codificadas pelos cromossomos 6 e 1, respectivamente^{157,158}. Já as APOBEC3s estão codificadas em *tandem* pelo cromossomo 22¹⁵⁹ (Figura 5A).

A atividade de citidina deaminases das APOBEC3s está associada a diversos padrões de mutações somáticas encontrados em alguns tipos de tumores. Os padrões de deaminações encontrados em sítios TpC de DNA exibidas pela atividade de APOBEC3s (Figura 5B) foram semelhantes a padrões de assinaturas mutacionais observados em alguns tumores como o caso do câncer de mama^{160,161}. A mutagênese associada à atividade de APOBEC3s também foi demonstrada em vários outros tipos de tumores humanos como, por exemplo, em câncer de cabeça e pescoço ou cervical associado a infecção pelo HPV, câncer de bexiga, câncer de pulmão^{134,162,163} e até mesmo em câncer gástrico associado a infecção pelo EBV¹⁴⁵.

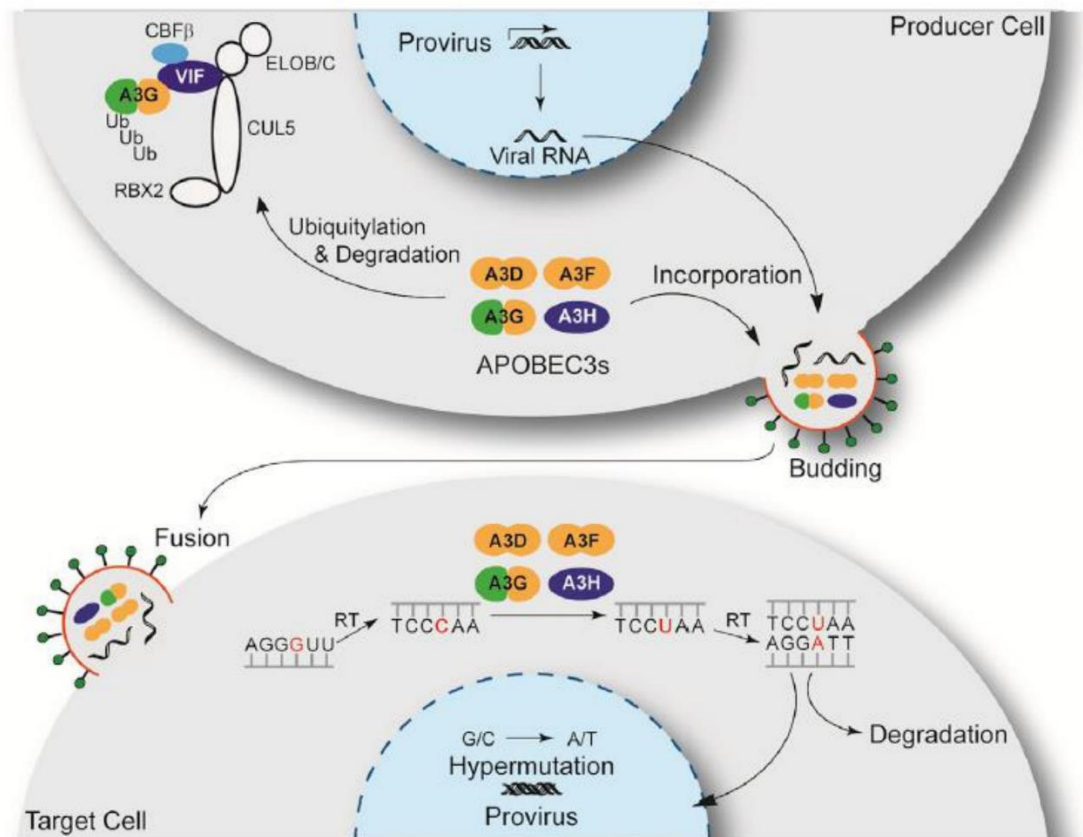
Um padrão mutacional já bem descrito na literatura e que foi associado a atividade das APOBEC foi, inicialmente, nomeado como *kataegis*, um processo de geração de mutações em forma de *cluster* (do grego antigo, significa raio, uma analogia a chuva de raios localizada) que é caracterizado por transições C>T (em que após a deaminação da citosina se forma uma uracila na fita de DNA que é posteriormente reparada) e transversões C>A ou C>G, cujo mecanismo ocorre pela deaminação da citosina em uracila em DNA de fita simples (Figura 5A), seguida da excisão da uracila que cria um sítio abásico e, em uma tentativa de reparo, pode ocorrer ou a inserção de uma adenina ou em uma inserção de uma guanina (que resulta nas transversões observadas nesse padrão)^{164,165}. É possível observar, portanto, que os padrões de assinaturas mutacionais atribuídos a atividade de APOBEC (processo observado durante a replicação do DNA ou reparo de DNA por recombinação) são o resultado de danos diretos ao DNA e aos processos de reparo deste.

A família das APOBEC3s é formada por sete genes nomeados *APOBEC3A*, *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3D*, *APOBEC3F*, *APOBEC3G* e *APOBEC3H* ordenados em *tandem* e localizados cromossomo 22¹⁵⁹ (Figura 5A). Enquanto as *APOBEC3A*, *APOBEC3C* e *APOBEC3H* dispõem de um único domínio de citidina deaminase, as *APOBEC3B*, *APOBEC3D*, *APOBEC3F* e *APOBEC3G* dispõem de dois domínios de citidina deaminase¹⁵¹. Estudos sugerem que os domínios C-terminal são ativos, enquanto os domínios N-terminal estão envolvidos na interação com a molécula de DNA¹⁶⁶.

As APOBEC3s também exibem diferentes localizações celulares durante as diferentes fases da mitose e, dessa forma, podem ter acesso ao material genético nuclear que pode resultar na perturbação do ciclo celular de células infectadas por agentes infecciosos virais e retroelementos endógenos. As enzimas APOBEC3A, APOBEC3C e APOBEC3H podem se localizar, durante a intérfase, tanto no núcleo celular, quanto no citoplasma, já as enzimas APOBEC3D, APOBEC3F e APOBEC3G não entram em contato com a cromatina durante a mitose e depois se tornam citoplasmáticas na intérfase. A APOBEC3B é nuclear durante a intérfase, apesar de também não ter acesso a cromatina durante a mitose ^{167,168}. As principais funções celulares atribuídas a atividades das APOBEC3s estão relacionadas com edição de RNAm ¹⁶⁹, catabolismo de DNA exógeno ¹⁷⁰ e indução de mutações em células infectadas com agentes infecciosos virais e retroelementos endógenos ^{142,154} (Figura 5B).



B



Fonte: Adaptado de ZOU (2017),¹⁷¹ e OLSON (2018),¹⁷².

Legenda: *Chr*: cromossomo, *Deamination*: deaminação, *Provirus*: pró-vírus, *Producer Cell*: célula produtora, *Viral RNA*: RNA viral, *Ubiquitylation & Degradation*: ubiquitinação e degradação, *Incorporation*: incorporação, *Budding*: brotamento, *Fusion*: fusão, *Target Cell*: células alvo, *Hypermutation*: hipermutação e *Degradation*: degradação.

Figura 5 – Localização e mecanismo de ação da família de citidinas deaminases APOBEC. (A) Localização cromossômica dos onze membros da família de citidinas deaminases AID/APOBECs. Os genes das APOBEC3s se organizam em *tandem* e estão localizados no cromossomo 22. A *APOBEC1* e a *AID* estão localizadas no cromossomo 12. As *APOBEC2* e *APOBEC4* estão localizadas nos cromossomos 6 e 1, respectivamente. Os membros da família de citidinas deaminases APOBEC catalisam uma deaminação cuja reação consiste na hidrólise da citosina em uracila. (B) A figura mostra uma representação ilustrativa da restrição mediada pelas APOBEC3s em células infectadas pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV ou *Human Immunodeficiency Virus*). Uma célula infectada com o genoma viral possibilita que diversas APOBEC3s sejam incorporadas em vírions em brotamento que contém o material genético viral a ser usado para a infecção de novas células alvo. O genoma viral do HIV pode modular a expressão das APOBEC3s por meio da proteína acessória viral fator de infectividade viral (Vif ou *Viral Infectivity Factor*) que neutraliza a atividade das APOBEC3s por meio da formação de um complexo enzimático que ubiquitina as APOBEC3s e assim, as sinaliza para a destruição via proteassoma 26S. Após a fusão dos vírions na célula alvo, as APOBEC3s convertem citosina em uracila e assim, induzem a degradação do DNA ou, se esse mecanismo de conversão mediada pelas APOBEC3s não for reparado por meio das vias de reparo de DNA, induzem a geração de hipermutações somáticas. A permissão para reprodução da imagem 5B encontra-se no Anexo 2.

Em razão das várias diferenças no perfil molecular e imune entre os carcinomas orofaríngeos de células escamosas HPV+ e HPV- serem descritas, evidencia-se aqui uma necessidade de explorar novos determinantes moleculares e imunológicos que contribuem para tais distinções, o que poderá futuramente possibilitar o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento e prognóstico bem-sucedidas.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar por meio da abordagem *in silico* o panorama imunológico, transcricional e mutacional em carcinoma orofaríngeo de células escamosas associados ou não à infecção pelo HPV como forma de investigar as bases celulares e moleculares por trás da resposta imunológica antitumoral.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

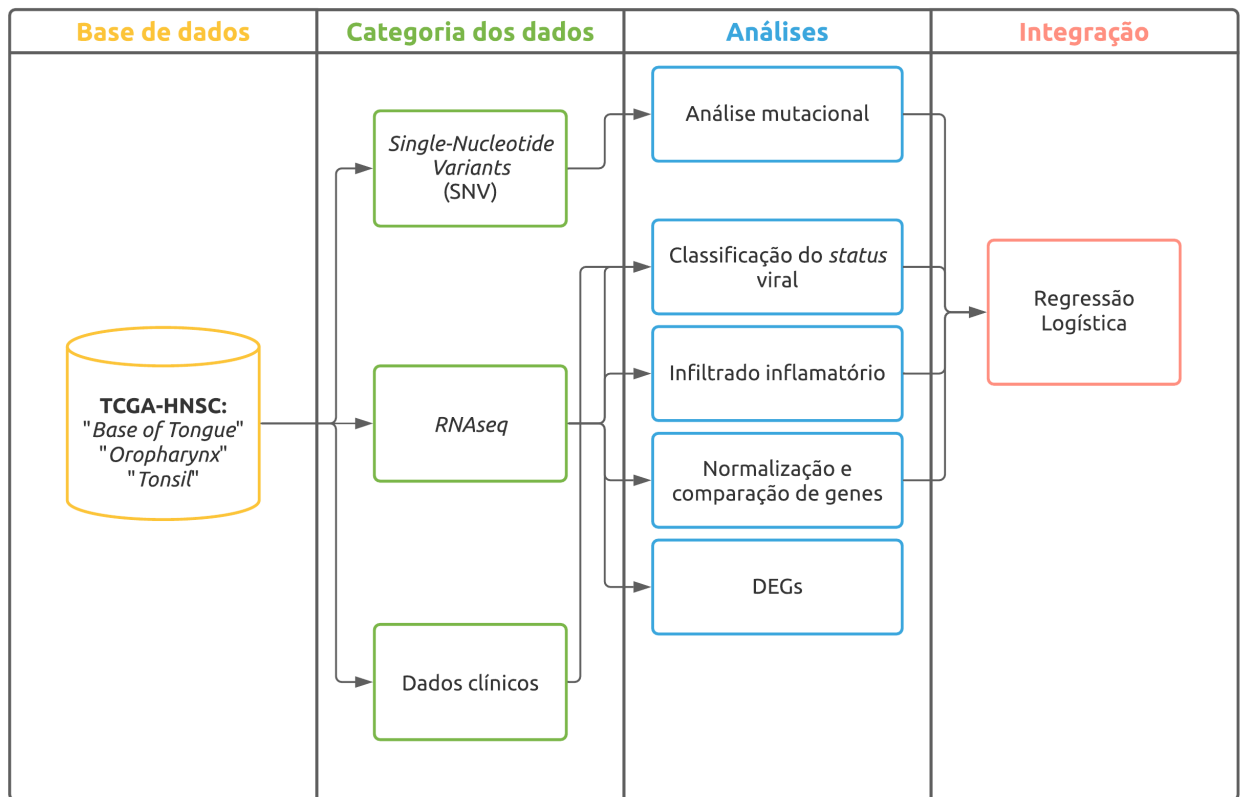
- Caracterizar a resposta imune a nível celular e molecular e as diferenças provocadas pela exposição viral no ambiente tumoral;
- Investigar a infiltração inflamatória em ambientes tumorais associados ou não a infecção pelo HPV;
- Explorar a associação entre a infecção pelo HPV com a atividade mutacional promovida pela família de citidinas deaminases AID/APOBEC;
- Integrar os dados imunológicos e mutacionais como forma de entender o impacto da atividade de APOBEC3 na resposta imune inflamatória.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS DADOS

Foi utilizado o banco de SNVs (variantes de nucleotídeo único ou *Single-Nucleotide Variants*) somáticas produzidas pelo consórcio TCGA-MC3 (descrição de mutações multicêntricas em vários tipos de câncer do TCGA ou *TCGA Multi-Center Mutation Calling in Multiple Cancers*)¹⁷³, onde foram detectadas variantes para os 33 tipos de tumores do TCGA a partir de pares de amostras de exoma tumoral/normal. Foram então selecionadas apenas as variantes do projeto HNSC (*Head and Neck Squamous Cell*) do TCGA. Além do conjunto de dados MC3, foram obtidos dados clínicos e de expressão gênica provenientes de sequenciamento de RNA tumoral do projeto HNSC do TCGA v16.0, n = 528 pacientes (Figura 6). Os pacientes foram filtrados por características clínicas, incluindo apenas pacientes com tumores localizados em tonsila, orofaringe ou base da língua, em estágio clínico TNM (cTNM) I, II, III ou IV, com diagnóstico histológico de carcinoma de células escamosas e sem histórico de tratamento neoadjuvante, totalizando 66 pacientes (em que 18 eram HPV- e 48 eram HPV+). O estadiamento fornecido pelos dados clínicos do TCGA, e portanto adotado nesse trabalho, segue a conduta descrita pela 6ª e a 7ª edição do protocolo de classificação clínica publicado pela UICC^{17,18}. Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C. Camargo Cancer Center / Fundação Antônio Prudente e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), sob o nº 2811/19 (Anexo 3).

Delineamento experimental *in silico*



Legenda: TCGA: o atlas do genoma do câncer (*The Cancer Genome Atlas*); HNSC: carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (*Head-Neck Squamous Cell Carcinoma*); *Base of Tongue*: base de língua; *Oropharynx*: orofaringe; *Tonsil*: tonsila; *SNV*: variantes de nucleotídeo único (*Single-Nucleotide Variants*); *RNAseq*: sequenciamento de RNA (*RNA sequencing*); *DEGs*: genes diferencialmente expressos (*Differentially Expressed Genes*).

Figura 6 – Fluxograma que apresenta o delineamento experimental *in silico* desse estudo. A partir da base de dados TCGA, três categorias de dados (*SNV*, *RNAseq* e dados clínicos) foram exploradas em diversas análises descritas na sessão de materiais e métodos. A integração dos dados analisados ocorreu por meio de regressão logística.

3.2 CLASSIFICAÇÃO DO *STATUS* VIRAL EM HPV- E HPV+

As amostras foram classificadas como positivas para o HPV (HPV+) utilizando uma definição empírica de detecção de 1.000 *reads* de *RNASeq* mapeados alinhando-se principalmente aos genes virais *E6* e *E7*¹²⁵ (52 dos 66 pacientes analisados). Para aqueles pacientes em que não estava disponível os dados em formato BAM (mapas de alinhamento binário ou *Binary Alignment Map*) para o alinhamento com os genes virais, a classificação

histológica por imuno-histoquímica p16 disponibilizada pelos dados clínicos (14 dos 66 pacientes analisados), foi utilizada para classificar o *status* de HPV.

3.3 CLASSIFICAÇÃO DO *STATUS* DE TABAGISMO

A variável tabagismo foi classificada de forma binária a partir da divisão por carga tabágica empregada por Ang *et al.* em 2010⁸⁴ que é considerada a mais consolidada do ponto de vista epidemiológico e clínico. Nessa classificação, os pacientes são considerados como “não-tabagista” quando se declararam como “não fumante ao longo da vida” ou quando o consumo tabágico foi ≤ 10 anos-maço e os pacientes são considerados como “tabagista” quando o consumo tabágico foi > 10 anos-maço. Tal classificação é, inclusive, também empregada pelo TCGA em seu estudo abrangente sobre a caracterização genética de tumores de cabeça e pescoço que empregou toda a coorte do projeto HNSC-TCGA disponível até então¹²⁵.

3.4 NORMALIZAÇÃO E COMPARAÇÃO DE GENES IMUNES

Os dados de expressão gênica foram normalizados em valores FPKM (fragmentos por quilo base por milhão ou *Fragments Per Kilobase Million*) e comparados entre os grupos HPV- e HPV+ pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, em que o nível de significância foi fixado em 0,05.

3.5 DETERMINAÇÃO DOS *SCORES* IMUNE, ESTROMAL E DE PUREZA DE TUMOR

Uma vez que o microambiente tumoral é um ambiente complexo formado por diversas populações distintas (associadas ao tumor), além das próprias células tumorais, os *scores* imune, estromal e de pureza de tumor foram determinados pelo *software* ESTIMATE¹⁷⁴ v1.0.13, a partir dos dados de expressão gênica normalizados. Tal metodologia infere as frações tumoral, imune e estromal a partir de assinaturas de expressão gênicas identificadas por uma análise ssGSEA (análise de enriquecimento de conjunto de genes de amostra única ou *single-sample Gene Set-Enrichment Analysis*), que infere um *score* que prediz o nível de infiltração imune e estromal, e dessa forma, a pureza tumoral também pode ser estimada.

3.6 ESTIMATIVA DA ABUNDÂNCIA DE INFILTRADO INFLAMATÓRIO

Os níveis de expressão gênica normalizados em FPKM foram utilizados no *software* CIBERSORT¹⁷⁵ v1.05, para estimar a proporção dos 22 tipos de células inflamatórias presentes em cada amostra, incluindo sete tipos de célula T, células B *naïve* e de memória, células plasmáticas, células NK e subconjuntos de células mielóides e também no *software* MCP-counter¹⁷⁶ v1.2.0, para estimar a população de 8 tipos de células imunes, incluindo células T CD3 e CD8, linhagem de monócitos, células dendríticas mielóides e neutrófilos, assim como 2 tipos de células estromais, incluindo células endoteliais e fibroblastos.

3.7 ANÁLISE MUTACIONAL

A estimativa e extração das assinaturas mutacionais *de novo* foi realizada pelos *softwares* *signeR*¹⁷⁷ v1.18.0, desenvolvido pelo Laboratório de Bioinformática e Biologia Computacional do A.C. Camargo Cancer, *MutationalPatterns*¹⁷⁸ v3.2.0, *SomaticSignatures*¹⁷⁹ v2.28.0, e *sigProfiler*¹⁸⁰ v1.1.0. A abordagem *fitting* de assinaturas mutacionais foi realizada pelos *softwares* *deconstructSigs*¹⁸¹ v1.8.0, *MutationalPatterns* e *sigProfiler* incorporados em um *pipeline* desenvolvido *in house*. Então os resultados de todos os métodos foram comparados a fim de identificar e extrair as assinaturas comuns a todos (consenso), ou em mais de um método, para aumentar a acurácia na determinação dos processos mutacionais presentes nas amostras. A similaridade das assinaturas encontradas com aquelas disponíveis de substituição de base única no COSMIC (v2) (<https://cancer.sanger.ac.uk/signatures/sbs/>) foi avaliada pela à similaridade dos cossenos, onde 0 representa nenhuma similaridade e 1, alta similaridade. As assinaturas que apresentaram valores de similaridade acima de 0,60 foram consideradas nas análises.

3.8 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DIFERENCIAL

A partir dos valores de expressão gênica dos pacientes do TCGA, obtidos por *RNAseq*, foi realizada uma análise de expressão diferencial por meio do *software* *DESeq2*¹⁸² v1.32.0 para avaliar os genes diferencialmente expressos (DEG ou *Differentially Expressed Genes*) entre pacientes HPV- e HPV+, em que o grupo HPV- foi considerado como a categoria de referência. Foram definidos como diferencialmente expressos os genes com $\log_2\text{FoldChange} \geq$

0,5 ou $\log_2\text{FoldChange} \leq -0,5$ e valor-p ajustado $< 0,05$. O método de Benjamini-Hochberg foi utilizado para ajustar o valor-p.

3.9 FORMA DE ANÁLISE DE RESULTADOS

Para as análises *in silico* de dados biológicos, foram desenvolvidos *scripts* nas linguagens de programação R e Python que possuem os repositórios *Bioconductor*¹⁸³ e *Bioconda*¹⁸⁴ com uma vasta quantidade de pacotes para análises desse tipo de dados. As análises estatísticas foram realizadas pela linguagem de programação R e pelo *software* SPSS[®] (IBM[®]) v25. O nível de significância dos testes foi fixado em 0,05.

4. RESULTADOS

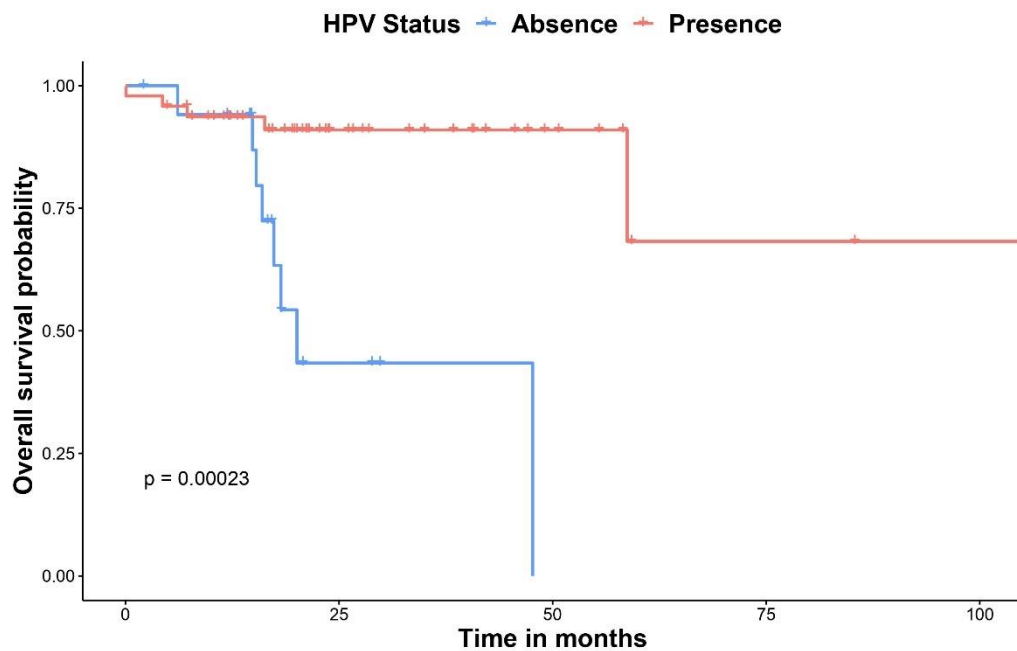
Um total de dados de *RNAseq* de 66 pacientes (18 HPV- e 48 HPV+) com carcinoma orofaríngeo de células escamosas (em que os dados foram coletados das seguintes localizações: orofaringe, base de língua e tonsila) foram obtidos no banco de dados públicos TCGA. De forma geral, os pacientes HPV- apresentaram média e mediana em idade maiores, além de uma faixa etária composta por pessoas mais velhas e com predominância de pacientes tabagistas, do sexo masculino e com tumores em estágio avançado (classificações III e IV do cTNM). Por outro lado, os pacientes HPV+ apresentaram média e mediana em idades menores, uma faixa etária mais jovem, com predominância de tumores localizados em tonsila, pacientes não-tabagistas, do sexo masculino e também em estágio avançado (Tabela 1).

Tabela 1 – Informações clínicas e histopatológicas das amostras de carcinoma de células escamosas de orofaringe disponíveis no TCGA.

Variável	Pacientes		
	HPV-	HPV+	p-valor
n° de pacientes	18 (27,27%)	48 (72,73%)	
Idade (anos)			
Média	60,94	55,46	0,03746 ^{*a}
Mediana	61,5	56,0	
Amplitude	48-79	35-77	
Sexo			
Feminino	5 (7,58%)	4 (6,06%)	0,05474 ^b
Masculino	13 (19,70%)	44 (66,66%)	
Sítio anatômico			
Tonsila	6 (9,09%)	34 (51,52%)	0,007951 ^{*b}
Base de língua	8 (12,12%)	12 (18,18%)	
Orofaringe	4 (6,06%)	2 (3,03%)	
Consumo de tabaco			
Não-tabagista (≤ 10 anos-maço)	3 (4,55%)	25 (37,88%)	0,01556 ^{*b}
Tabagista (> 10 anos-maço)	10 (15,15%)	18 (27,27%)	
Sem informação	5 (7,58%)	5 (7,58%)	
Estádio cTNM (6^a ed)			
I-II	1 (1,52%)	2 (3,03%)	1 ^b
III-IV	3 (4,55%)	11 (16,67%)	
Estádio cTNM (7^a ed)			
I-II	4 (6,06%)	7 (10,61%)	0,706 ^b
III-IV	10 (15,15%)	28 (42,43%)	

^{*}, p-valor ≤ 0,05; a, teste T para amostras independentes; b, teste exato de Fisher.

Curvas de sobrevida em função do *status* viral foram traçadas utilizando o estimador Kaplan-Meier e comparadas de forma univariada pelo teste *Log-rank*. Os pacientes HPV+ apresentaram maior probabilidade de sobrevida global em 100 meses quando comparados aos pacientes HPV- (Figura 7).

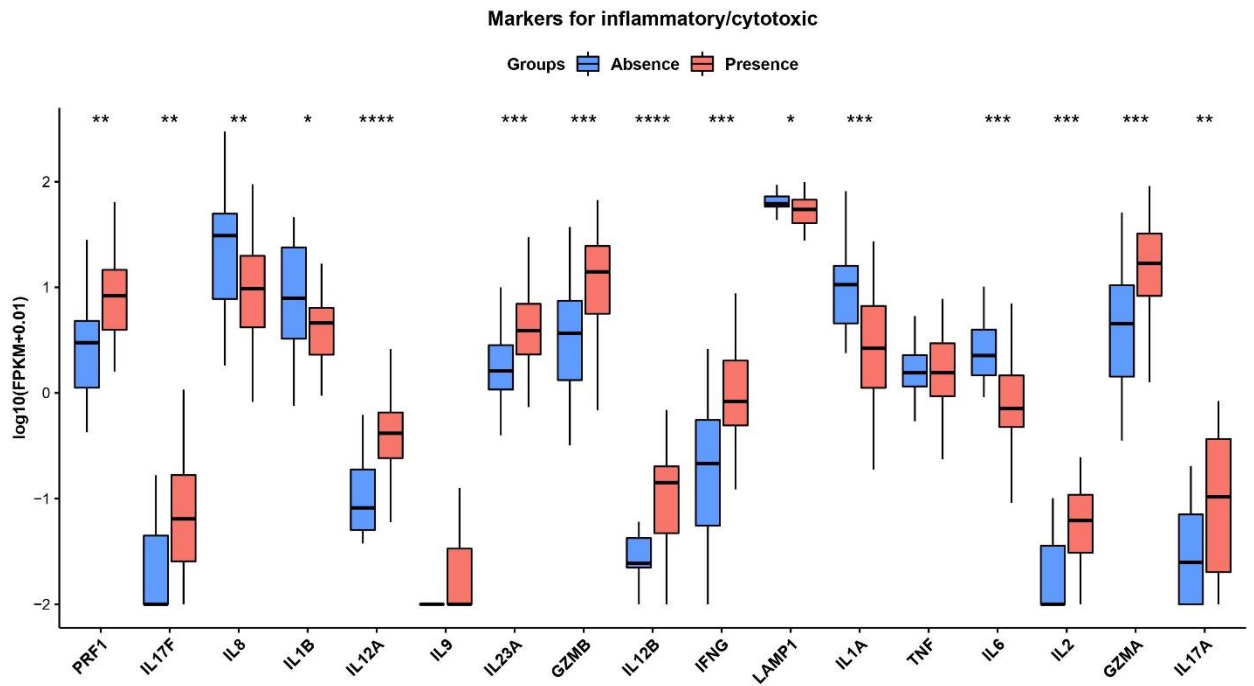


Legenda: Absence: HPV- e Presence: HPV+.

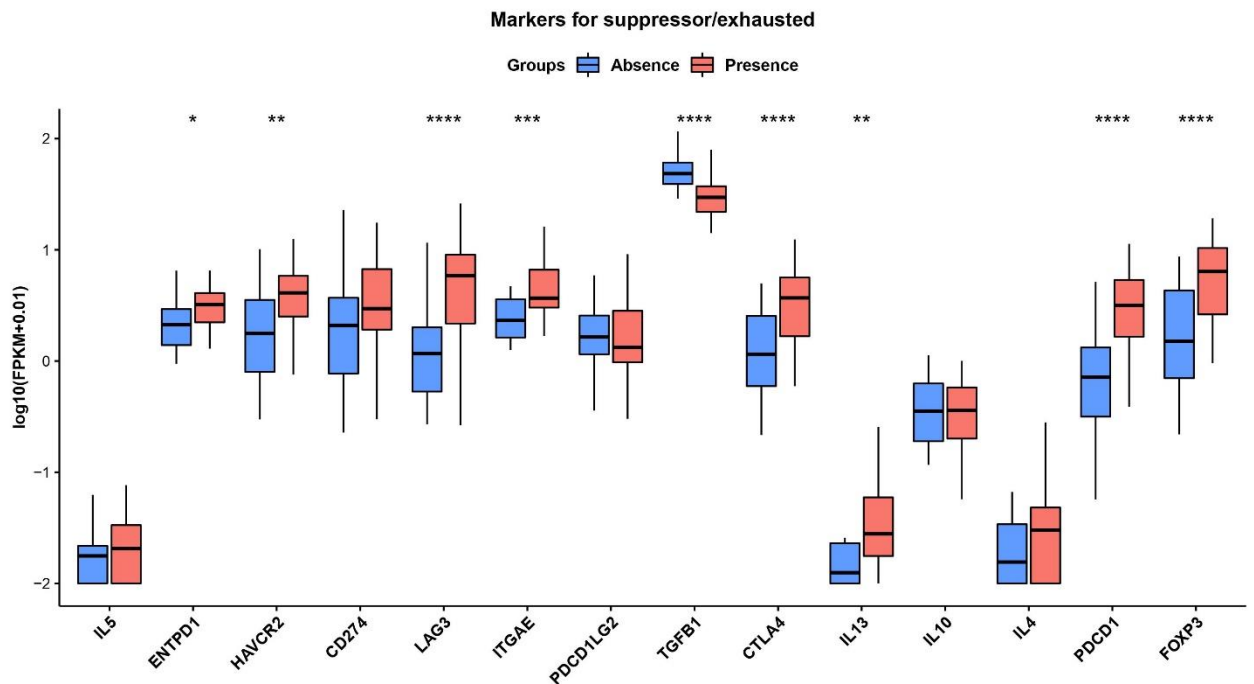
Figura 7 – Curva de sobrevida global em função do *status* viral. Os pacientes HPV+ possuem maior sobrevida global quando comparados aos pacientes HPV-. As curvas de sobrevida foram apresentadas em curvas de Kaplan-Meier e comparadas de forma univariada pelo teste estatístico *Log-rank*.

Ao se avaliar os níveis de expressão de diversos marcadores que se destacam na resposta imune e são frequentemente empregados em diversos estudos e que também foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney (por dados de expressão normalizados em valores FPKM) e dentre os marcadores inflamatórios e citotóxicos, destacaram-se os marcadores *PRF1*, *IL17F*, *IL12A*, *IL23A*, *GZMB*, *IL12B*, *IFNG*, *IL2*, *GZMA* e *IL17A* que mostraram uma tendência de apresentar níveis mais elevados nos pacientes HPV+ e os marcadores *IL8*, *IL1B*, *IL1A* e *IL6* que exibiram uma tendência de apresentar níveis mais elevados nos pacientes HPV- (Figura 8A). Já para os marcadores de supressão e exaustão, destacaram-se diferenças nos marcadores *ENTPD1*(CD39), *HAVCR2* (Tim-3), *LAG3*, *ITGAE* (CD103), *CTLA4*, *PDCD1* (PD-1) e *FOXP3* que tenderam a estar mais expressos nos pacientes HPV+ e diferenças no marcador *TGFB1* que tendeu a estar mais expresso nos pacientes HPV- (Figura 8B).

A



B

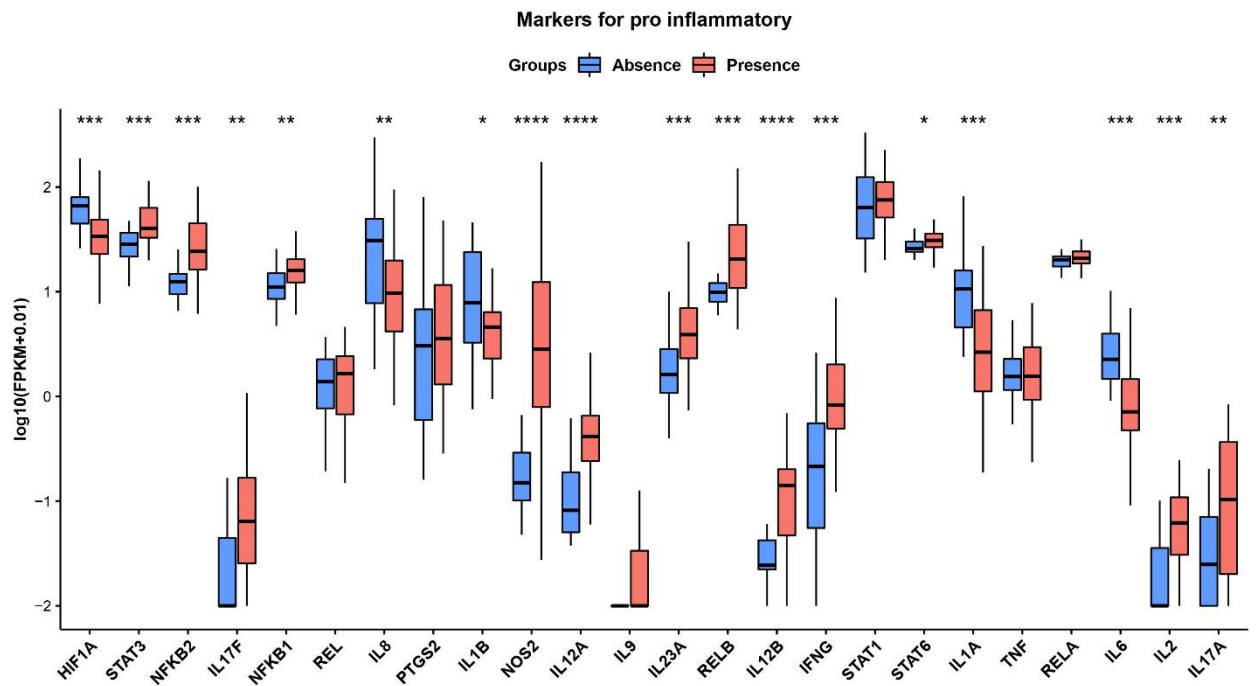


Legenda: Absence: HPV- e Presence: HPV+.

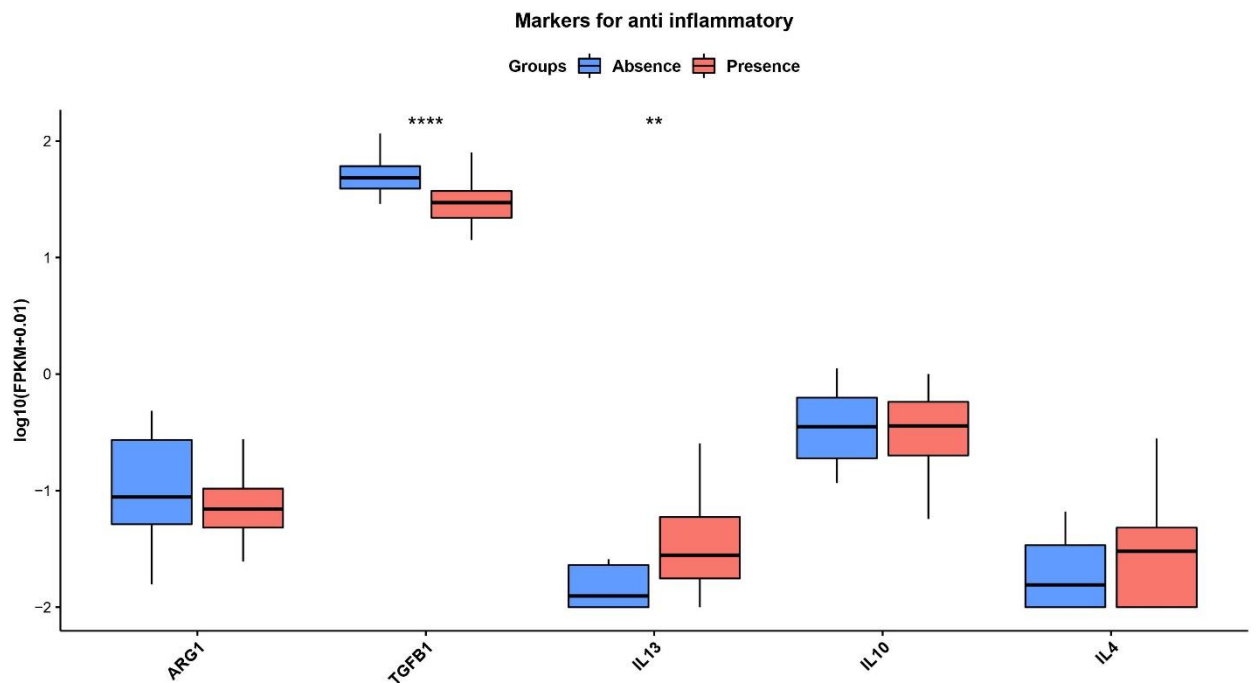
Figura 8 – Principais marcadores de inflamação/citotoxicidade e supressão/exaustão. Tumores HPV+ apresentaram perfil mais inflamatório e com maior tendência de expressão de marcadores de supressão/exaustão (Figuras A e B). Os valores de expressão foram normalizados em FPKM e os grupos comparados pelo teste U de Mann-Whitney (*, p-valor $\leq 0,05$; **, p-valor $\leq 0,001$; ***, p-valor $\leq 0,0001$; ****, p-valor $\leq 0,00001$).

Dentre os marcadores pró-inflamatórios, destacaram-se os marcadores *STAT3*, *NFKB2*, *IL17F*, *NFKB1*, *NOS2*, *IL12A*, *IL23A*, *RELB*, *IL12B*, *IFNG*, *IL2* e *IL17A* que mostraram uma tendência de apresentar níveis de expressão mais elevados nos pacientes HPV+ e os marcadores *HIF1A*, *IL8*, *IL1B*, *IL1A* e *IL6* que tenderam a apresentar níveis de expressão mais elevados nos pacientes HPV- (Figura 9A). Já para os marcadores anti-inflamatórios, destacou-se a diferença observada para o marcador *TGFBI* que tendeu a estar aumentado nos pacientes HPV- (Figura 9B).

A



B



Legenda: Absence: HPV- e Presence: HPV+.

Figura 9 – Principais marcadores pró e anti-inflamatórios. Sustentando o que foi observado na figura anterior, os tumores HPV+ apresentaram perfil mais inflamatório (Figuras A e B). Os valores de expressão foram normalizados em FPKM e os grupos comparados pelo teste U de Mann-Whitney (*, p-valor $\leq 0,05$; **, p-valor $\leq 0,001$; ***, p-valor $\leq 0,0001$; ****, p-valor $\leq 0,00001$).

Os *scores* imunes, estromais e de pureza de tumor dos dados foram calculados pelo *software* ESTIMATE¹⁷⁴ e os valores gerados em cada grupo foram comparados entre si pelo teste U de Mann-Whitney. O grupo HPV+ apresentou o *score* imune significativamente aumentado, enquanto que o grupo HPV- apresentou o *score* estromal significativamente aumentado (Figura 10).

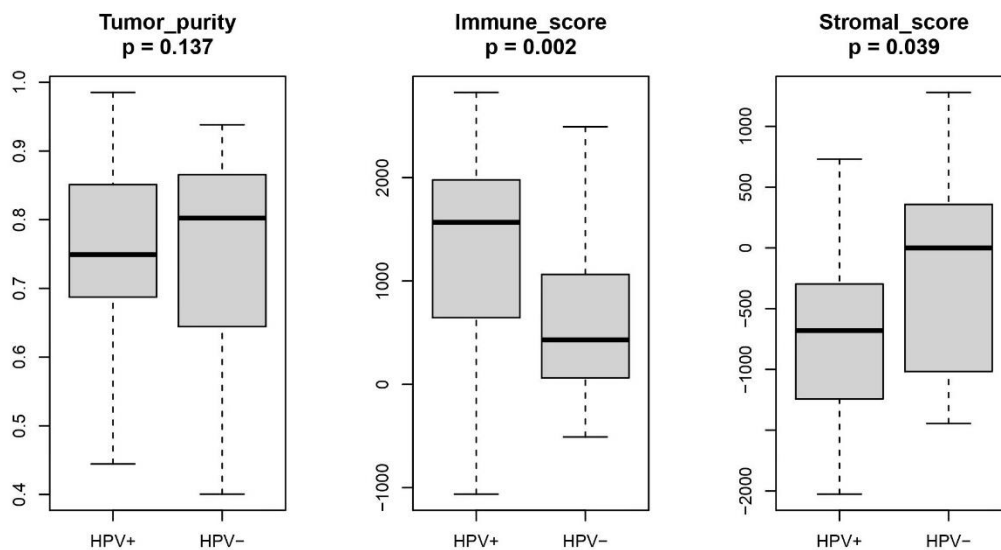
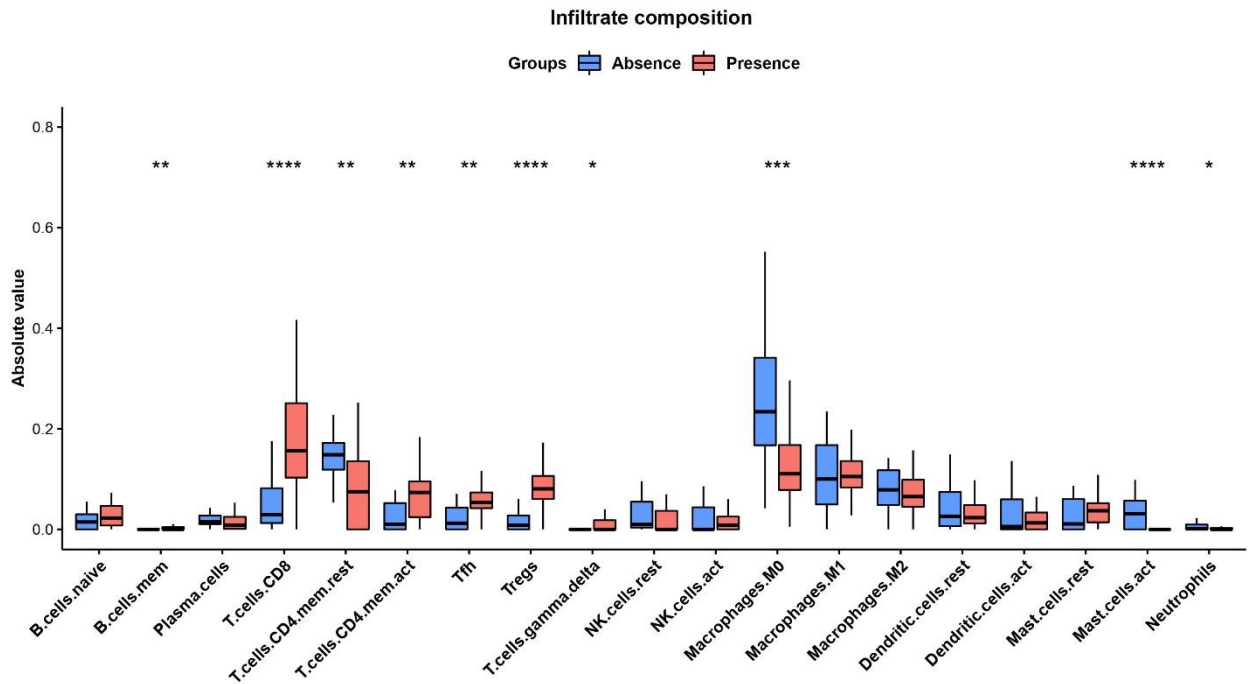


Figura 10 – Comparação entre os *scores* imune, estromal e de pureza de tumor entre os grupos. Os pacientes HPV+ possuem *score* imune aumentado e *score* estromal diminuído em relação aos pacientes HPV-. Os valores gerados pelo *software* ESTIMATE foram comparados pelo teste U de Mann-Whitney.

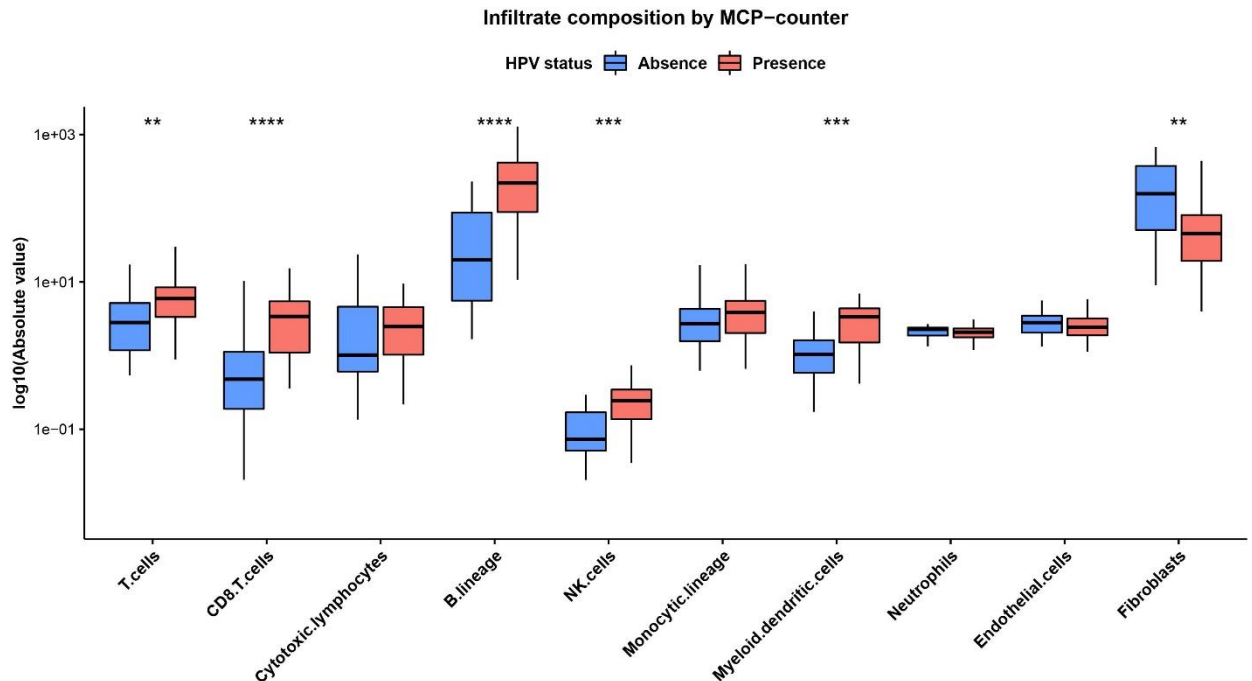
A partir da análise de deconvolução gerada pelo *software* CIBERSORT¹⁷⁵, as populações de 22 tipos de células foram estimadas no infiltrado inflamatório dos dois grupos e comparadas pelo teste U de Mann-Whitney. As populações de células T CD4 *naïve*, monócitos e eosinófilos geraram *scores* igual a zero para a maioria dos pacientes e foram excluídas do gráfico a seguir. As populações de células B de memória, células T CD8, células T CD4 de memória ativada, células T CD4 foliculares (Tfh ou *T Follicular Helper Cell*), células T regulatórias (Treg) e células T gama delta apresentaram-se significativamente mais abundantes nos tumores HPV+ e por outro lado, as células T CD4 de memória em repouso, macrófagos M0, mastócitos ativados e neutrófilos apresentaram-se significativamente mais abundantes nos tumores HPV- (Figura 11).



Legenda: Absence: HPV- e Presence: HPV+.

Figura 11 – Infiltrado inflamatório em tumores de pacientes HPV- e HPV+. Os resultados mostrados incluem populações de célula T, células B, células plasmáticas, células NK e subconjuntos mielóides. As células foram estimadas a partir do *software* CIBERSORT e os *scores* gerados em cada grupo comparados pelo teste U de Mann-Whitney (*, p-valor $\leq 0,05$; **, p-valor $\leq 0,001$; ***, p-valor $\leq 0,0001$; ****, p-valor $\leq 0,00001$).

Além disso, o *software* MCP-counter também foi utilizado para estimar a abundância de 10 populações, em que 8 dessas populações são imunes, além de fibroblastos e células endoteliais. Os grupos estudados foram comparadas pelo teste U de Mann-Whitney, em que as populações de células T, células T CD8, linhagem B, células NK e células dendríticas mielóides apresentaram-se significativamente mais abundantes nos tumores HPV+, enquanto que a população de fibroblastos apresentou-se significativamente mais abundante nos tumores HPV- (Figura 12).



Legenda: Absence: HPV- e Presence: HPV+.

Figura 12 – Infiltrado inflamatório em tumores de pacientes HPV- e HPV+. Os resultados mostrados incluem populações de célula T, linhagem B, células NK, subconjuntos mielóides e células estromais. As células foram estimadas a partir do *software* MCP-counter e os *scores* gerados em cada grupo comparados pelo teste U de Mann-Whitney (**, p-valor $\leq 0,001$; ***, p-valor $\leq 0,0001$; ****, p-valor $\leq 0,00001$).

A partir dos dados SNVs somáticos dos casos de carcinoma de orofaringe disponíveis pelo projeto TCGA-MC3, análises foram realizadas pelos *softwares* MutationalPatterns¹⁷⁸, SomaticSignatures¹⁷⁹, signeR¹⁷⁷ e SigProfiler¹⁸⁰ que extraíram as assinaturas mutacionais por uma abordagem *de novo* (do latim *de novo* significa “desde o início”), a fim de identificar os processos mutacionais presentes nas amostras analisadas, de forma que essas assinaturas geradas fossem, então, comparadas com as assinaturas de substituição de base única já descritas pelo catálogo COSMIC (v2).

As assinaturas extraídas *de novo* pelo *software* MutationalPatterns (assinaturas S1 e S2 como na Figura 13) mostraram principalmente variações C>A, C>G e C>T e, no caso da assinatura S1, também mostraram algumas variações T>A, T>C e T>G. Quando comparadas às 30 assinaturas mutacionais de substituição de base única descritas pelo COSMIC (v2) (Figura 17), a assinatura S1 demonstrou alta similaridade com as Assinaturas 2 (similaridade = 0,87) e 13 (similaridade = 0,75) já descritas no COSMIC (v2), enquanto que a assinatura S2 demonstrou alta similaridade com as Assinaturas 1 (similaridade = 0,91) e 6 (similaridade = 0,85) descritas no COSMIC (v2). A matriz de similaridades entre as assinaturas mutacionais

extraídas *de novo* e as assinaturas mutacionais presentes no catálogo COSMIC (v2) se encontra no Apêndice 1.

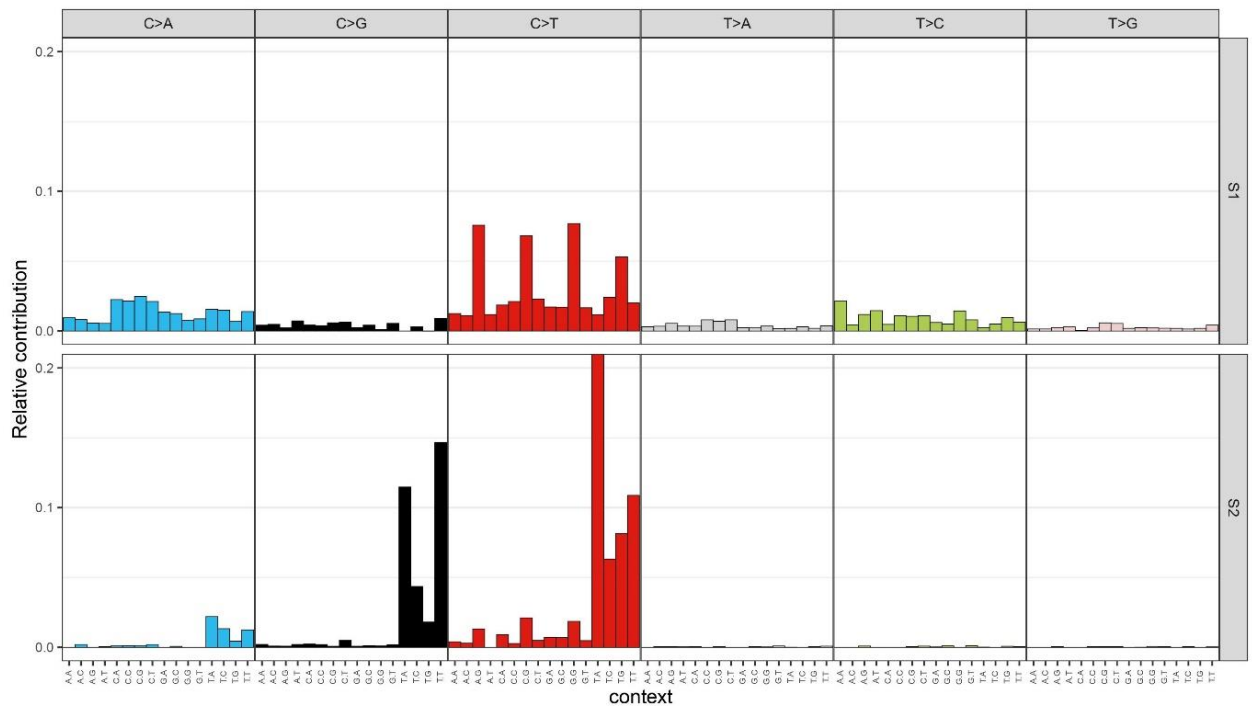


Figura 13 – Assinaturas mutacionais extraídas pela abordagem *de novo* do *software* MutationalPatterns. A Figura mostra as principais variações em único nucleotídeo encontradas nas assinaturas construídas (S1 e S2) pelo *software* utilizado.

As assinaturas construídas *de novo* pelo *software* SomaticSignatures (assinaturas S1, S2 e S3 como na Figura 14) mostraram principalmente variações C>A, C>G e C>T e, no caso das assinaturas S1 e S3, também mostraram algumas variações T>A, T>C e T>G. Quando comparadas às 30 assinaturas mutacionais de substituição de base única descritas pelo COSMIC (v2) (Figura 17), a assinatura S1 demonstrou alta similaridade com as Assinaturas 1 (similaridade = 0,63) e 2 (similaridade = 0,62) descritas no COSMIC (v2).

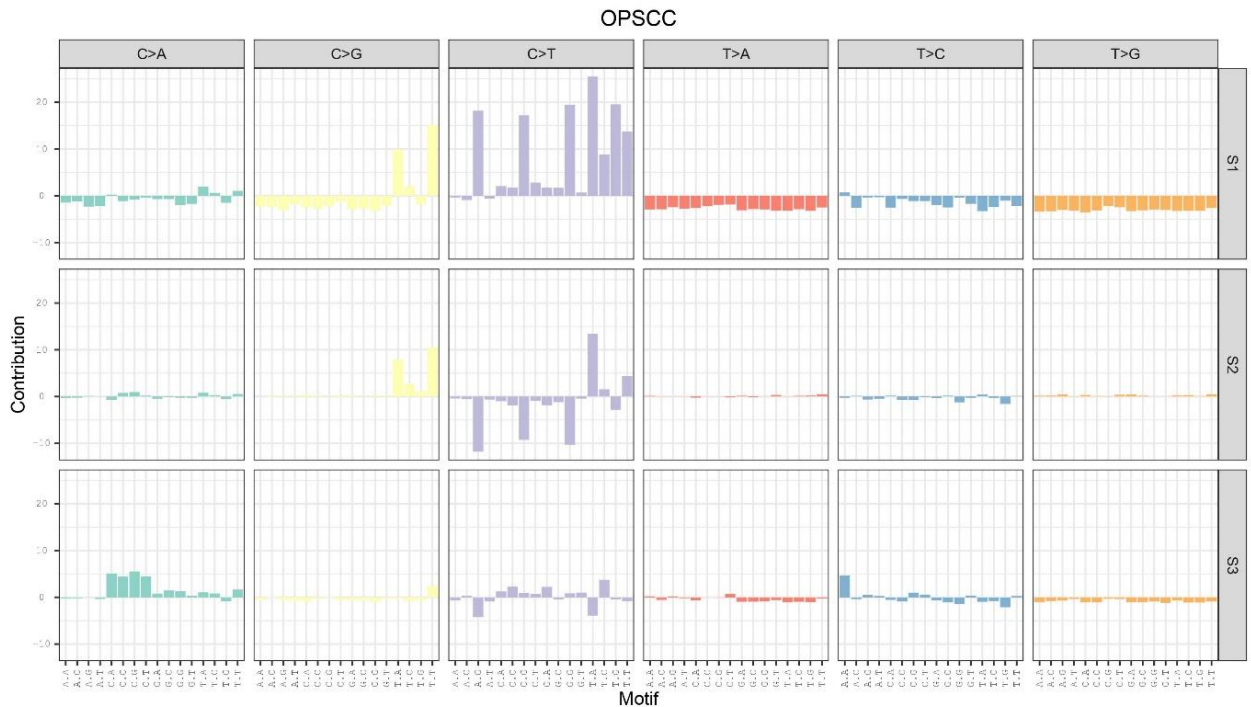


Figura 14 – Assinaturas mutacionais extraídas pela abordagem *de novo* do *software* SomaticSignatures. A Figura mostra as principais variações em único nucleotídeo encontradas nas assinaturas construídas (S1, S2 e S3) pelo *software* utilizado.

As assinaturas construídas *de novo* pelo *software* signeR (assinaturas S1, S2 e S3 como na Figura 15) mostraram principalmente variações C>A, C>G e C>T e, no caso da assinatura S3, também mostraram algumas variações T>A, T>C e T>G. Quando comparadas às 30 assinaturas mutacionais de substituição de base única descritas pelo COSMIC (v2) (Figura 17), a assinatura S1 demonstrou alta similaridade com a Assinatura 2 (similaridade = 0,70) descrita no COSMIC (v2) e a assinatura S2 demonstrou alta similaridade com as Assinaturas 1 (similaridade = 0,96) e 6 (similaridade = 0,75) descritas no COSMIC (v2).

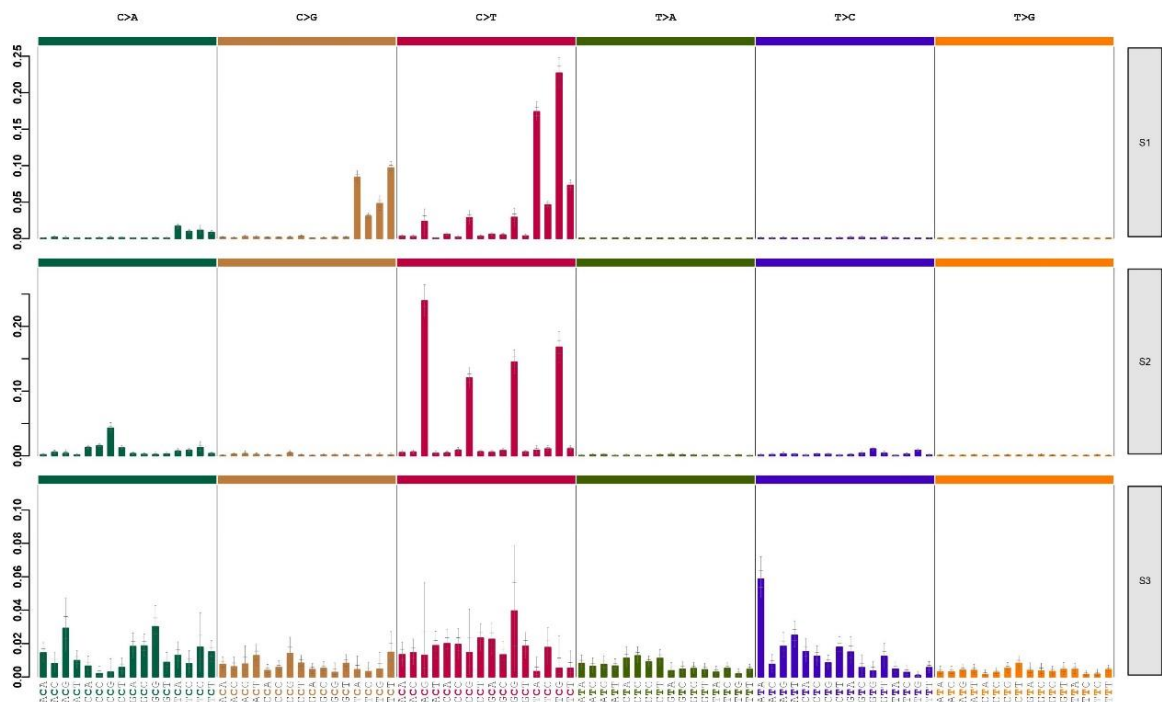


Figura 15 – Assinaturas mutacionais extraídas pela abordagem *de novo* do *software* *signeR*. A Figura mostra as principais variações em único nucleotídeo encontradas nas assinaturas construídas (S1, S2 e S3) pelo *software* utilizado.

As assinaturas construídas *de novo* pelo *software* *SigProfiler* (assinaturas A, B e C como na Figura 16) mostraram principalmente variações C>A, C>G e C>T e, no caso da assinatura C, também mostraram algumas variações T>A, T>C e T>G. Quando comparadas às 30 assinaturas mutacionais de substituição de base única descritas pelo COSMIC (v2) (Figura 17), a assinatura A demonstrou alta similaridade com as Assinaturas 2 (similaridade = 0,85) e 13 (similaridade = 0,76) descritas no COSMIC (v2) e a assinatura B demonstrou alta similaridade com as Assinaturas 1 (similaridade = 0,95) e 6 (similaridade = 0,85) descritas no COSMIC (v2).

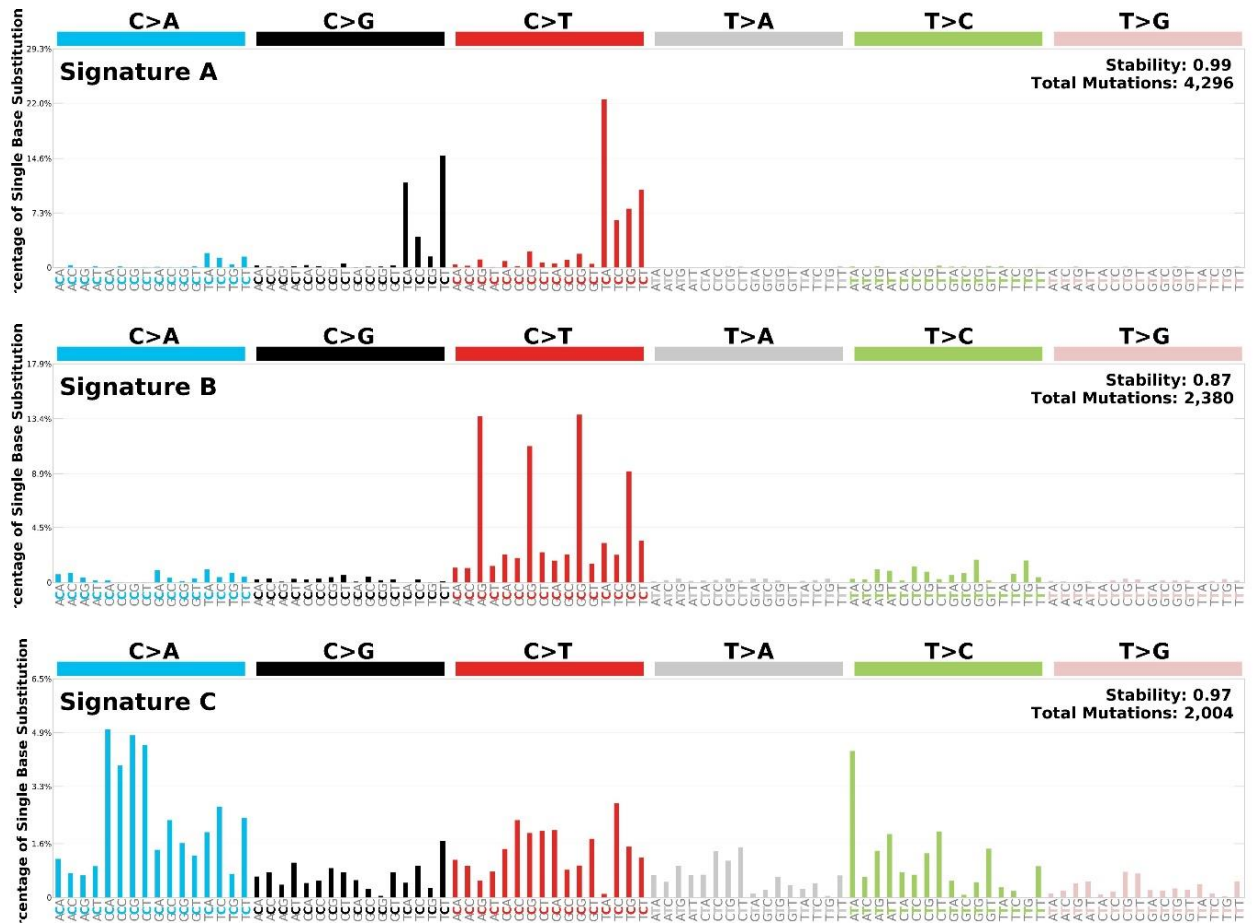


Figura 16 – Assinaturas mutacionais extraídas pela abordagem *de novo* do software SigProfiler. A Figura mostra as principais variações em único nucleotídeo encontradas pelas assinaturas construídas (A, B e C) pelo software utilizado. Os parâmetros *Stability* e *Total Mutations* exibidos significam valor calculado de similaridade dos cossenos e total de mutações, respectivamente.

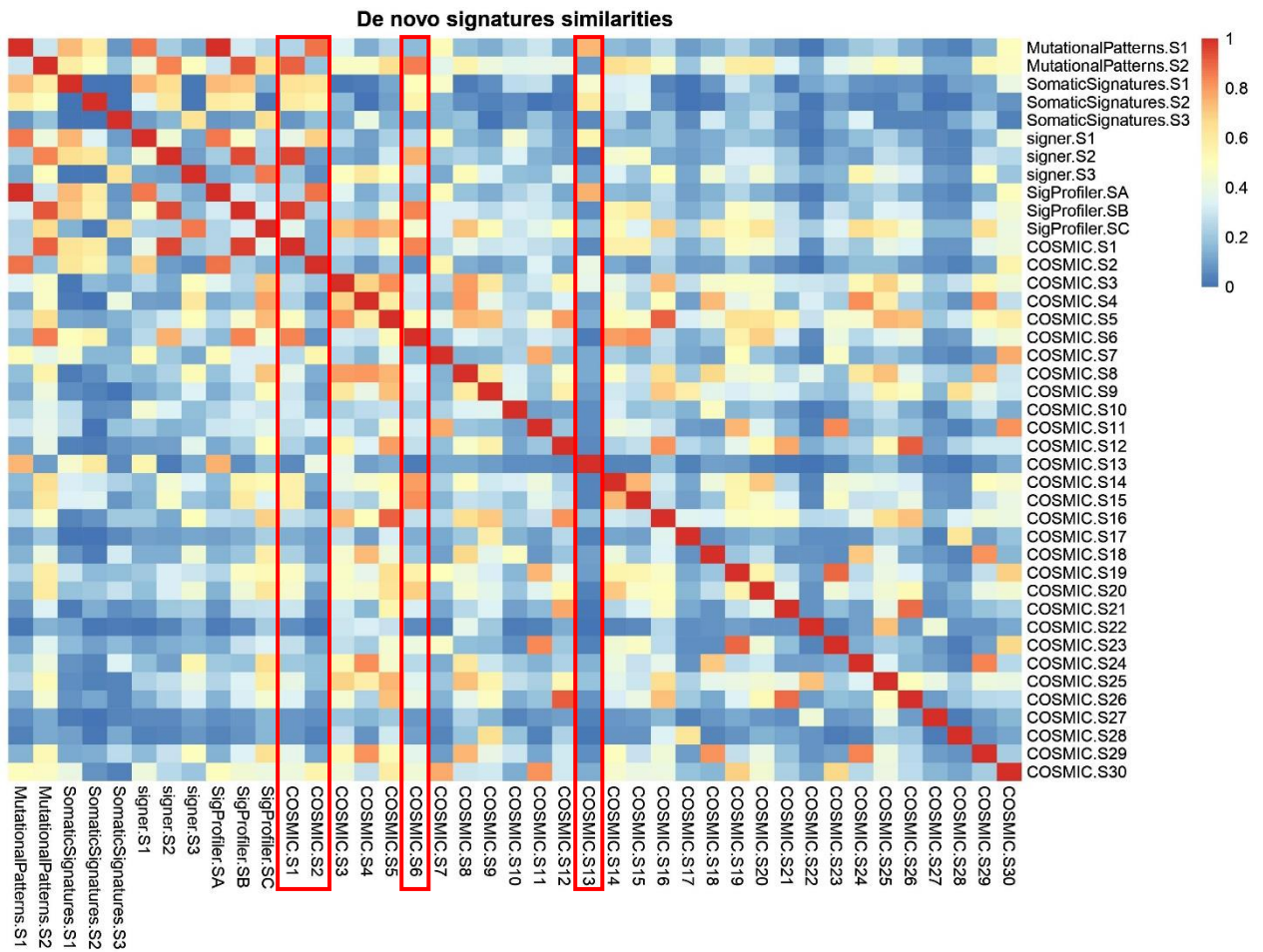
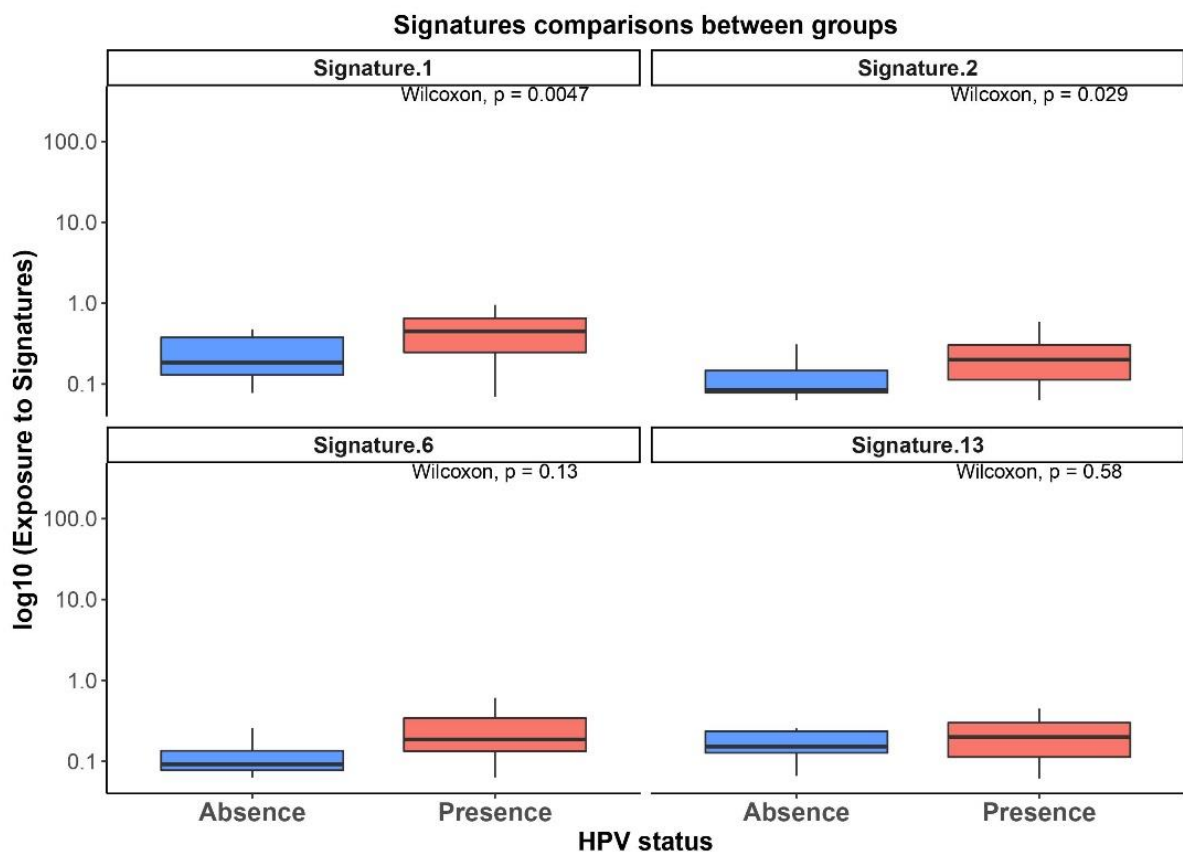


Figura 17 – Comparação das similaridades apresentadas pelas assinaturas extraídas *de novo* com as 30 assinaturas descritas pelo COSMIC (v2). Para o *software* MutationalPatterns, a assinatura S1 demonstrou alta similaridade com as Assinaturas 2 e 13 descritas no COSMIC (v2), enquanto que a assinatura S2 demonstrou alta similaridade com as Assinaturas 1 e 6 descritas pelo COSMIC (v2). Para o *software* SomaticSignatures, a assinatura S1 demonstrou alta similaridade com as Assinaturas 1 e 2 descritas no COSMIC (v2). Para o *software* SigneR, a assinatura S1 demonstrou alta similaridade com a Assinatura 2 descrita pelo COSMIC (v2), enquanto que a assinatura S2 demonstrou alta similaridade com as Assinaturas 1 e 6 descritas pelo COSMIC (v2). Para o *software* SigProfiler, a assinatura A demonstrou alta similaridade com as Assinaturas 2 e 13 descritas no COSMIC (v2), enquanto que a assinatura B demonstrou alta similaridade com as Assinaturas 1 e 6 descritas pelo COSMIC (v2).

Também a partir dos dados SNVs somáticas dos casos de carcinoma de orofaringe disponíveis pelo projeto TCGA-MC3, uma análise mutacional a partir da abordagem *fitting* (do inglês *fitting* significa “por encaixe” ou “ajustado”) foi também realizada pelo *software* deconstructSigs¹⁸¹. Nessa abordagem, são utilizadas assinaturas já conhecidas e pré-selecionadas (nesse caso foram selecionadas as assinaturas de substituição de base única 1, 2,

6 e 13 do COSMIC (v2)), com o intuito de quantificar a contribuição dessas assinaturas para o perfil mutacional de cada amostra.

O teste estatístico de Wilcoxon não pareado (também conhecido como teste U de Mann-Whitney) foi realizado para comparar se nos grupos analisados (HPV- e HPV+) há diferenças entre os tipos de assinaturas mutacionais presentes identificadas pelo *software* deconstructSigs (padrões de Assinaturas Mutacionais 1, 2, 6 e 13). Observa-se que os pacientes com carcinoma de orofaringe HPV+ tenderam a estar mais expostos às Assinaturas Mutacionais 1 (atribuído ao processo de envelhecimento celular) e 2 (atribuído à atividade da família de citidinas deaminases AID/APOBECs) quando comparados aos pacientes HPV- (Figura 18).

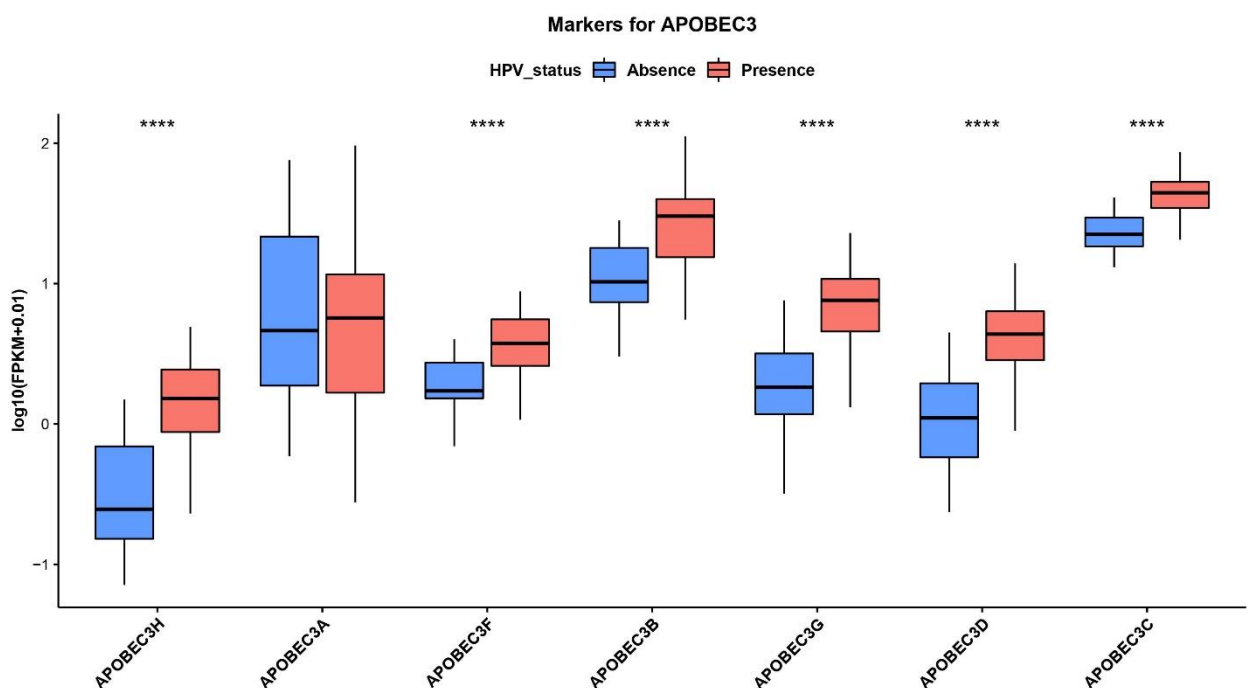


Legenda: Absence: HPV- e Presence: HPV+.

Figura 18 – Comparação entre os padrões de assinaturas mutacionais em cada grupo (HPV- e HPV+) selecionados e analisados pela abordagem *fitting* realizada pelo *software* deconstructSigs. Pacientes com carcinoma de orofaringe HPV+ tenderam a apresentar uma maior exposição às Assinaturas Mutacionais 1 e 2. O teste de Wilcoxon não pareado (teste U de Mann-Whitney) foi utilizado para avaliar se há diferença na contribuição dessas assinaturas entre as amostras HPV- e HPV+.

Dada a observação sobre o impacto que a Assinatura Mutacional 2 (associada à atividade da família de citidinas deaminases AID/APOBECs) exerce sobre os pacientes HPV+

em carcinoma de orofaringe, nós investigamos a influência dessas enzimas no contexto tumoral, particularmente as APOBECs da família 3, que está associada a diversos padrões de mutações somáticas encontrados em tumores. Ao se avaliar os níveis de expressão de diversos membros dessa família de enzimas nos grupos analisados e comparados pelo teste U de Mann-Whitney (por dados de expressão normalizados em valores FPKM), observou-se que diversas APOBEC3s exibiram uma tendência de expressão aumentada nos tumores HPV+ quando comparadas aos pacientes HPV- (Figura 19).



Legenda: Absence: HPV- e Presence: HPV+.

Figura 19 – Comparação dos níveis de expressão dos diversos membros da família APOBEC3s. Diversas APOBEC3s tenderam a possuir expressão aumentada nos tumores HPV+. Os valores de expressão foram normalizados em FPKM e os grupos comparados pelo teste U de Mann-Whitney (****, p-valor $\leq 0,00001$).

Os níveis de expressão normalizados em FPKM dos marcadores imunes e das APOBEC3s (também exibidos nas Figuras 8, 9 e 19, respectivamente) mostrou diversos aspectos interessantes em relação ao panorama transcriptômico entre os grupos e, para validar esses padrões observados, foi realizada uma outra avaliação com o auxílio do *software* DESeq2¹⁸², que permite analisar, de forma global, os genes diferencialmente expressos entre os grupos a partir de testes de múltiplas comparações. O grupo HPV- foi considerado como a categoria de referência para essa análise e no *Volcano Plot* exibido a seguir, é possível observar que

diversos genes associados as APOBEC3s, genes de supressão/anti-inflamatórios e da resposta imune citotóxica/inflamatória (pontos na cor rosa, verde e azul respectivamente) apresentaram-se diferencialmente expressos e aumentados nos pacientes HPV+ (como foi também demonstrado nas Figuras 8, 9 e 19). A principal diferença notada foi para o gene *TGFB1* que se encontrou diminuído nos pacientes HPV+ (informação que foi também demonstrada pela Figura 9B). Cada ponto nesse gráfico representa um gene e dos três grupos que foram evidenciados no gráfico, dois genes de cada categoria foram também destacados com os seus nomes (*APOBEC3B*, *APOBEC3H*, *TGFB1*, *PDCD1*, *GZMB* e *IFNG*) (Figura 20). O quadro com os valores de $\log_2\text{FoldChange}$ e p-valor ajustado da análise diferencial dos genes exibidos nas Figuras 8, 9 e 19 e que foi conduzido pelo *software* DESeq2 se encontra no Apêndice 2.

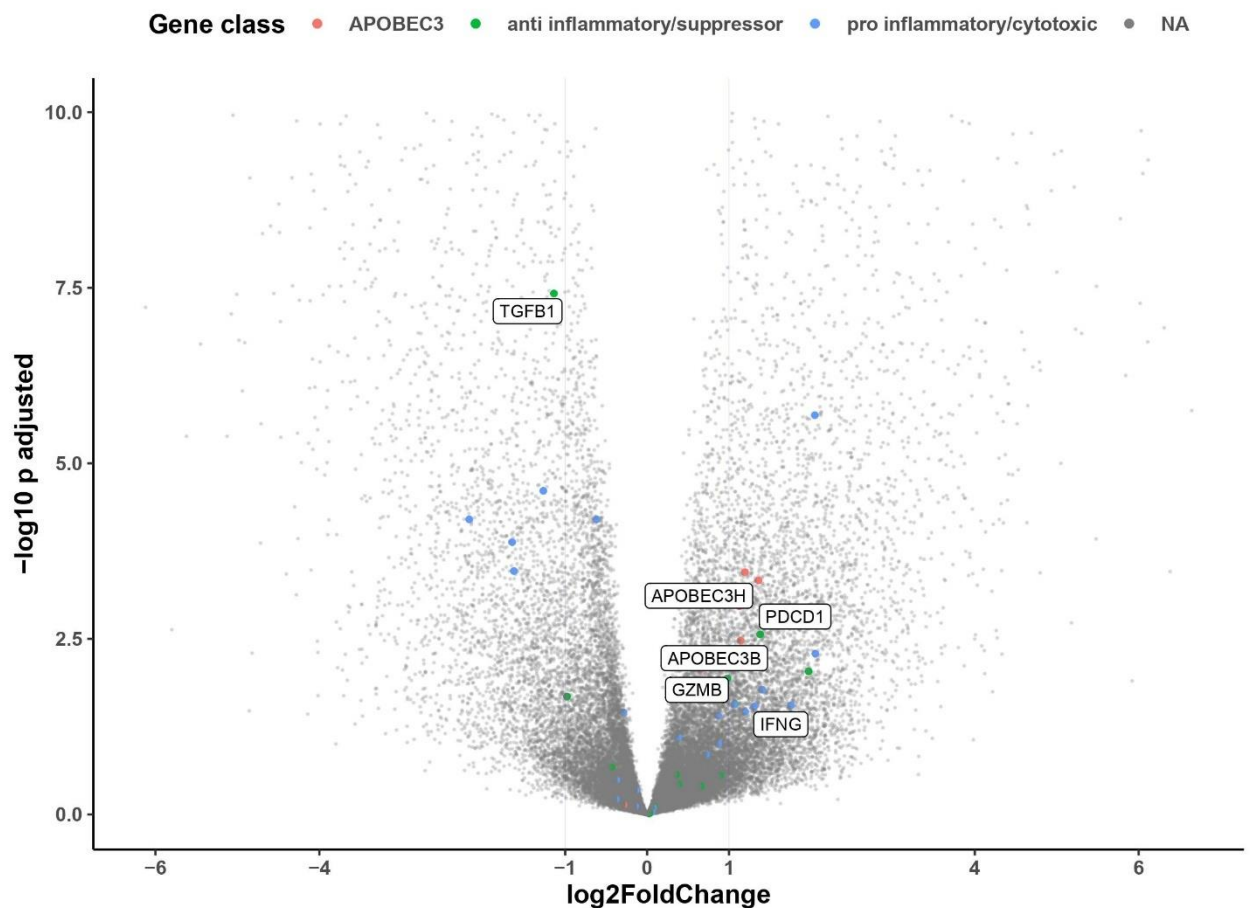
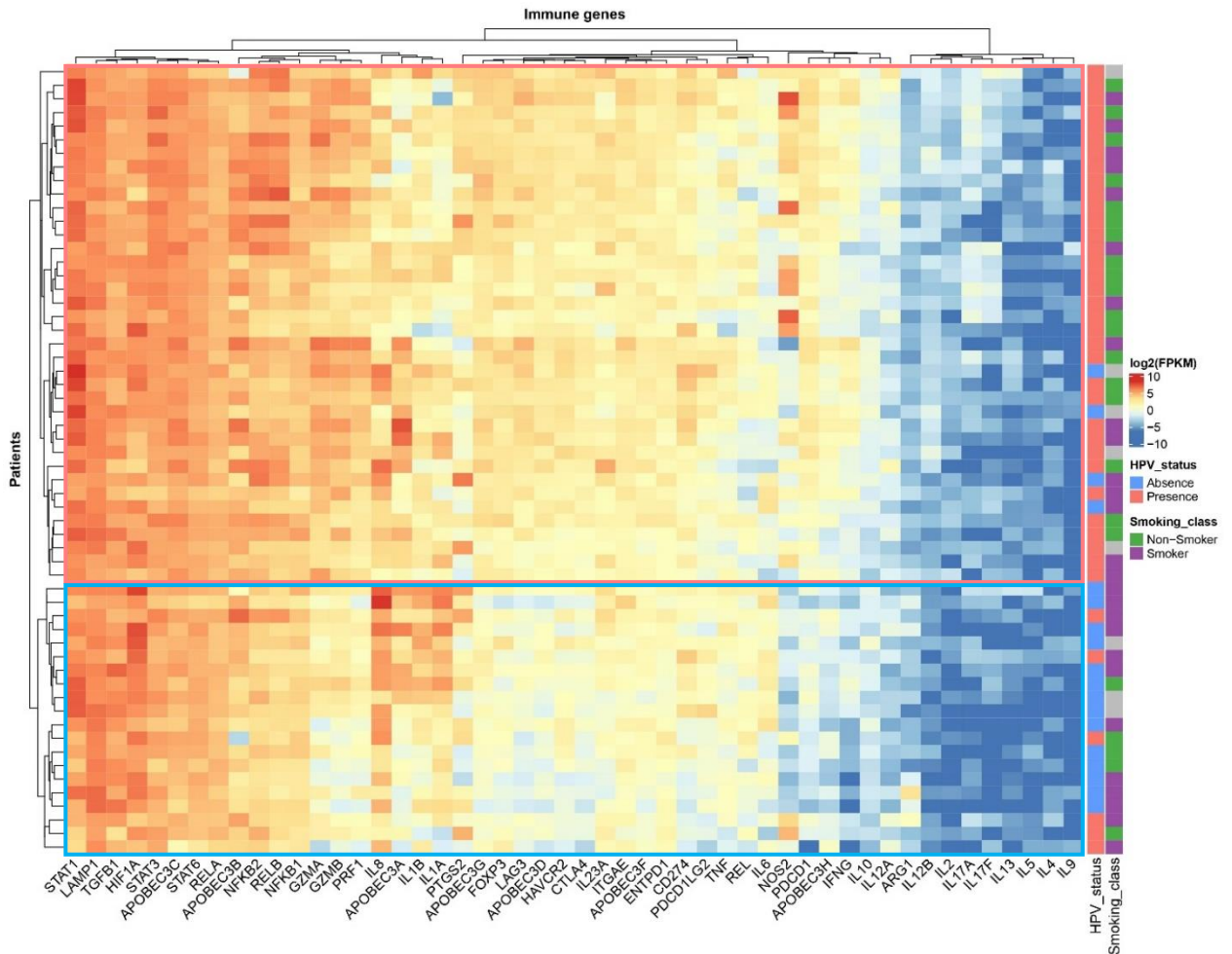


Figura 20 – Representação gráfica dos DEGs a partir de um *Volcano Plot*. Os pontos dispersos representam os genes diferencialmente expressos identificados pelo *software* DESeq2. No eixo X é mostrado o $\text{Log}_2\text{FoldChange}$ enquanto que no eixo Y é mostrado o $-\text{Log}_{10}$ do p-valor ajustado. Os pontos à direita representam os genes diferencialmente expressos e aumentados nos pacientes HPV+ quando comparados com os pacientes HPV- e os pontos à esquerda representam os genes diferencialmente expressos e diminuídos nos pacientes HPV+ quando comparados com os pacientes HPV-. A maioria dos DEGs encontrados são representados pela cor cinza, porém alguns genes de interesse foram destacados como é o caso dos genes que indicam as APOBEC3s (em rosa)

e que também foram citados na Figura 19, genes considerados supressores ou de exaustão (em verde) e os genes considerados pró-inflamatórios ou citotóxicos (em azul), ambos citados nas Figuras 8 e 9. Alguns genes de cada uma das categorias destacadas também foram evidenciados com os seus nomes nessa Figura.

Para avaliar o perfil transcricional imune dos grupos analisados, foi feito um *heatmap* com agrupamento não supervisionado hierárquico e distância euclidiana com os genes imunes e das APOBEC3s (destacados também nas Figuras 8, 9 e 19, respectivamente). Essa abordagem visual permitiu a visualização de dois grandes grupos exibidos pelo dendrograma horizontal (que separa os pacientes): um *cluster* superior maior (evidenciado pelo quadro rosa e nomeado como '*cluster 1*') de maioria HPV+ e não-tabagista e um *cluster* inferior menor (evidenciado pelo quadro azul e nomeado como '*cluster 2*') de maioria HPV- e tabagista. É interessante notar como ocorreram alguns agrupamentos gênicos em relação ao *cluster 1* e ao *cluster 2*. Observa-se um grupo formado por diversos genes envolvidos na resposta inflamatória (formado pelos genes *NFKB2*, *RELB*, *NFKB1*, *GZMA*, *GZMB* e *PFRI*) que exibiu um perfil mais intenso de expressão nos pacientes do *cluster 1* de maioria HPV+ e também é possível identificar um grupo com alguns genes associados a lesão celular e a resposta imune inata (formado pelos genes *IL8*, *IL1B*, *IL1A* e *PTGS2*) mais intensamente expressos no *cluster 2* de maioria HPV-. Há também um outro grupo com diversos genes associados a uma resposta imune adaptativa (com diversos genes envolvidos na citotoxicidade e supressão como os genes *NOS2*, *PDCD1*, *IFNG* e *IL10*) menos intensamente expresso no *cluster 2* de maioria HPV- (Figura 21).

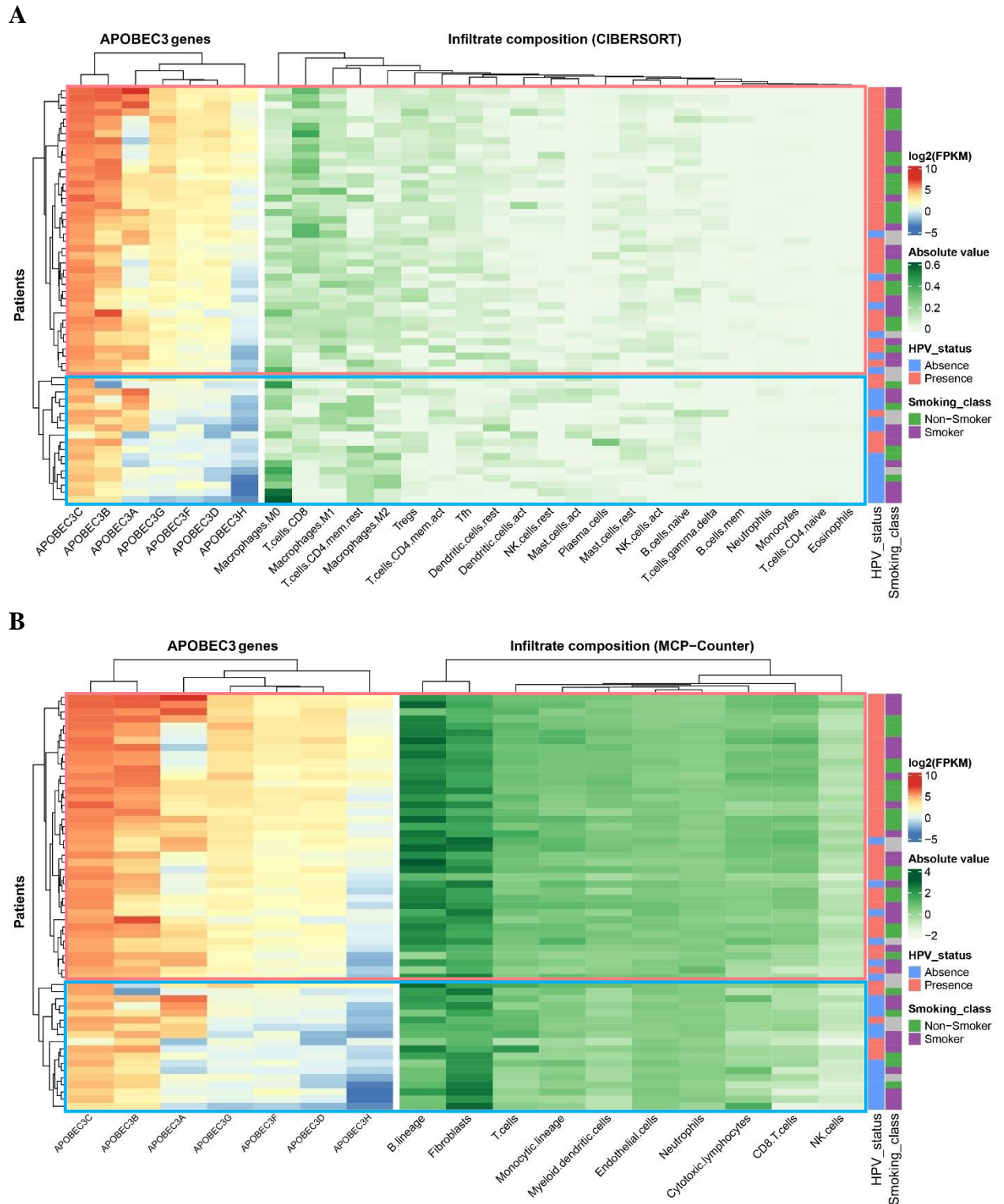


Legenda: Absence: HPV- e Presence: HPV+.

Figura 21 – *Heatmap* do perfil transcricional imune do carcinoma orofaríngeo de células escamosas. A Figura mostra o perfil transcricional a partir dos valores de expressão normalizados em FPKM dos genes imunes citados nas Figuras 8 e 9 e dos genes das APOBEC3s citados na Figura 19. Nas barras laterais, é possível observar a classificação do *status* de HPV e de tabagismo em cada paciente. O dendrograma horizontal mostra a divisão dos pacientes em dois grandes *clusters*: um *cluster* superior maior que contém, em sua maioria, pacientes HPV+ e não-tabagistas (*cluster 1* evidenciado dentro do quadro rosa) e um *cluster* inferior menor que contém, em sua maioria, pacientes HPV- e tabagistas (*cluster 2* evidenciado dentro do quadro azul). Os *clusters* citados apresentam padrões de expressão gênica distintos entre si, com predominância de genes associados a uma resposta imune inata e lesão tecidual no cluster de maioria HPV- e predominância de genes associados a uma resposta imune adaptativa (genes associados a inflamação e supressão) no *cluster* de maioria HPV+. Os valores de expressão dos genes exibidos foram normalizados em FPKM.

A mesma abordagem visual (*heatmap* de agrupamento não supervisionado hierárquico e distância euclidiana) foi empregada para fazer a visualização do perfil de abundância de infiltrado imune presente nos pacientes e estimados pelos *softwares* CIBERSORT e MCP-counter (como também destacado nas Figuras 11 e 12, respectivamente), assim como também

do perfil de expressão gênica das APOBEC3s (como também destacado na Figura 19). Em ambas as Figuras 22 A e B, a formação de dois grandes *clusters* (pelo dendrograma horizontal) é novamente observada entre os pacientes de forma semelhante ao *heatmap* anterior (Figura 21), com um *cluster* superior maior que abrange, em sua maioria, os pacientes HPV+ e não-tabagistas (evidenciado pelo quadro rosa) e um *cluster* inferior menor que abrange, principalmente, os pacientes HPV- e tabagistas (evidenciado pelo quadro azul). O agrupamento dos genes das APOBEC3s ocorreu de forma interessante e também semelhante aos dados apresentados na Figura 19, em que as APOBEC3s apresentaram um perfil de expressão mais intensa no *cluster* superior que também contém maioria HPV+ (Figura 22 A e B). No tocante os dados de infiltrado inflamatório, tanto para a Figura 22A, quanto para a Figura 22B, o destaque vai para as células T CD8⁺, que segregaram de forma interessante e se apresentaram predominantemente abundantes nos pacientes que pertencem ao *cluster* superior de maioria HPV+. Já em relação aos pacientes que pertencem ao *cluster* inferior de maioria HPV-, as populações de macrófagos M0 (Figura 22A) e fibroblastos (Figuras 22B) apresentaram-se predominantemente abundantes.



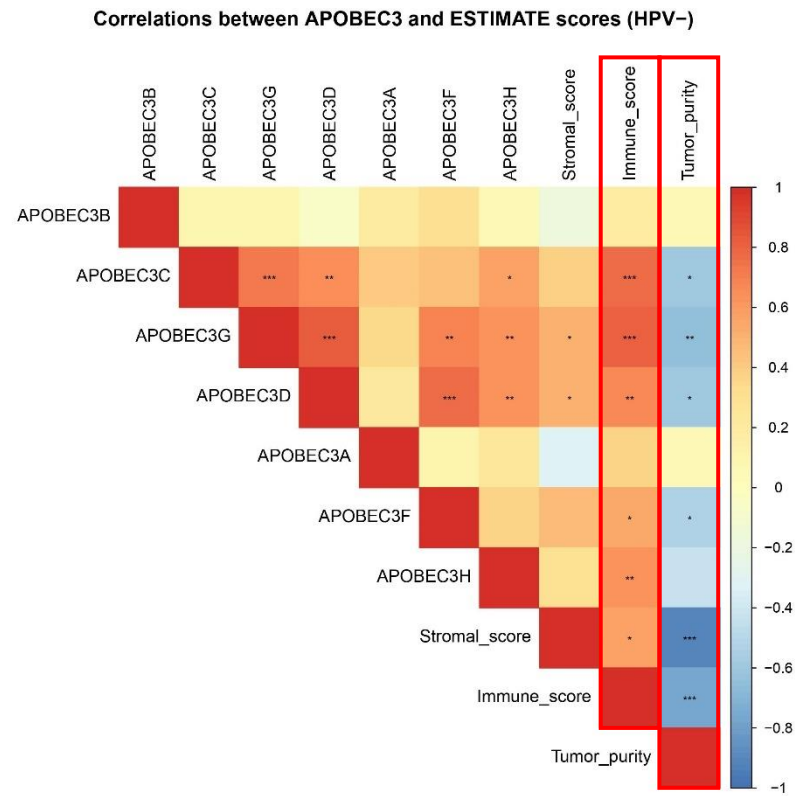
Legenda: Absence: HPV- e Presence: HPV+.

Figura 22 – Heatmaps dos perfis inflamatórios e perfil transcricional por ABOBEC3s do carcinoma orofaríngeo de células escamosas. As Figuras A e B mostram, à esquerda, o perfil transcricional a partir dos valores de expressão normalizados em FPKM dos genes das APOBEC3s (citados na Figura 19). À direita, as Figuras A e B mostram os perfis inflamatórios a partir dos valores absolutos gerados pelos algoritmos de deconvolução CIBERSORT (Figura A) e MCP-counter (Figura B), como também destacado pelas Figuras 11 e 12, respectivamente. Nas barras laterais, é possível observar a classificação do *status* de HPV e de

tabagismo em cada paciente. O dendrograma horizontal mostra a divisão dos pacientes em dois grandes *clusters*: um *cluster* superior maior que contém, em sua maioria, pacientes HPV+ e não-tabagistas (evidenciado dentro do quadro rosa) e um *cluster* inferior menor que contém, em sua maioria, pacientes HPV- e tabagistas (evidenciado dentro do quadro azul). Diversas APOBEC3s apresentaram perfil de expressão gênica distintos entre os dois *clusters* indicados pelo dendrograma maior. Em relação as abundâncias do infiltrado inflamatório exibidos pelos *softwares* CIBERSORT e MCP-counter, destaca-se aqui o perfil distinto da abundância das células T CD8⁺, macrófagos M0 (Figura A) e fibroblastos (Figura B) entre os dois *clusters* observados. Os valores de expressão das APOBEC3s exibidas foram normalizados em FPKM.

Os *scores* gerados pelo *software* ESTIMATE foram correlacionados (correlação de Spearman) com os valores normalizados de expressão dos diversos membros da família de APOBEC3s (destacados também nas Figuras 10 e 19, respectivamente). A escala de cor apresentada nos gráficos está relacionada ao sentido da correlação (tons de vermelho indicam correlações progressivamente positivas e tons de azul indicam correlações progressivamente negativas). Ambos os grupos (HPV- e HPV+) apresentaram os diversos membros da família de APOBEC3s com moderada correlação positiva e fraca/moderada correlação negativa com o *score* imune e a pureza tumoral, respectivamente (Figura 23 A e B). O quadro com os valores do coeficiente de correlação de Spearman e p-valor das correlações entre os *scores* gerados pelo *software* ESTIMATE e os valores de expressão normalizados das APOBEC3s se encontra no Apêndice 3.

A



B

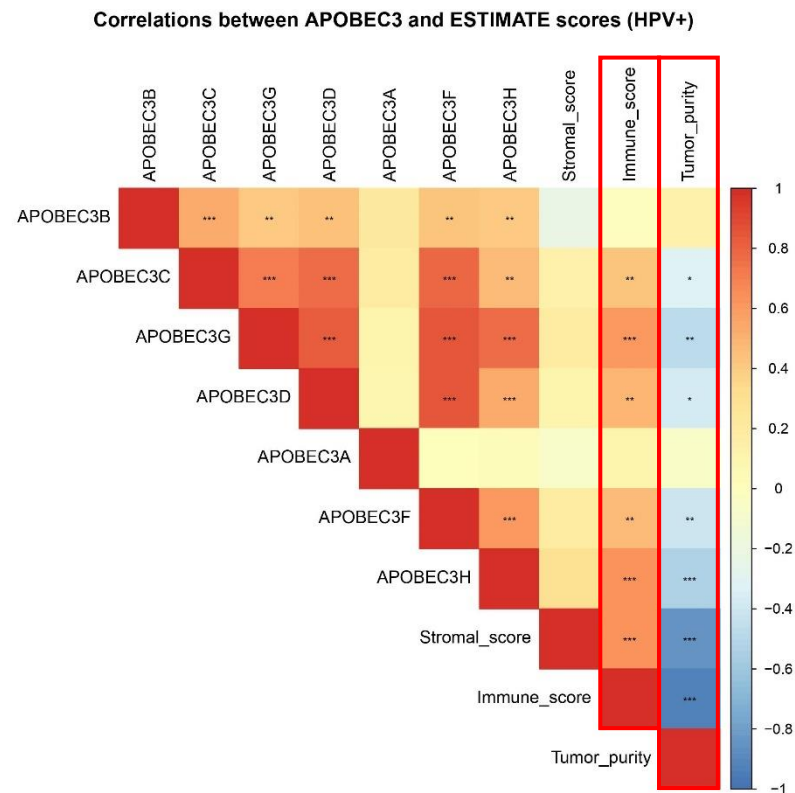


Figura 23 – Matrizes de correlação entre os *scores* gerados pelo *software* ESTIMATE e os valores de expressão normalizados das APOBEC3s. Diversos membros da família de APOBEC3s

apresentaram nos grupos HPV- e HPV+ (Figuras A e B) moderada correlação positiva com o *score* imune e fraca/moderada correlação negativa com a pureza tumoral. Os valores de expressão das APOBEC3s foram normalizados em FPKM e as correlações apresentadas foram por correlação de Spearman.

Com o objetivo de integrar os dados gerados anteriormente, modelos de regressão logística simples e múltiplos binomiais foram construídos. A variável dependente selecionada foi o *status* viral (HPV- ou HPV+) e as variáveis independentes selecionadas foram assinatura gênica apresentada, *score* de infiltrado de linfócitos T CD8 gerado pelo *software* CIBERSORT e *score* de Assinatura Mutacional 2 gerado pelo *software* deconstructSigs. Essas variáveis foram escolhidas fundamentadas nos resultados gerados nas análises anteriores. A assinatura gênica é uma variável que resume a assinatura de expressão gênica imunológica dos pacientes e que foi elaborada a partir do agrupamento dos genes que se alinham ao *cluster* 1 (bastante relacionado com uma resposta imune adaptativa e inflamatória crônica) ou ao *cluster* 2 (bastante relacionado com uma resposta imune inata e inflamatória aguda) como observado no *heatmap* da Figura 21. Essa foi, portanto, uma variável categórica que entrou no modelo classificada como “pertencimento ao *cluster* 1” ou “pertencimento ao *cluster* 2”, em que a última foi considerada como a categoria de referência na análise. O *score* de abundância de infiltrado de linfócitos T CD8 do *software* CIBERSORT foi escolhido pelo seu notável agrupamento apresentado no *heatmap* da Figura 22. Já a variável Assinatura Mutacional 2 gerada pelo *software* deconstructSigs foi escolhida por ser o padrão de assinatura mutacional que demonstrou diferenças na exposição a essa assinatura entre os pacientes HPV- e HPV+ (Figura 18).

O objetivo dos modelos de regressão desenvolvidos foi avaliar o peso de cada uma dessas variáveis, isto é, o quanto cada uma delas contribui nas diferenças moleculares exibidas por pacientes HPV- e HPV+, e também se essas variáveis interagem entre si ou atuam de forma individual. As três variáveis independentes foram inicialmente testadas em um modelo simples e os resultados podem ser observados na Tabela 2. Para as três variáveis analisadas, é possível observar uma associação entre o *status* viral e cada uma delas individualmente. Portanto, o *status* viral positivo se mostrou associado com a expressão de genes associados a uma resposta imune adaptativa e inflamatória crônica (caracterizado pelo *cluster* 1) (Modelo 1 da Tabela 2), com a infiltração de linfócitos T CD8 no infiltrado tumoral (Modelo 2 da Tabela 2) e com a presença da Assinatura Mutacional 2 (atribuída a atividade das APOBEC3s) (Modelo 3 da Tabela 2). A partir disso, análises múltiplas que combinavam essas diferentes variáveis foram testadas e foi possível observar que a variável categórica “*cluster* de pertencimento” foi

independente da infiltração de linfócitos T CD8 e da Assinatura Mutacional 2, além de conseguir prever os *status* de HPV (Modelos 4, 5 e 7 da Tabela 2). Portanto, nesse modelo, o tipo de assinatura gênica apresentado pelos pacientes (perfil de inflamação aguda vs perfil de inflamação crônica) foi a variável mais importante para a categorização do *status* de HPV dos pacientes. Os modelos múltiplos também mostraram que um *status* viral positivo leva a uma maior infiltração de linfócitos T CD8 que não parece ser dependente da Assinatura Mutacional 2 (Modelo 6 da Tabela 2).

Tabela 2 – Regressão logística simples e múltipla das variáveis selecionadas.

Modelos	Variáveis		
	Assinatura gênica OR (CI 95%)	Infiltrado CD8 (CIBERSORT) OR (CI 95%)	Assinatura Mutacional 2 (deconstructSigs) OR (CI 95%)
Modelo 1	16,50 (4,16 – 65,48)	-	-
Modelo 2	-	3,94 (1,63 – 9,51)	-
Modelo 3	-	-	1,83 (1,02 – 3,29)
Modelo 4	15,35 (3,68 – 64,04)	-	1,85 (0,85 – 4,01)
Modelo 5	8,06 (1,51 – 42,93)	1,88 (0,68 – 5,19)	-
Modelo 6	-	3,38 (1,43 – 7,99)	1,56 (0,82 – 2,97)
Modelo 7	8,85 (1,50 – 52,16)	1,58 (0,57 – 4,36)	1,70 (0,78 – 3,69)

OR, (*Odds Ratio*) Razão de chances; CI, (*Confidence Interval*) Intervalo de confiança.

Em síntese, os principais achados desse trabalho são resumidos na figura a seguir (Figura 24) em que os pacientes de carcinoma orofaríngeo de células escamosas foram caracterizados por marcantes padrões de assinaturas de expressão gênica em que os pacientes HPV- foram consideravelmente bem definidos por uma resposta imune de padrão inato e inflamatório agudo e os pacientes HPV+ foram consideravelmente bem definidos por uma resposta imune de padrão adaptativo e inflamatório crônico além de estarem mais expostos a uma assinatura mutacional atribuída a atividade das APOBEC3s.

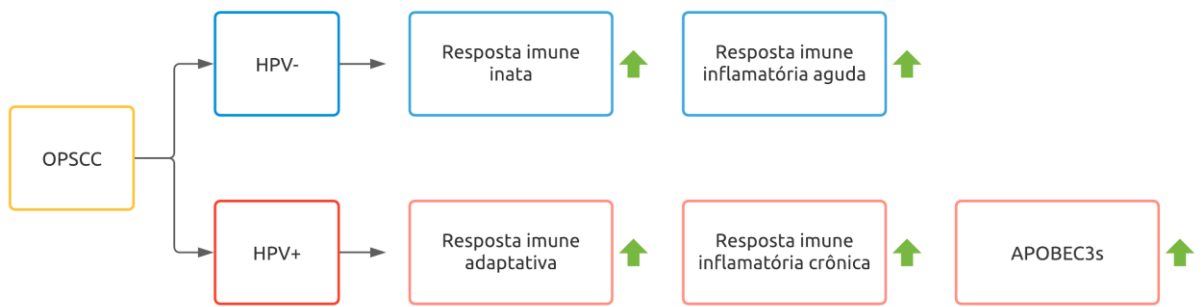


Figura 24 – Fluxograma delineando os principais achados encontrados nesse trabalho. Os pacientes de carcinoma orofaríngeo de células escamosas HPV- e HPV+ foram caracterizados por diferenças nos seus perfis moleculares imune, transcriptômico e mutacional.

5. DISCUSSÃO

5.1 ALGUMAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS SE APRESENTARAM DISTINTAS ENTRE OS PACIENTES COM TUMORES HPV- E HPV+

Uma interessante vantagem ao se trabalhar apenas com amostras de carcinoma de orofaringe HPV- e HPV+ está na maior homogeneidade de nosso grupo, o que se contrasta com outros estudos com carcinoma de células escamosas em cabeça pescoço, em que quase a totalidade de amostras HPV+ encontra-se na região de orofaringe e as amostras HPV- são, em sua maioria, de outras localizações de cabeça e pescoço, sobretudo cavidade oral e laringe. Ao se observar os dados demográficos exibidos pela Tabela 1, nota-se que em ambos os grupos analisados (HPV- e HPV+) predominam os casos em estadiamento clínico avançado no qual foram considerados nesse trabalho os estádios III e IV (em que na maioria dos casos já ocorreu comprometimento linfonodal). Posto isso, um tópico relevante a ser discutido em relação aos dados clínicos das amostras disponibilizadas publicamente pelo TCGA refere-se à classificação TNM disponível das amostras estudadas. Dos 66 pacientes incluídos nesse estudo, 17 foram classificados quanto à 6ª edição e 49 pacientes foram classificados quanto à 7ª edição da Classificação TNM de Tumores Malignos. Apesar do emprego de edições diferentes na classificação dos pacientes (em que tais classificações dependem da época em que as amostras e dados clínicos foram coletados e do sistema vigente de classificação TNM), não são descritas diferenças ou mudanças notáveis na forma de classificação em grupamento por estádios de tumores localizados em oro e hipofaringe ^{17,18}.

Apesar disso, a emergência do impacto da infecção do HPV em carcinomas de cabeça e pescoço evoluiu de tal forma que na classificação mais recente (8ª edição) do TNM que foi publicada em 2017, o *status* de HPV obtido por imuno-histoquímica p16 é utilizado como critério discriminativo e os tumores em orofaringe p16- e p16+ são classificados a partir de parâmetros distintos. Esse novo sistema inclusive propõe para os tumores em orofaringe p16+, estratégias menos agressivas de tratamento ¹⁶. No entanto, essa classificação ainda não é amplamente empregada no contexto clínico. O Reino Unido possui, por exemplo, uma política de não empregar essa última edição do TNM como referência de definição de tratamento dado que mudanças em protocolos de conduta clínica devem preferencialmente ser empregados dentro de estudos clínicos controlados ¹⁸⁵. Porém é nítido observar que do ponto de vista clínico

e molecular, os tumores em orofaringe HPV+ e HPV-, por possuírem etiologia divergentes, possuem características clínicas e moleculares distintas em relação ao desenvolvimento e progressão tumoral e a determinação do *status* de HPV no contexto do carcinoma de orofaringe é valioso para uma avaliação clínica inicial do paciente.

Tais características clínicas distintas entre os tumores de orofaringe HPV- e HPV+ podem ser observadas na coorte empregada nesse trabalho, em que os pacientes HPV+ apresentaram uma faixa de idade menor do que os pacientes HPV- (Tabela 1). Essa informação clínica já estava bem consolidada na literatura ⁶², bem como o conhecimento sobre a maior probabilidade de sobrevida apresentada pelos pacientes com carcinoma de orofaringe HPV+ quando comparados aos HPV- ^{62,84}. Tal sobrevida, inclusive, independe de raça ¹⁸⁶, conduta terapêutica ¹⁸⁷ ou ocorrência de progressão tumoral ⁸⁵. O mesmo comportamento é também observado em pacientes com câncer de cabeça e pescoço HPV- e HPV+ ^{188,189} ou nos estádios mais avançados (cTNM III ou IV) da doença ¹⁹⁰.

A maior probabilidade de sobrevida global exibida pelos pacientes com tumores HPV+ também foi confirmada em nossa coorte (Figura 7) e essa observação inspirou uma sequência de perguntas com o propósito de melhor investigar as bases moleculares por trás de tais diferenças clínicas observadas em pacientes com carcinoma orofaríngeo de células escamosas associados ou não com a infecção pelo HPV.

5.2 O CARCINOMA OROFARÍNGEO HPV+ APRESENTOU INFILTRAÇÃO INFLAMATÓRIA MAIS EXTENSA E UM PADRÃO DE RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIO CRÔNICO ENQUANTO QUE O HPV- APRESENTOU UM PADRÃO DE RESPOSTA IMUNE INFLAMATÓRIO AGUDO

O HPV é um vírus de importância global responsável pelo desenvolvimento carcinogênico em diversas localizações do corpo humano, particularmente na região cervical, e que também desempenha significativo papel no desenvolvimento tumoral nas regiões anogenital e orofaringe (principalmente nas tonsilas e base de língua) ¹⁹¹, que também é a principal região anatômica em cabeça e pescoço acometida pelo carcinoma de células escamosas relacionado à infecção pelo HPV ¹⁹². Carcinomas induzidos por infecção viral são geneticamente e molecularmente distintos de carcinomas induzidos por outros fatores ¹²⁵. A infecção viral pode estimular a expressão e liberação de proteínas virais que podem influenciar

o microambiente tumoral e atuar como agentes imunogênicos ¹⁹³. Isso faz com que os tumores de orofaringe HPV+ exibam uma identidade singular quanto aos fenômenos por trás da carcinogênese.

As Figuras 21 e 22 mostraram dois *clusters* de perfis distintos, um de maioria HPV+ e não-tabagista e outro de maioria HPV- e tabagista. Pacientes com carcinoma de orofaringe HPV+ tendem a ter menos hábitos tabagistas. Cerca de aproximadamente 30% das coortes de carcinoma de orofaringe HPV+ são formadas por pessoas não-tabagistas, enquanto que menos de 5% dos indivíduos HPV- são formados por não-tabagistas ¹⁹⁴. Tais diferenças nos hábitos tabagistas não anulam, entretanto, os efeitos nocivos associados ao uso de tabaco e a exposição ao tabaco é associado ao maior risco de progressão tumoral e morte, independentemente do *status* viral e conduta terapêutica aplicada ¹⁹⁵.

O perfil de expressão dos genes normalizados em FPKM dos tumores de orofaringe HPV+ (Figuras 8A e 9A) mostra um perfil mais inflamatório e citotóxico, com a expressão aumentada de perforina, granzimas, interferon gama, IL-2, IL-12 (que estimula a atividade lítica de linfócitos T e células NK além de estimular a produção de IFN- γ), além dos genes da família de fatores de transcrição NF- κ B (*NFKB1*, *NFKB2* e *RELB*), envolvida na regulação da resposta imune contra agentes infecciosos e ativada em resposta a presença de material genético ou proteínas virais ^{196,197}. Vários desses marcadores inflamatórios e citotóxicos também se encontram diferencialmente expressos e aumentados nas amostras HPV+ (como mostrado na Figura 20 e no Apêndice 2). Estudos anteriores em tumores de cabeça e pescoço HPV+ também verificaram uma abundância de linfócitos T CD8⁺ nas amostras com *status* viral positivo, além da expressão aumentada de perforina e granzimas A e B, o que demonstra uma alta atividade citotóxica nesse grupo ¹²¹.

A família do NF- κ B é um termo coletivo para designar uma família de fatores de transcrição formada por cinco membros divididos em duas classes: uma classe que inclui os membros RelA, RelB e c-Rel e que são caracterizados por terem dois domínios (um domínio de ligação ao DNA e um domínio de ativação que facilita a transcrição) e uma outra classe que inclui os membros NF- κ B1 e NF- κ B2 e que são caracterizados por terem um único domínio de ligação ao DNA (e portanto, eles não possuem o domínio de modulação de transcrição). Os membros dessa família de fatores de transcrição NF- κ B podem ser encontrados em uma variedade de homodímeros ou heterodímeros como por exemplo, o heterodímero RelA e NF- κ B1 ¹⁹⁸, ou c-Rel e NF- κ B1 ¹⁹⁹ ou RelB e NF- κ B2 ²⁰⁰. Não coincidentemente é observado que apenas os marcadores RelB e NF- κ B2 se apresentaram diferencialmente expressos e aumentados nas amostras HPV+ como mostrado nas Figuras 9A, 20, 21 e no Apêndice 2.

Possivelmente o heterodímero formado pelos membros RelB e NF- κ B2 está atuando ativamente na regulação da resposta imune antiviral nos pacientes HPV+.

Interessantemente, nos tumores HPV+, também foi demonstrada a partir dos valores normalizados em FPKM dos genes imunes demonstrados na Figura 8B e pela análise diferencial de genes na Figura 20 e no Apêndice 2, uma alta expressão de marcadores de supressão e exaustão como o *CTLA-4*, *PD-1* (proteína de morte celular programada 1 ou *Programmed cell death protein-1*, codificado pelo gene *PDC1*) e o receptor Tim-3 (codificado pelo gene *HAVCR*), por exemplo. Corroborando essa observação, tem-se demonstrado na clínica que tumores de cabeça e pescoço HPV+ respondem melhor às estratégias que propõem a inibição dos marcadores de *checkpoints* imunes do que pacientes HPV- e que pacientes HPV+ potencialmente se beneficiariam mais do uso dessas terapias^{201,202}. Além disso, em tumores de cabeça e pescoço HPV+, uma alta expressão do receptor CTLA-4 (que aparenta se correlacionar com a expressão de Tregs) também foi observada¹²⁵.

Por outro lado, o perfil transcriptômico apresentado pelos pacientes com tumores HPV- foi bem distinto dos pacientes HPV+. O perfil de expressão dos genes normalizados em FPKM como mostrado nas Figuras 8A e 9B e pela análise diferencial de genes na Figura 20 e no Apêndice 2, mostra um perfil mais típico de resposta imune inata caracterizada pelo aumento da expressão dos marcadores *IL8*, *IL1B*, *IL1A* e *TGFBI*. A citocina pró-inflamatória *IL8* é também uma quimiocina (igualmente nomeada como *CXCL8*) muito conhecida pelo seu papel como potente quimio atrator de macrófagos²⁰³, cuja população M0 encontra-se, também, aumentada nos pacientes com tumores HPV- (Figuras 11 e 22). Inclusive algumas citocinas são descritas como importantes para promover o desenvolvimento dos chamados macrófagos associados ao tumor (TAMs ou *tumor-associated macrophages*), e alguns dos membros por trás do repertório das TAMs é formado pelos mesmos mediadores inflamatórios (*IL8*, *IL1A* e *IL1B*) e anti-inflamatórios (*TGFBI*)^{204,205}.

Juntos, os marcadores *IL8*, *IL1A* e *IL1B* são também conhecidos pela sua contribuição desempenhada durante a resposta imune inata e também na resposta imune associada aos padrões moleculares associados a danos (DAMPs ou *damage-associated molecular pattern*)^{203,206}, que são sinais de perigo liberadas em resposta a morte e ao estresse celular. As DAMPs são caracterizadas por um amplo espectro de moléculas endógenas liberadas por células mortas após um evento de dano celular (como uma quimio ou radioterapia ou até mesmo exposição aos componentes tóxicos presentes na fumaça do cigarro, por exemplo) capazes de elicitarem uma resposta imune inflamatória e que variam desde a liberação de ATP, calreticulinas, proteínas S100, proteínas do choque térmico e outros componentes que ficam retidos dentro de

células saudáveis, mas que são liberados após eventos de estresse ou morte celular. Esses componentes são capazes de ativar a resposta imune ao interagirem com receptores de reconhecimento padrão (PRR ou *pattern recognition receptors*) e dispararem uma resposta inflamatória^{207,208}.

O *heatmap* apresentado na Figura 21 foi gerado de forma não supervisionada por uma estratégia de agrupamento hierárquico e distância euclidiana. É surpreendente observar como ocorreu um agrupamento bem definido em relação aos nossos grupos estudados (HPV- e HPV+). Os três agrupamentos gênicos descritos nas sessões de resultados (Figuras 21 e 22) descrevem bem o ambiente tumoral distinto entre os grupos HPV- e HPV+. Em um *cluster*, está concentrado os tumores HPV- caracterizados por um perfil menos intenso de expressão de marcadores inflamatórios (*NFKB2*, *RELB*, *NFKB1*, *GZMA*, *GZMB* e *PFRI*), um perfil de intensa expressão de marcadores de imunidade inata e resposta a dano celular (DAMPs) (*IL8*, *IL1B*, *IL1A* e *PTGS2*) e um perfil de baixa expressão de marcadores de resposta imune adaptativa com diversos genes envolvidos na citotoxicidade e supressão como, por exemplo, os genes *NOS2* (ou o gene da óxido nítrico sintase induzível), *PDCD1*, *IFNG* e *IL10*. De forma interessante, esse mesmo grupo também é formado por muitos pacientes tabagistas e, assim como a fumaça do cigarro é capaz de induzir a liberação de DAMPs e, conseqüentemente, ativar uma resposta imune inflamatória²⁰⁹, a exposição ao tabaco pode ser um dos possíveis fatores que caracterizaram e induziram o desenvolvimento tumoral nesse *cluster* de pacientes da mesma forma que a infecção pelo HPV caracterizou e induziu o desenvolvimento tumoral no outro *cluster* de pacientes de maioria com o *status* viral positivo.

A literatura também descreve do ponto de vista epidemiológico e molecular, dois tipos de carcinoma de orofaringe: um tipo associado a infecção pelo HPV (“*viral-driven*”) e outro tipo associado a substâncias carcinogêneas (“*carcinogen-driven*”) ²¹⁰. Os tumores HPV- apresentam semelhanças com outros tipos de tumores que acometem o trato aerodigestivo, onde a exposição ao tabaco (com o efeito sinérgico promovido pelo álcool) leva ao desenvolvimento tumoral ²¹¹. O perfil molecular dos grupos HPV- e HPV+ são distintos e um dos marcadores mais clássicos que caracterizam essas diferenças está na presença de proteína p53 selvagem e altos níveis de expressão da proteína p16 entre os pacientes HPV+ e na presença de proteína p53 mutante nos pacientes HPV- (assim como também é descrito nos pacientes HPV- das outras localizações de cabeça e pescoço) ^{125,126}.

Uma observação interessante pode ser discutida em relação ao gene *PTGS2* (que apresentou um perfil de hiperexpressão no *cluster* de maioria pacientes HPV- juntamente com outros marcadores de imunidade inata e resposta a dano celular), que é o gene que codifica para

a ciclo-oxigenase-2 (COX2 ou *Cyclooxygenase 2*), que é uma enzima associada com a produção de espécies reativas de oxigênio (como o superóxido) e prostanoídes (como as prostaglandinas que atuam como mediadoras do processo inflamatório), o que pode levar a um processo de lesão tecidual devido a produção excessiva desses componentes²¹². Um estudo que buscou detalhar o perfil tumoral de pacientes de cabeça e pescoço HPV- e HPV+, também demonstrou por meio de um ensaio de PCR em tempo real quantitativa de amostras de tecido tumoral e linfonodos comprometidos, que os pacientes HPV+ exibiram significativos menores níveis de expressão da COX-2, quando comparados aos pacientes HPV-²¹³.

Em geral, os tumores em cabeça e pescoço são descritos como imunologicamente ativos e com abundante infiltrado inflamatório¹²¹. Nesse estudo, nós empregamos os *softwares* de deconvolução CIBERSORT¹⁷⁵ e MCP-counter¹⁷⁶ para descrever a infiltração de diversos tipos celulares imunes e seus estados funcionais. Tais abordagens computacionais permitem a determinação da composição celular tumoral a partir de dados de *RNAseq* e no caso de estudos oncológicos, tem sido também uma ferramenta extremamente valiosa na caracterização tecidual imune dos tecidos tumorais. De uma forma geral, esses *softwares* empregam estratégias em que inicialmente matrizes de assinaturas gênicas dos tipos celulares são construídas a partir de *datasets* estabelecidos e posteriormente o *software* faz a deconvolução celular na amostra estudada. O *software* CIBERSORT é, por exemplo, uma plataforma de deconvolução baseada em *Machine Learning* que promove a deconvolução de dados a partir de uma implementação robusta que emprega uma matriz de assinaturas gênicas de 22 tipos de células imunes obtidas por uma análise de expressão diferencial gênica^{175,214}. Já o *software* MCP-counter emprega um método de deconvolução que permite a quantificação da abundância absoluta de 8 populações imunes e 2 populações estromais baseado em um robusto conjunto de genes marcadores dessas populações celulares^{176,215}.

Uma outra abordagem que também utiliza dados de *RNAseq* é explorada pelo *software* ESTIMATE¹⁷⁴, que inclusive integra alguns dos *pipelines* padronizados usados pelo TCGA para fornecer informações dos *scores* imune, estromal e de pureza tumoral²¹⁴. Essa abordagem emprega uma estratégia de enriquecimento de conjunto de genes de amostra única ou ssGSEA para a inferência da pureza tumoral e de componentes não tumorais (tais como as células imunes e estromais). Uma diferença interessante a ser observada entre as abordagens empregadas pelos *softwares* CIBERSORT e ESTIMATE é que enquanto o primeiro se utiliza de uma abordagem de *Machine Learning* que permite estimar, no infiltrado tumoral, a proporção absoluta do infiltrado imune, o segundo emprega uma abordagem de enriquecimento como o ssGSEA que permite a inferência da proporção relativa das populações celulares no tecido tumoral (ou o

enriquecimento de uma célula ou grupo de células em uma determinada amostra). Apesar de suas diferenças, tanto a abordagem por deconvolução, quanto a abordagem por enriquecimento consistem em uma mesma premissa estratégica básica: a definição de genes marcadores enriquecidos em uma determinada população celular (ou uma assinatura gênica) ^{174,175,216}.

A acurácia do algoritmo do CIBERSORT, foi comprovada pelos próprios desenvolvedores com dados de *microarray* de amostras de sangue e de biópsia de linfonodos ¹⁷⁵ e também de *datasets* de trinta e nove tipos diferentes de tumores sólidos e hematológicos. Sua robustez contra ruídos e outros conteúdos desconhecidos foi demonstrada em testes com amostras misturadas de quatro diferentes tipos de tumor ²¹⁷. O *software* MCP-counter também já foi empregado com sucesso em outros estudos, como na estimacão de infiltrado imune e estromal de mais de 19.000 amostras de 32 tipos de tumores sólidos ¹⁷⁶. Já o *software* ESTIMATE se demonstrou útil como uma das ferramentas empregadas na distinção dos quatro subtipos moleculares conhecidos em câncer colorretal (que apresentam características de instabilidade de microssatélites imunes, hipermutação, instabilidade de microssatélites e forte ativação imunológica) a partir da caracterização imune fornecida pelo *software* ²¹⁸.

Em nossos dados, como mostrados na Figuras 11 e 12, foi demonstrado que os tumores HPV+ são enriquecidos em diversos tipos celulares, especialmente nas populações de células adaptativas e citotóxicas. Possivelmente nesse grupo o ambiente tumoral encontrava-se mais inflamado, o que estimularia também o aumento de células Treg observado nos pacientes HPV+ de nossa coorte como estratégia de balancear a atuação de diversas células inflamatórias. Interessantemente, algumas populações de células da imunidade inata (macrófagos M1 e M2, células dendríticas em repouso ou ativadas, mastócitos em repouso, entre outros por exemplo) não apresentaram diferenças no infiltrado inflamatório entre os grupos analisados. Possivelmente isso ocorre uma vez que essas células não passam pelo processo de expansão clonal como as células da imunidade adaptativa. A ação efetiva de tais células pode depender mais do seu estado de ativação do que de seu número absoluto no microambiente tumoral.

De forma similar aos nossos resultados, outros tumores associados à infecção viral exibiram aumento de infiltração de populações citolíticas em comparação com os mesmos tipos de tumores não associados à vírus, como demonstrado em um estudo que compara o microambiente tumoral imune de seis tipos de câncer associados a vírus (entre eles, cabeça e pescoço, câncer cervical, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma de estômago e carcinoma de esôfago) ¹⁹³. Outros estudos que trabalharam especificamente com tumores de cabeça e pescoço, também demonstraram que as amostras HPV+ apresentaram infiltrado inflamatório rico em populações de células T e B ^{118,213,219} quando comparados com as amostras HPV-. Além

disso, diversos estudos tem demonstrado uma maior infiltração imune em tumores de orofaringe HPV+ em comparação com as suas contrapartes HPV-, associando, inclusive, esse maior infiltrado com o melhor prognóstico observado entre os pacientes HPV+^{117,220,221}.

De forma interessante, as comparações dos *scores* gerados pelo *software ESTIMATE* (Figura 10) mostraram que, se por um lado os tumores HPV+ possuíam *score* imune significativamente superior aos tumores HPV-, eles também possuíam *score* estromal significativamente menor que os tumores HPV-, de forma que a pureza tumoral não resultou em diferenças entre os grupos (dado ao equilíbrio dos *scores* imunes e estromais entre os grupos, a presença de células tumorais continua semelhante entre os grupos). Inclusive, o valor mais elevado do *score* estromal entre os pacientes com tumores HPV- (Figura 10), concorda com os *scores* mais elevados de fibroblastos observados nos pacientes HPV- a partir da estimativa da abundância de populações pelo *software* MCP-counter (Figura 12). Um estudo recente demonstrou que em um modelo *in vitro* de carcinoma de orofaringe, diferenças entre os fibroblastos estromais e as células tumorais de amostras HPV- e HPV+ foram observadas e que as células tumorais HPV- eram capazes de induzir os fibroblastos (para o favorecimento da invasão tumoral) a partir da liberação do fator de crescimento de hepatócito e da citocina IL-6, que inclusive encontra-se aumentada e diferencialmente expressa em nossa coorte analisada (Figura 8A, 20 e Apêndice 2)²²².

Assim como foi feito com os genes imunes, *heatmaps* gerados de forma não supervisionada por uma estratégia de agrupamento hierárquico e distância euclidiana foram plotados (Figura 22) para as abundâncias dos componentes do infiltrado imune e estromal estimados pelos *softwares* CIBERSORT e MPC-counter. A visualização dos perfis de infiltrado em cada grupo (cujo agrupamento ocorreu de forma bem-sucedida) mostrou uma maior abundância de macrófagos M0 e fibroblastos em pacientes com tumores HPV- e uma maior abundância de infiltrado linfocitário T CD8 em pacientes com tumores HPV+.

Ao se interligar os dados gerados do perfil gênico imunológico com os dados de abundância de infiltração inflamatória, é possível observar que apesar da infiltração de diversas populações citotóxicas no ambiente tumoral dos pacientes com tumores HPV+, foi observado uma alta expressão de diversos marcadores de exaustão (Figuras 8B, 20, 21 e Apêndice 2), o aumento na abundância de Tregs (Figura 11), bem como a expressão diferenciada e aumentada de *FOXP3* em tumores HPV+ (Figura 8B, 20 e Apêndice 2). Portanto, é possível concluir que apesar da presença de células tipicamente inflamatórias em tumores com o *status* viral positivo, elas também se encontravam em um estado de exaustão celular. Pode-se discutir aqui que, possivelmente, a massiva e constante presença dos antígenos virais promoveu uma indução

crônica da resposta inflamatória no microambiente tumoral HPV+ (como vem sendo demonstrado pelas Figuras 8, 9, 11, 12, 20, 21 e Apêndice 2) de forma que, a partir dos processos de regulação da resposta imune, mecanismos regulatórios passaram a operar como forma de balancear a resposta imune inflamatória exacerbada (cujo excesso poderia resultar na própria destruição dos tecidos).

Diversos estudos anteriores também se dedicaram na compreensão da extensão da influência dos antígenos virais dentro do contexto da imunologia do câncer. Muitas das caracterizações de proteínas virais executadas, comprovaram a indução de uma resposta imune forte em reação a presença desses antígenos virais em ambientes tumorais^{193,223}, inclusive com muitos estudos dedicados especificamente para entender a contribuição dos antígenos de HPV (particularmente do subtipo HPV16) na resposta imune dentro do contexto imuno-oncológico^{224,225}. Além disso, deve-se considerar que a aquisição do sequenciamento de *RNAseq* das amostras do TCGA (incluídas nesse estudo) ocorreu depois de já estabelecido o tumor nos pacientes e, portanto, os mecanismos regulatórios da resposta inflamatória já estão em plena operação em tais ambientes tumorais. Em vista disso, uma maior infiltração de linfócitos T exaustos nos pacientes HPV+ abre as portas para oportunidades terapêuticas altamente benéficas para esse grupo. Cabe aqui novamente ressaltar a possibilidade de um melhor benefício à imunoterapia por parte daqueles pacientes com o *status* viral positivo, como também já foi demonstrado em carcinoma de cabeça e pescoço de células escamosas na literatura^{226,227}, bem como em testes clínicos^{201,202}.

Os dados mostrados pelas Figuras 8, 9, 11, 12, 20, 21, 22 e Apêndice 2 mostraram um perfil celular mais inflamatório crônico em pacientes HPV+ e um perfil de infiltração inata e de fibroblastos nos pacientes HPV- (informação também mostrada pelo *score* estromal gerado pelo *software* ESTIMATE na Figura 10). Os elementos não imunes, tais como as células estromais, tem ganhado bastante relevância na pesquisa em câncer, dado a sua influência no microambiente tumoral. A sinalização desregulada da hipóxia pode resultar no desenvolvimento de diversas doenças, inclusive o câncer²²⁸. Os principais reguladores da resposta à hipóxia são os fatores de transcrição induzido por hipóxia (HIF ou *hypoxia-inducible transcription factors*)²²⁹. A via de sinalização conduzida pelo HIF-1 α é capaz de influenciar tanto as células tumorais, quanto as estromais e a expressão desse marcador se correlacionou com o aumento das assinaturas imunes e estromais em dez coortes diferentes dos projetos disponibilizados pelo TCGA²³⁰.

5.3 FOI OBSERVADO DIFERENÇAS NO PANORAMA MUTACIONAL APRESENTADO EM TUMORES HPV- E HPV+

O uso de organismos modelos como bactérias (*Escherichia coli*), leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), nematódeos (*Caenorhabditis elegans*) e insetos (*Drosophila melanogaster*) são também empregados em estudos genéticos de forma a compreender melhor os mecanismos mutacionais moleculares e identificar os padrões presentes ²³¹. Um exemplo disso é que em estudos anteriores já foi descrito um perfil mutacional associado à deficiência em reparo de DNA por pareamento incorreto (MMR ou *DNA mismatch repair*) em algumas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ^{232,233} e também já foi detectado deficiência em MMR em *Escherichia coli* ²³⁴. Um padrão de assinatura mutacional semelhante a padrões mais tarde observados em amostras humanas (atribuído a ação das AID/APOBECs), foi inclusive descrito ao se expressar heterologicamente uma citidina deaminase de lampreia em leveduras ²³⁵.

Mas o emprego de técnicas mais avançadas de sequenciamento proporcionou que o genoma humano tumoral fosse explorado mais profundamente e o contexto, o tipo e a frequência de mutações fossem investigados de forma a caracterizar padrões de assinaturas mutacionais que refletem o processo mutacional em andamento nos tumores ²³¹. O acúmulo de mutações somáticas em um genoma pode ser o resultado de diferentes processos mutacionais que deixam a sua singular marca molecular no genoma celular. Segundo o próprio COSMIC ²³⁶, a interpretação de assinatura mutacional é de tal forma que:

As mutações somáticas estão presentes em todas as células do corpo humano e ocorrem ao longo da vida. Eles são a consequência de múltiplos processos mutacionais, incluindo a ligeira infidelidade intrínseca da maquinaria de replicação do DNA, exposições a agentes mutagênicos exógenos ou endógenos, modificação enzimática do DNA e reparo defeituoso do DNA. Diferentes processos mutacionais geram combinações únicas de tipos de mutação, denominadas 'Assinaturas Mutacionais'.

O desenvolvimento de diferentes métodos computacionais permitiu a investigação de assinaturas mutacionais presentes em dados de *pan-cancer* ^{134,237} ou até mesmo de tipos de câncer específicos como câncer de mama, por exemplo ¹⁶⁰, que possibilitam uma melhor compreensão do panorama molecular tumoral.

Nesse estudo, nós empregamos cinco ferramentas computacionais diferentes que extraem as assinaturas mutacionais por uma abordagem *de novo* (de forma a identificar quais assinaturas mutacionais estão presentes em nossas amostras e que depois podem ser comparadas a partir das similaridades dos cossenos com as assinaturas de referência descritas pelo catálogo COSMIC (v2)), ou por uma abordagem de *fitting* (de forma a identificar padrões de assinaturas já descritos e depositados em banco de dados). Ambas as abordagens foram executadas a partir de dados SNVs disponíveis pelo projeto TCGA-MC3. Tais métodos computacionais possuem alguns princípios em comum por trás do seu modelo matemático proposto. O catálogo mutacional provém da combinação/sobreposição dos processos mutacionais acumulados durante toda a vida, mas que podem ser separados em processos mutacionais (Assinaturas Mutacionais) mais simples que contribuíram com pesos diferentes para essa sobreposição. Quanto maior for a contribuição de uma assinatura mutacional específica, maior é o peso que ela possui na sobreposição total. Porém as abordagens empregadas por esses *softwares* podem ocorrer de duas maneiras: pela detecção (“*refitting*”) das já conhecidas e validadas assinaturas mutacionais disponíveis pelo COSMIC (abordagem também denominado como *fitting*) ou pela elaboração de novas assinaturas *de novo* (“extração de assinaturas”) ²³⁸. Nós empregamos inicialmente uma abordagem *de novo* (com os *softwares* *signeR* ¹⁷⁷, *MutationalPatterns* ¹⁷⁸, *SomaticSignatures* ¹⁷⁹ e *sigProfiler* ¹⁸⁰) com o objetivo de identificar as possíveis assinaturas mutacionais presentes em nossa coorte e, posteriormente, nós empregamos também uma abordagem *fitting* (com, por exemplo, o *software* *deconstructSigs* ¹⁸¹) para validar os padrões extraídos pela abordagem *de novo*. A maior parte dos *softwares de novo* empregados aqui aplicam algoritmos de decomposição como a fatoração de matriz não negativa (NMF ou *Non-negative Matrix Factorization*), técnica não supervisionada que foi inclusive a estratégia utilizada no primeiro método computacional de análise mutacional ^{237,239}. Tal estratégia já foi empregada em diversos estudos e se mostrou uma ferramenta poderosa de extração de assinaturas mutacionais ^{239–241}. Já o *software* de *fitting* *deconstructSigs* foi desenvolvido com o propósito exclusivo de detecção de assinaturas mutacionais pela abordagem *fitting*. Para estimar a melhor combinação linear das assinaturas e que também melhor recria o perfil mutacional do genoma estudado, o *software* emprega uma estratégia de regressão linear múltipla iterativa que minimiza a distância entre a combinação linear das assinaturas e o catálogo de referência (como o COSMIC por exemplo) ^{181,238}. O uso de ambas as abordagens permite, por meio de diferentes estratégias, elaborar aquele que é o melhor modelo de perfil mutacional da amostra estudada.

Especificamente em nossas amostras, foram identificadas de uma forma geral pelos cinco métodos utilizados, as Assinaturas 1, 2, 6 e 13 (por substituição de base única) (Figuras 13-18) e os pacientes HPV+ apresentaram maior atividade das Assinaturas Mutacionais 1 e 2 (Figura 18). Enquanto as Assinaturas 1 e 6 estão relacionadas ao processo de envelhecimento celular (“*clock-like*” a partir da deaminação espontânea da 5-metilcitosina) e à defeitos em MMR, respectivamente, as Assinaturas 2 e 13 estão atribuídas a atividade da família de citidinas deaminases AID/APOBEC^{134,237}. Especula-se que a atividade aberrante das enzimas APOBEC3A e APOBEC3B seja especialmente responsável por esse padrão de mutações descrito^{141,242}. A Assinatura Mutacional 2 é definida principalmente por alterações C>T dentro do contexto (trinucleotídeos) TCW (onde W = A ou T) e já foi identificada em diversos tipos de tumores como em cabeça e pescoço, cérvix e bexiga^{134,162,163}.

Apesar de compartilharem a mesma etiologia, as Assinaturas 2 e 13 apresentam padrões distintos de assinatura mutacional. As Assinaturas 2 e 13 são principalmente caracterizadas pelas transições C>T e transversões C>A ou C>G, respectivamente^{134,243}. O padrão de substituição C>T observado na Assinatura 2 ocorre principalmente por mutação direta e fixação durante o processo de replicação¹³⁸, enquanto que os padrões de substituição C>A ou C>G observados na Assinatura 13 ocorrem após tentativas de reparo da uracila (formada após a deaminação da citosina) que é então excisada pela enzima uracil DNA glicosilase (UNG ou *Uracil-DNA Glycosylase*) como parte da via de reparo por excisão de base (BER ou *Base Excision Repair*) e um sítio abásico é, então, criado²⁴⁴. A inserção de uma citosina na frente do sítio abásico por polimerases de síntese translesão (TLS ou *Translesion DNA Synthesis*) como a REV1 pode levar, por exemplo, a uma transversão C>G^{245,246}. Tais polimerases que são utilizadas durante o reparo de DNA (como é o caso da polimerase REV1) exibem baixa fidelidade de replicação e uma maior taxa de erro ao inserir nucleotídeos e isso ocorre devido ao fato de que, ao contrário das DNA polimerases empregadas durante a replicação do DNA, essas polimerases de síntese translesão não possuem uma subunidade de correção e, portanto, não conseguem identificar nucleotídeos inseridos incorretamente²⁴⁷. A síntese translesão é uma via de replicação de DNA sujeita a erros que é necessária para superar o bloqueio da replicação por danos ao DNA, porém a ativação aberrante de tal via é também sugerida como relevante para o processo de tumorigênese promovido por alterações genéticas²⁴⁸.

De uma forma geral, a infecção viral pelo HPV também induz mudanças consideráveis nas células hospedeiras, porém os mecanismos mutacionais mediados por HPV não são ainda completamente conhecidos. Os genes *E6* e *E7* de HPV são descritos como os mais carcinogênicos e virulentos desse vírus⁵³ e podem interferir em vias de genes supressores de

tumor (como a do Rb ²⁴⁹) e também induzir a instabilidade gênica ²⁵⁰ e conseqüentemente, induzir rearranjos cromossômicos e variações em número de cópias. Em estudos anteriores de caracterização gênica em tumores de cabeça e pescoço, os pacientes HPV- apresentaram principalmente alterações em *TP53* e os pacientes HPV+ apresentaram alterações em *PIK3CA*, que apresentou (juntamente com o gene *RBI*) alterações de amplificação em número de cópias ^{125,126}. Em amostras de câncer cervical (caracterizadas pela alta incidência de HPV ²⁵¹), os genes da via PI3K são os mais comumente alterados. As alterações no oncogene *PIK3CA* (que contém a sequência da subunidade catalítica da quinase PI3K) são associadas a proliferação celular descontrolada, comportamento invasivo e metastático ²⁵². Em um estudo com amostras de câncer invasivo e lesões neoplásicas cervical intraepitelial demonstrou alterações em número de cópias (amplificação da região 3q) justamente na região que contém o gene da *PIK3CA* ^{253,254}.

5.4 A FAMÍLIA DE CITIDINAS DEAMINASES APOBEC3 EXIBIU NÍVEIS DE EXPRESSÃO E COMPORTAMENTO DISTINTOS ENTRE OS PACIENTES HPV- E HPV+

Existem descritos os mais diversos mecanismos de mutagênese em câncer, desde aqueles gerados por fatores exógenos como a radiação UV ou pela exposição ao tabaco, a até aqueles pela desregulação da família de citidinas deaminases AID/APOBECs, cuja atividade aberrante contribui consideravelmente como fonte endógena de mutagênese e que mais tarde pode levar ao desenvolvimento tumoral. Por muito tempo, se acreditou que o papel desempenhado pela família 3 das APOBECs, especialmente as APOBEC3A e APOBEC3B, estava associado a uma atuação como fator de restrição, cujo papel se reduzia a somente inibir a replicação viral e de retroelementos endógenos ^{255,256}. Havia sido, inclusive, demonstrado que a APOBEC3A era expressa em altos níveis nos tecidos de mucosa (quando comparados os níveis de expressão em pele cutânea), local bastante susceptível a entrada de organismos e partículas estranhas, tais como os vírus, ²⁵⁷. Porém hoje existem diversas evidências de mutagênese provocada pela atividade aberrante das APOBEC3s em quase metade dos todos de tumores que acometem humanos ¹⁶⁵. Os mecanismos moleculares que esclarecem as implicações imunológicas associadas a atividade da família 3 de citidinas deaminases APOBECs ainda não estão completamente elucidados, particularmente nos casos daqueles tumores associados a infecções virais.

O cluster gênico das APOBEC3s é formado por sete genes (nomeados como *APOBEC3A*, *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *APOBEC3D*, *APOBEC3F*, *APOBEC3G* e *APOBEC3H*) dispostos em *tandem* no cromossomo 22¹⁵⁹. Dessa forma, não é de se espantar que um aumento dos níveis de expressão em uma delas, pode resultar igualmente no aumento da expressão das outras APOBEC3s como é observado pela Figura 19 em que, com a exceção da *APOBEC3A*, as demais tendem a estar aumentadas nos pacientes HPV+. A análise conduzida pelo *software* DESeq2 também demonstrou que, com a exceção da *APOBEC3A*, todas as outras se apresentaram diferencialmente expressas e aumentadas nos pacientes HPV+ (Figura 20 e Apêndice 2). Mais recentemente, foi também identificado a *APOBEC3A_B* (gene da *APOBEC3A* com a 3'-UTR do gene *APOBEC3B*) que é uma variante resultante de uma variação em número de cópias a partir da deleção entre o éxon 5 da *APOBEC3A* e o éxon 8 da *APOBEC3B*, que resulta em um gene fusionado que foi descrito, por enquanto, como responsável pelo aumento do risco do desenvolvimento de câncer de mama²⁵⁸, câncer de ovário²⁵⁹ e também no aumento da taxa mutacional em câncer de mama²⁶⁰.

Como comentado previamente, o gene *PIK3CA* aparece como o mais alterado em amostras HPV+. As alterações concentram-se em dois *hotspots* no domínio helical (E542K e E545K) de sua subunidade catalítica (p110 α)¹⁴⁴, em que especula-se, serem responsáveis pelo bloqueio da inibição da PI3K que pode promover, então, a proliferação celular via aumento dos níveis de PIP₃ (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato ou *phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate*) e consequentemente PDK1 (proteína quinase-1 dependente de fosfoinositídeo ou *phosphoinositide-dependent kinase-1*)²⁶¹. De forma interessante, padrões de assinatura de APOBEC3s foram encontradas no gene *PIK3CA* e a atividade das APOBEC3s estava associada com as mutações em *PIK3CA* em amostras HPV+ de carcinoma de cabeça e pescoço^{144,262}. Tais dados sugerem que a infecção pelo HPV induz a atividade das APOBEC3s, que resulta em danos no genoma do hospedeiro. Um estudo inclusive mostrou que o gene viral *E6* de HPV é capaz de hiper-regular a transcrição de *APOBEC3B*²⁶³, e que as *APOBEC3A* e *APOBEC3B* (que atuam também como fatores de restrição) são super expressas após a infecção por HPV e ativação dos genes *E6* e *E7* virais²⁶⁴. Esses dados sugerem que a expressão dos genes virais *E6* e *E7*, no contexto da infecção persistente pelo HPV, desencadeiam a ação mutagênica mediada pelas *APOBEC3A* e *APOBEC3B*, o que salienta a importância da atividade das APOBEC3s no desenvolvimento tumoral inicializado por uma infecção viral.

Um estudo demonstrou que as duas fitas do genoma viral do HPV estão susceptíveis a edição promovida pelas APOBEC3s. Em experimentos *in vitro* com amostras de biópsias de lesões pré-cancerosas cervicais e verrugas plantares, o DNA do HPV foi hipereditado pela ação

das APOBEC3A, APOBEC3C e APOBEC3H, ainda que evidências de atividade de deaminação de citosinas por parte das APOBEC3B não fossem observadas. Essas investigações sugerem que essas enzimas estejam envolvidas na edição *in vivo* do genoma do HPV em mecanismos preliminares do desenvolvimento tumoral ²⁶⁵. Entre os carcinomas que atingem a região de cabeça e pescoço, a atividade mutagênica de APOBEC3 é identificada principalmente naqueles pacientes com o *status* viral positivo para o HPV ¹⁴⁴, em que cerca de 98% dos tumores de cabeça e pescoço HPV+ apresentaram atividade mutacional atribuída a atividade de AID/APOBEC, enquanto que para apenas 76% dos pacientes de cabeça e pescoço HPV- o mesmo foi observado ²⁶⁶. As APOBEC3s inclusive desempenham importante papel no remodelamento do panorama mutacional dos carcinomas de cabeça e pescoço HPV+ como foi demonstrado por um estudo em que uma correlação positiva entre o “*APOBEC enrichment score*” (o *score* que caracteriza e quantifica a mutagênese induzida pela atividade de APOBEC) e a taxa mutacional global nesses pacientes foi evidenciada ²⁶⁷.

Ao se avaliar o papel desempenhado pelos membros da família 3 de citidinas deaminases APOBECs, foi observado que os níveis de expressão de diversas APOBEC3s se mostraram aumentados em carcinomas HPV+ quando comparados aos tecidos normais ^{263,268}. Contudo, apesar de que a maioria das APOBEC3s se mostra expressivamente aumentada nos pacientes HPV+, apenas os marcadores APOBEC3A e APOBEC3B são, pelo menos atualmente, descritas como as principais responsáveis pela geração de mutações somáticas em diversos tipos de tumores ¹⁴¹. Ambas as APOBEC3A e APOBEC3B se mostraram relevantes (na contribuição da taxa de mutações) para o processo de mutagênese em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Porém a contribuição da APOBEC3A parece ser ainda maior que o da APOBEC3B uma vez que, apesar dos níveis de RNAm da APOBEC3B serem mais abundantes do que os níveis da APOBEC3A em diversos tumores, a APOBEC3A se mostra mais potente em induzir danos do DNA ^{141,267}. De fato, sugere-se que um dos motivos para essa grande contribuição na mutagênese por parte da APOBEC3A reside no fato de que ela é extremamente eficiente em gerar quebras na fita de DNA que posteriormente, serão reparadas pelos mecanismos de reparo de DNA, o que acaba expondo o DNA em fita simples ¹⁶⁸. O mesmo se observa para o câncer cervical, onde o gene da *APOBEC3A* se mostra muito envolvido na indução de mutações ¹⁴¹, o que também é verificado em carcinomas associados com a infecção pelo HPV ¹⁴⁴. Essa é uma informação muito interessante que evidencia como a APOBEC3A aparenta estar associada com uma restrição anti-HPV. Por outro lado, o padrão apresentado em câncer de mama é diferente e a APOBEC3B aparenta ser a principal responsável por trás da assinatura mutacional de APOBEC exibida por esse tipo de tumor ¹⁶¹.

Em nossa coorte, assim como foi feito para os genes imunes e infiltrados inflamatórios, *heatmaps* gerados de forma não supervisionada por uma estratégia de agrupamento hierárquico e distância euclidiana foram plotados (Figura 22) para os membros da família das APOBEC3s. O agrupamento (semelhantemente como visualizado nos outros *heatmaps* apresentados anteriormente) segregou de forma satisfatória e dois *clusters* foram visualizados, um superior de maioria HPV+ e um inferior de maioria HPV-. Observa-se que para a maioria dos sete membros das APOBEC3s, padrões distintos de perfil de expressão são visualizados entre os grupos. Confirmando a informação fornecida pelas análises anteriores (Figuras 19, 20 e Apêndice 2) de que esses marcadores estão hiperexpressos nos pacientes HPV+, os *heatmaps* apresentados na Figura 22 fornecem uma abordagem mais visual para a observação desses perfis.

Apesar de que a mutagênese (até atualmente) só foi descrita como associada a atividade das APOBEC3A e APOBEC3B, a hiperexpressão das demais APOBEC3s verificadas em nossa coorte pode indicar que esses outros membros poderiam atuar como “*gene reporter*” (ou “gene repórter”) da expressão das APOBEC3A e APOBEC3B, uma vez que essa família de enzimas se encontra codificada em *tandem* em um único cromossomo, sob o comando dos mesmos elementos de regulação gênica transcricional e traducional. Além disso, é importante considerar os mecanismos de regulação pós-transcricional e pós-traducional em que, apesar da formação do RNAm de todas as APOBEC3s na mesma intensidade, elas podem ser metabolizadas transcricionalmente e traducionalmente de maneiras distintas, o que resulta em níveis distintos de expressão dessas APOBEC3s.

Ao se investigar a influência desempenhada pelas APOBEC3s no panorama imune, a expressão delas foi identificada em diversas células do sistema imune, de linfócitos T e B à monócitos e células dendríticas ²⁶⁹⁻²⁷¹, tendência que pode também ser observada na nossa coorte como mostrado pela Figura 23, em que a associação entre os níveis de expressão normalizados de diversas APOBEC3s e o *score* imune inferido pelo *software* ESTIMATE foram positivas nos dois grupos estudados. Porém, as associações entre as APOBEC3s e a pureza tumoral resultaram em correlações negativas entre elas. Apesar de que, à uma primeira vista, não pareça que as APOBEC3s exerceram qualquer função nas células tumorais, é importante discutir dois conceitos essenciais. Os níveis de expressão normalizados em FPKM e a análise diferencial de genes (Figuras 19, 20 e Apêndice 2) mostraram como está o panorama, pelo menos no momento da aquisição do sequenciamento de *RNA*, em relação aos níveis de expressão das APOBEC3s. Porém, as Assinaturas Mutacionais 2 e 13 (atribuídas a atividade de AID/APOBEC) representam muito mais a função exercida pelas APOBEC3s no tumor do que

os níveis de expressão delas. Isso leva ao segundo conceito que deve ser discutido e que em alguns estudos foi denominando como o conceito “*APOBEC was here*” ou “APOBEC esteve aqui”. Apesar de não expressas nas células tumorais no momento da aquisição do *RNAseq*, elas foram expressas em algum momento anterior a essa aquisição e a prova da sua atividade foi deixada na forma das Assinaturas Mutacionais 2 e 13 ²⁷². Não apenas os padrões de assinaturas mutacionais foram deixados no genoma tumoral na forma de uma “digital mutacional” (*mutational fingerprint*) da atividade das APOBEC3s, como também as células afetadas por essa mutagênese já passaram pelo processo de transformação neoplásica.

As mutações promovidas pelas APOBEC3s se mostraram associadas com a ativação da resposta e infiltração imune em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço ²⁷³. Algumas citocinas e vias de sinalização envolvidas com a regulação da resposta imune exibiram associações com a regulação de algumas APOBEC3s. O interferon alfa (IFN- α) foi responsável pelo aumento da expressão de APOBEC3A e APOBEC3G em macrófagos e monócitos e APOBEC3A, APOBEC3C e APOBEC3F em células dendríticas plasmocitóides ²⁷⁴. Já o interferon beta (IFN- β) e o IFN- γ foram responsáveis pelo aumento da expressão de APOBEC3G em macrófagos ²⁶⁹⁻²⁷¹. Além disso, um estudo demonstrou que os fatores de transcrição da família NF- κ B puderam se ligar em diversas regiões promotoras da *APOBEC3B* e assim, hiper-regular a expressão dela a partir de diversos estímulos (como a ativação de vias oncogênicas pelas vias PI3K, MAPK ou mTOR ou pelo tratamento com IFN- α) ^{275,276}. Os níveis de expressão de *IFNG* e alguns dos genes da família NF- κ B (*NFKB1*, *NFKB2* e *RELB*) inclusive exibiram-se diferencialmente expressos e aumentados em nossos pacientes HPV+ (como mostrado nas Figuras 9A, 20 e Apêndice 2).

Já o *score* que caracteriza e quantifica a mutagênese induzida por APOBEC (“*APOBEC enrichment score*”), se mostrou associado com a infiltração celular e a ativação da resposta imune em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, se correlacionando inclusive, com uma assinatura gênica de interferon gama ²⁷³. Atualmente, também se especula que a pressão seletiva imposta pela sinalização mediada por interferon e a atividade de APOBEC3A poderiam acelerar e favorecer a integração do DNA viral no genoma do hospedeiro. Um estudo, inclusive, observou uma forte associação entre a expressão de APOBEC3A com a integração do genoma viral do HPV em carcinoma de células escamosas de orofaringe ²⁶⁸. Isso abre as portas para uma série de perguntas que possam responder mais sobre os mecanismos moleculares por trás dessas associações, inclusive para novas investigações que avaliem o quanto as assinaturas mutacionais atribuídas a atividade de AID/APOBEC contribuem para a geração de neoantígenos e, conseqüentemente, para a ativação de resposta imune assim como

é fundamental também investigar o quanto a geração de neoantígenos virais influencia no panorama imune de tumores associados com uma infecção viral.

5.5 A ASSOCIAÇÃO ENTRE O *STATUS* VIRAL COM UM PERFIL TRANSCRIPTÔMICO INFLAMATÓRIO CRÔNICO E COM A INFILTRAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD8 ABRE UMA SÉRIE DE PERSPECTIVAS PARA ESSE TRABALHO

Os diversos resultados gerados ao longo desse estudo foram integrados em modelos de regressão logística simples e múltiplos binomiais como mostrado na Tabela 2. As variáveis independentes escolhidas para integrar esses modelos (assinatura gênica apresentada, *score* de abundância de infiltrado de linfócitos T CD8 gerado pelo *software* CIBERSORT e *score* de Assinatura Mutacional 2 gerado pelo *software* deconstructSigs) foram pautadas naquelas variáveis que geraram os resultados mais promissores em cada um dos principais tipos de análises executadas por esse trabalho. A partir dos modelos construídos, foi possível determinar qual o peso cada uma dessas variáveis independentes contribuiu para as diferenças moleculares exibidas entre pacientes com tumores HPV- e HPV+. Os resultados evidenciaram que o *status* viral positivo se mostrou associado com a expressão de genes integrantes da resposta imune adaptativa e da inflamação crônica, com a infiltração de linfócitos T CD8 no infiltrado tumoral e com a presença de uma assinatura mutacional atribuída a atividade das APOBEC3s. No entanto, a assinatura gênica apresentada por esse grupo de pacientes se mostrou independente da infiltração de linfócitos T CD8 e da Assinatura Mutacional 2. Além disso, a maior infiltração de linfócitos T CD8 observada nos pacientes com tumores HPV+ não parece ser dependente da Assinatura Mutacional 2.

Em vista disso, essa assinatura gênica imune que foi investigada nos pacientes HPV+ parece ser um processo que ocorre de forma anterior aos outros dois processos analisados (abundância de infiltração de linfócitos T CD8 e padrão de assinatura mutacional atribuído a atividade das APOBEC3s). Há ainda muito a ser investigado acerca do papel desempenhado pelas APOBEC3s e a assinatura mutacional deixada por elas no panorama imunológico dos pacientes analisados. Porém, de uma forma geral, como apresentado pela série de resultados expostos por esse trabalho, a presença do HPV se mostrou associada a uma maior resposta imune, a presença de mais APOBEC3s atuando no panorama transcricional e mutacional, de

forma que a atividade aberrante das APOBEC3s se mostrou associada a infecção pelo HPV no carcinoma de células escamosas de orofaringe.

Uma próxima pergunta interessante que se pode fazer é em relação ao quanto a atividade das APOBEC3s contribuiria para a resposta a imune. Pergunta semelhante foi, inclusive, realizada por outros estudos que hipotetizaram e posteriormente comprovaram que a assinatura mutacional atribuída a atividade aberrante das APOBEC3s é capaz de influenciar a resposta imune gerada, que seria mediada principalmente pelos neoantígenos gerados pelo processo mutagênico das APOBEC3s. Foi também observado que a assinatura mutacional atribuída às APOBEC3s estava associada com a abundância relativa da composição de linfócitos T CD8 e contribuiu significativamente com uma maior carga de neoantígenos em câncer de mama ²⁷⁷. Um outro estudo também concluiu que para o câncer de pulmão de células não pequenas, a assinatura mutacional por APOBEC3 se correlacionou significativamente com a resposta a imunoterapia, enquanto que a expressão de APOBEC3B se correlacionou positivamente com a infiltração de células T (preditas pelo *software* CIBERSORT) e a expressão de alguns marcadores de supressão tais como o *PD-L1* ²⁷⁸. Anteriormente a esses estudos, foi também demonstrado em câncer de mama e em câncer de pulmão de células não pequenas que uma alta taxa mutacional global revelou ser altamente associada com a infiltração de linfócitos infiltrantes tumorais e com a carga de neoantígenos ^{279,280}.

Nas células tumorais, a atividade mutagênica pode gerar, de forma muito eficiente, muitos neoantígenos que, diferentemente daqueles epítomos próprios que são gerados e que não são capazes de induzir uma resposta imune, os neoantígenos gerados em células tumorais com atividade mutacional operante são capazes de elicitar uma resposta imune ²⁸¹. A ativação de células T por esses neoantígenos derivados de células em processo mutacional estão se tornando cada vez mais alvo de intensos estudos devido ao seu potencial valor terapêutico em tumores com alta atividade mutacional que podem, possivelmente, usufruir das estratégias imunoterápicas disponíveis ²⁸². Dessa forma, uma alta instabilidade genômica e mutacional passou a ser vista sob um ponto de vista mais interessante, porém ainda persistem alguns questionamentos de como esses mecanismos moleculares operam no contexto tumoral.

Existem diversos mecanismos exógenos e endógenos de mutagênese e um dos mais clássicos já descritos ocorre pela atividade aberrante das APOBEC3s. Nesse sentido, muitos estudos que visam entender como a atividade mutacional promovida pela as APOBEC3s pode impactar na geração de neoantígenos e conseqüentemente no panorama imune estão se tornando cada vez mais relevantes. As APOBEC3s são também conhecidas por sua potente capacidade em gerar neoantígenos ^{273,277}, uma vez que elas alteram um nucleotídeo do triplete que forma

o códon, que será traduzido em um aminoácido distinto aos da sequência selvagem, o que por sua vez poderá gerar uma mudança por aminoácidos de classes diferentes que serão, então, reconhecidos como um elemento estranho pelo sistema imune. Apesar de que, à primeira vista, pode-se hipotetizar que a atividade mutagênica das APOBEC3s é capaz de gerar células tumorais com vantagens seletivas e adaptativas que podem garantir sua sobrevivência, capacidade de progressão ou evasão tumoral, a atividade mutacional promovida pelas APOBEC3s também pode contribuir para a geração de neoantígenos cruciais para a apresentação antigênica e conseqüentemente, deflagrar uma resposta imune antitumoral ²⁷².

A partir de dados de investigações em outras localizações tumorais (como em câncer de uretra por exemplo) sabe-se que os tumores que apresentam alta expressão da família 3 das APOBECs estão associados a uma maior taxa mutacional e, ao que tudo indica, podem também atuar nos mecanismos de regulação da expressão de alguns marcadores de *checkpoints* imunes, como é o caso do *PD-L1* ^{283,284}. Em um outro estudo de câncer de pulmão de células não pequenas, foi demonstrado que uma alta taxa mutacional e de carga neoantigênica se correlacionam com uma melhor resposta a terapias por bloqueio de *checkpoints* imunes (como é o caso de muitos métodos imunoterápicos atuais). Ao mesmo tempo, a assinatura mutacional por APOBEC3 também se associou com uma melhor resposta a imunoterapia. Além disso, a atividade mutacional por APOBEC3 se correlacionou com o aumento da abundância de linfócitos T CD8, linfócitos T CD4 de memória ativada e células NK (também preditas pelo *software* CIBERSORT). Os autores acabaram por concluir que uma alta taxa mutacional, combinada com a atividade mutagênica promovida pelas APOBEC3s poderiam prever possíveis bons respondedores a imunoterapia em câncer de pulmão de células não pequenas ²⁸⁵.

Em um estudo recente em carcinoma de cabeça e pescoço de células escamosas, os autores concluíram que a APOBEC3G exerce um importante papel na infiltração de linfócitos T CD8 ao demonstrarem que os pacientes com tumores HPV+ apresentaram uma hiper-regulação de APOBEC3G, quando comparados aos pacientes com tumores HPV-. Esse grupo HPV+ também exibiu um padrão de hipometilação de DNA em todo o genoma, onde a APOBEC3G foi apontada como uma grande responsável pela hiper-regulação da quimiocina *CXCL10* (um gene regulado por interferon que induz a ativação celular e quimiotaxia de linfócitos, especialmente durante infecções virais) e com a maior infiltração de linfócito T CD8 no tumor ²⁸⁶. *APOBEC3G* essa, que também se mostrou hiper-regulada nos pacientes HPV+ de nossa coorte, juntamente com diversos marcadores de supressão como o *PD-L1* (Figuras 8B, 19, 20 e Apêndice 2) e que apresentou um perfil de expressão gênica bem distinto entre os pacientes HPV- e HPV+, como visto nos *heatmaps* da Figura 22.

Desde que alguns estudos passaram a demonstrar que os tumores de cabeça e pescoço HPV+ expressam altos níveis de *IFNG* (que desempenha papel importante na hiper-regulação do gene *PD-L1*)²⁷³ além de vários outros inibidores de *checkpoint*^{41,125,201,202}, as correlações entre a atividade mutacional exercida por APOBEC3 e a expressão de marcadores de supressão passaram a revelar o potencial exercido pela mutagênese mediada por APOBEC3 no panorama imunológico do carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço HPV+, bem como na sua potencialidade em atuar como biomarcador de resposta a imunoterapias. Corroborando essa informação, um estudo demonstrou que a taxa mutacional induzida por atividade de APOBEC3 se correlacionou significativamente com a carga de neoantígenos específicos do tumor (ao contrário de outras fontes não mutagênicas de neoantígenos) que por sua vez, se correlacionaram com a resposta a imunoterapia²⁷³.

Além do papel estimulador desempenhado pelos neoantígenos na resposta imune, a análise de repertório de receptor de célula T (TCR ou *T-Cell Receptor*) pode ser altamente relevante para se entender melhor os diversos mecanismos imunes ou a até mesmo atuar como um biomarcador de resposta imune. Os TCRs são moléculas localizadas na superfície das células T e que são capazes de reconhecer os antígenos apresentados via MHC por outras células²⁸⁷. A maioria dos TCRs humanos são do tipo α e β (uma minoria consiste em TCR $\gamma\delta$ ²⁸⁸). A cadeia β do TCR é gerada por um processo aleatório de recombinação gênica das regiões V (variável), D (diversidade) e J (junção) (em que nos pontos de união entre essas regiões pode também ocorrer a incorporação ou deleção de outros nucleotídeos), enquanto que a cadeia α é gerada pela recombinação gênica das regiões V e J. A recombinação dessas regiões produz também uma região de hipervariabilidade chamada de região determinante de complementaridade hipervariável 3 (CDR3 ou *Complementarity-Determining Region 3*), que é uma das regiões mais críticas para o reconhecimento do antígeno, bem como a sua especificidade e afinidade²⁸⁹.

Existem diversas estratégias que foram desenvolvidas com o objetivo de caracterizar o repertório de TCR de células T infiltrantes no tumor como é o caso dos *softwares* TRUST²⁹⁰ e MiXCR²⁹¹, porém ainda não existem dados muito claros acerca da diversidade de TCR no carcinoma orofaríngeo de células escamosas, especialmente quando se ajusta pelo *status* viral. Esse é, inclusive, um campo muito interessante a ser explorado, especialmente porque permite avaliar melhor a dinâmica entre as proteínas virais presentes no infiltrado inflamatório, os neoantígenos gerados pela atividade aberrante das APOBEC3s e as diferenças de diversidade clonal de TCR presente nos tumores HPV- e HPV+. Especialmente ao se reunir as informações obtidas por esse estudo de que os pacientes HPV+ de carcinoma de orofaringe possuem uma

maior abundância de infiltrado de linfócitos T CD8 e também apresentam um perfil transcriptômico mais compatível a de uma resposta imune inflamatória crônica, com a expressão de diversos marcadores de exaustão predominando nesse grupo (Figuras 8B, 20 e Apêndice 2). Uma análise realizada pelo *software* TRUST poderia também validar, por meio de uma estratégia diferente, a presença do maior infiltrado de células T observado no ambiente tumoral dos pacientes HPV+, além de também identificar quais são os clones enriquecidos em cada grupo (o que pode evidenciar que naquele ambiente está ocorrendo uma resposta imune direcionada a um conjunto de antígenos que é comum naquele grupo de pacientes). Existem, inclusive, bancos de dados públicos como o PIRD ou *Pan immune repertoire database* (banco de dados de repertório pan-imune) ²⁹² e o McPAS-TCR ou *Manually Curated Catalogue of Pathology Associated T-Cell Receptor Sequences* (catálogo com curadoria manual de sequências de receptores de células T associadas à patologia) ²⁹³ que fornecem as sequências dos TCRs e CDR3s que reconhecem antígenos provindos de micro-organismos específicos como o HPV e que são uma excelente estratégia de identificação dos clones que respondem especificamente aos antígenos virais provindos do HPV.

Porém há muito para ser explorado em relação a esse equilíbrio de forças existente entre a infecção viral, a atividade mutacional promovida por APOBEC3 e a resposta imune. Esse trabalho mostrou que a infecção viral pelo HPV ativa uma rede de expressão gênica que está envolvida com a resposta imune e com a infiltração celular, principalmente de linfócitos T CD8. Uma vez que os vírus podem induzir uma resposta imune tanto pela geração de neoantígenos virais quanto pela geração de neoantígenos por outros mecanismos atuantes, tais como a assinatura mutacional de APOBEC3 (induzida por sua atividade aberrante), ainda há muito a ser investigado acerca da influência da atividade mutacional de APOBEC3 no panorama imune do carcinoma orofaríngeo de células escamosas, principalmente em relação a capacidade desses padrões mutacionais em induzir a geração de neoantígenos, que por sua vez, podem induzir a proliferação de linfócitos infiltrantes tumorais, além do desenvolvimento de uma resposta imune local.

6. CONCLUSÃO

Nesse estudo nós caracterizamos o panorama imune, transicional e mutacional e analisamos algumas das diferenças apresentadas entre os pacientes de carcinoma orofaríngeo de células escamosas associados ou não à infecção pelo HPV. Informações clínicas, de expressão gênica e SNVs foram coletadas do banco de dados públicos TCGA e a comparação entre os grupos estudados (HPV- e HPV+) revelou que a infecção pelo HPV impacta no panorama imunológico e mutacional do carcinoma orofaríngeo de células escamosas. Foi demonstrado que os pacientes com tumores HPV- apresentaram infiltrado inflamatório abundante em células da resposta imune inata e de populações estromais, além de um perfil transcriptômico mais compatível com a de uma resposta imune inflamatória aguda e associada a dano tecidual, enquanto que o ambiente tumoral dos pacientes com tumores HPV+ apresentou um abundante infiltrado imune adaptativo e perfil transcriptômico mais compatível a de uma resposta imune inflamatória crônica. Nesse contexto, a identificação da Assinatura Mutacional 2 (atribuída à atividade da família de enzimas AID/APOBEC cuja função remonta também a um dos mecanismos de imunidade inata antiviral) e da sua maior exposição em pacientes HPV+ demonstra como a atividade das AID/APOBECs foi impressa no genoma das células tumorais, além de que a expressão dos diversos membros da família das APOBEC3s se apresentou diferencialmente expressa e aumentada nos pacientes com tumores HPV+. A integração dos dados nos mostrou que o *status* viral positivo se associou a uma resposta imune de padrão mais adaptativo e inflamatório crônico, com a infiltração de linfócitos T CD8 no tumor e também com a presença da Assinatura Mutacional 2. Esse padrão identificado nos pacientes HPV+ foi independente da infiltração de linfócitos T CD8 e da Assinatura Mutacional 2 e o infiltrado linfocitário T CD8 observado nos pacientes com *status* viral positivo também não pareceu ser dependente da Assinatura Mutacional 2. Os resultados aqui apresentados podem contribuir para a elucidação dos mecanismos imunes e moleculares por trás da ação das APOBEC3s no contexto tumoral do carcinoma orofaríngeo de células escamosas, mas ainda há muito a se explorar em nossas amostras, especialmente na investigação do quanto a atividade das APOBEC3s contribui na resposta imune.

7. REFERÊNCIAS

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, Mathers C, Parkin DM, Piñeros M, et al. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J cancer* [Internet]. 2019;144(8):1941–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30350310>
2. 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* [Internet]. 2018;68(6):394–424. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30207593>
3. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estatísticas de câncer [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 14]. Available from: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>
4. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2020. Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2019.
5. de Martel C, Georges D, Bray F, Ferlay J, Clifford GM. Global burden of cancer attributable to infections in 2018: a worldwide incidence analysis. *Lancet Glob Heal* [Internet]. 2020;8(2):e180–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31862245>
6. Wild CP, Weiderpass E, Stewart BW, editors. World Cancer Report: Cancer Research for Cancer Prevention [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC); 2020. Available from: [https://www.iccp-portal.org/system/files/resources/IARC World Cancer Report 2020.pdf](https://www.iccp-portal.org/system/files/resources/IARC%20World%20Cancer%20Report%202020.pdf)
7. Leemans CR, Braakhuis BJM, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011 Jan;11(1):9–22. Available from: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nrc2982>
8. National Cancer Institute. Head and Neck Cancers [Internet]. 2019 [cited 2019 Jan 13]. Available from: <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet#q1>
9. Johnson NW, Jayasekara P, Amarasinghe AAHK. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. *Periodontol 2000* [Internet]. 2011 Oct;57(1):19–37. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1600->

0757.2011.00401.x

10. Lambert R, Sauvaget C, de Camargo Cancela M, Sankaranarayanan R. Epidemiology of cancer from the oral cavity and oropharynx. *Eur J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2011 Aug;23(8):633–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21654320>
11. National Cancer Institute. Oral Cavity, Pharyngeal, and Laryngeal Cancer Screening [Internet]. 2019 [cited 2019 Jan 13]. Available from: <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/patient/oral-screening-pdq#section/all>
12. Speight PM, Farthing PM. The pathology of oral cancer. *Br Dent J* [Internet]. 2018 Nov 9;225(9):841–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bdj.2018.926>
13. Chung CH, Parker JS, Karaca G, Wu J, Funkhouser WK, Moore D, et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. *Cancer Cell* [Internet]. 2004 May;5(5):489–500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15144956>
14. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J cancer* [Internet]. 2015 Mar 1;136(5):E359-86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842>
15. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2017 Jan;67(1):7–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28055103>
16. Union for International Cancer Control (UICC). TNM Classification of Malignant Tumours [Internet]. 8°. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C, editors. Oxford, UK: John Wiley & Sons; 2017. Available from: <https://www.wiley.com/en-gb/TNM+Classification+of+Malignant+Tumours%2C+8th+Edition-p-9781119263579>
17. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumors. UICC International Union Against Cancer, ed. 7. In 2009. Available from: <papers3://publication/uuid/9829346C-47BC-4B4A-A591-5221C74A8BD2>
18. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer (INCA). TNM: classificação de tumores malignos [Internet]. 6th ed. Chalhub T, editor. UICC. Rio de Janeiro: INCA; 2004. Available from: <http://www1.inca.gov.br/tratamento/tnm/index.asp>
19. American Cancer Society. About oral cavity and oropharyngeal cancer: what are oral cavity and oropharyngeal cancers? [Internet]. 2018 [cited 2019 Jan 13]. Available from:

- <https://www.cancer.org/cancer/oral-cavity-and-oropharyngeal-cancer/about/what-is-oral-cavity-cancer.html>
20. Wenig BM. Squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract: precursors and problematic variants. *Mod Pathol* [Internet]. 2002 Mar;15(3):229–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11904340>
 21. Boffetta P, Hecht S, Gray N, Gupta P, Straif K. Smokeless tobacco and cancer. *Lancet Oncol* [Internet]. 2008 Jul;9(7):667–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598931>
 22. Goldenberg D, Lee J, Koch WM, Kim MM, Trink B, Sidransky D, et al. Habitual risk factors for head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2004 Dec;131(6):986–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15577802>
 23. Saman DM. A review of the epidemiology of oral and pharyngeal carcinoma: update. *Head Neck Oncol* [Internet]. 2012 Jan 13;4(1):1. Available from: http://muse.jhu.edu/content/crossref/journals/journal_of_health_care_for_the_poor_and_underserved/v020/20.1.casto.html
 24. Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, Castellsague X, Chen C, Curado MP, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2007 May 16;99(10):777–89. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17505073>
 25. Hussein AA, Helder MN, de Visscher JG, Leemans CR, Braakhuis BJ, de Vet HCW, et al. Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: A systematic review. *Eur J Cancer* [Internet]. 2017;82:115–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28654785>
 26. Deschler DG, Richmon JD, Khariwala SS, Ferris RL, Wang MB. The “new” head and neck cancer patient-young, nonsmoker, nondrinker, and HPV positive: evaluation. *Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2014 Sep;151(3):375–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24925311>
 27. Chaturvedi AK. Epidemiology and clinical aspects of HPV in head and neck cancers. *Head Neck Pathol* [Internet]. 2012 Jul;6 Suppl 1:S16-24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22782220>

28. Marur S, D'Souza G, Westra WH, Forastiere AA. HPV-associated Head and Neck Cancer: A Virus-related Cancer Epidemic – A Review of Epidemiology, Biology, Virus Detection and Issues in Management. *Lancet Oncol*. 2010;11(8):781–9.
29. National Cancer Institute. Oropharyngeal Cancer Treatment [Internet]. 2019 [cited 2019 Jan 13]. Available from: <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/patient/adult/oropharyngeal-treatment-pdq#section/all>
30. Payne K, Spruce R, Beggs A, Sharma N, Kong A, Martin T, et al. Circulating tumor DNA as a biomarker and liquid biopsy in head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck* [Internet]. 2018 Jul;40(7):1598–604. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hed.25140>
31. Finegersh A, Holsinger FC, Gross ND, Orosco RK. Robotic Head and Neck Surgery. *Surg Oncol Clin N Am* [Internet]. 2019 Jan;28(1):115–28. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.soc.2018.07.008>
32. Liu H-H, Li L-J, Shi B, Xu C-W, Luo E. Robotic surgical systems in maxillofacial surgery: a review. *Int J Oral Sci* [Internet]. 2017;9(2):63–73. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ijos.2017.24>
33. Pan C, Issaeva N, Yarbrough WG. HPV-driven oropharyngeal cancer: current knowledge of molecular biology and mechanisms of carcinogenesis. *Cancers head neck* [Internet]. 2018;3:12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31093365>
34. Sim F, Leidner R, Bell RB. Immunotherapy for Head and Neck Cancer. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* [Internet]. 2019 Feb;31(1):85–100. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.coms.2018.09.002>
35. Yang B, Liu T, Qu Y, Liu H, Zheng SG, Cheng B, et al. Progresses and Perspectives of Anti-PD-1/PD-L1 Antibody Therapy in Head and Neck Cancers. *Front Oncol* [Internet]. 2018;8:563. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30547012>
36. Budach W, Bölke E, Kammers K, Gerber PA, Orth K, Gripp S, et al. Induction chemotherapy followed by concurrent radio-chemotherapy versus concurrent radio-chemotherapy alone as treatment of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC): A meta-analysis of randomized trials. *Radiother Oncol* [Internet]. 2016 Feb;118(2):238–43. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26589131>

37. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nova indicação para pacientes com câncer de cabeça e pescoço: Keytruda (pembrolizumabe) [Internet]. 2019 [cited 2020 Jan 24]. Available from: http://portal.anvisa.gov.br/informacoes-tecnicas13?p_p_id=101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2&p_p_col_id=column-2&p_p_col_pos=1&p_p_col_count=2&_101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2_groupId=219201&_101_INSTANCE_WvKKx2fhdjM2_urlTitle=keytruda-pembrolizumabe-nova-indicac-1&_101
38. Bristol-Myers Squibb Farmacêutica LTDA. Bula profissional de saúde OPDIVO (nivolumabe) [Internet]. Available from: https://www.bms.com/assets/bms/brazil/documents/Opdivo_SOL_INJ_VPS_Rev0418.pdf
39. Merck S/A. ERBITUX® (cetuximabe) 5 MG/ML SOL INJ [Internet]. Available from: https://www.4bio.com.br/wp-content/uploads/2019/06/Erbixux_Bula_230.pdf
40. Boussiotis VA. Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Nov 3;375(18):1767–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27806234>
41. Saleh K, Eid R, Haddad FG, Khalife-Saleh N, Kourie HR. New developments in the management of head and neck cancer - impact of pembrolizumab. *Ther Clin Risk Manag* [Internet]. 2018;14:295–303. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29497306>
42. The National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov [Internet]. 2020 [cited 2020 Jan 24]. Available from: <https://www.clinicaltrials.gov/>
43. Sabio JM, Pasquau J, Jiménez-Alonso J. Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* [Internet]. 2001 Aug 2;345(5):376; author reply 377. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11484706>
44. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, Spafford M, Westra WH, Wu L, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2000 May 3;92(9):709–20. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10793107>
45. zur Hausen H. Viruses in human cancers. *Science* [Internet]. 1991 Nov

- 22;254(5035):1167–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1659743>
46. de Villiers E-M, Fauquet C, Broker TR, Bernard H-U, zur Hausen H. Classification of papillomaviruses. *Virology* [Internet]. 2004 Jun 20;324(1):17–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15183049>
 47. Bernard H-U. The clinical importance of the nomenclature, evolution and taxonomy of human papillomaviruses. *J Clin Virol* [Internet]. 2005 Mar;32 Suppl 1:S1-6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15753006>
 48. International Agency for Research on Cancer (IARC). IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Human Papillomaviruses. Vol. 90. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2007. 56–63 p.
 49. Favre M, Breitbart F, Croissant O, Orth G. Chromatin-like structures obtained after alkaline disruption of bovine and human papillomaviruses. *J Virol* [Internet]. 1977 Mar;21(3):1205–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/191643>
 50. Pfister H, zur Hausen H. Characterization of proteins of human papilloma viruses (HPV) and antibody response to HPV 1. *Med Microbiol Immunol* [Internet]. 1978 Nov 17;166(1–4):13–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/214677>
 51. Longworth MS, Laimins LA. Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia. *Microbiol Mol Biol Rev* [Internet]. 2004 Jun;68(2):362–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15187189>
 52. Mohammed S, Bakshi N, Chaudri N, Akhter J, Akhtar M. Cancer Vaccines: Past, Present, and Future. *Adv Anat Pathol* [Internet]. 2016 May;23(3):180–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27058246>
 53. Doorbar J, Quint W, Banks L, Bravo IG, Stoler M, Broker TR, et al. The biology and life-cycle of human papillomaviruses. *Vaccine* [Internet]. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F55-70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199966>
 54. Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, Meijer CJLM, Shah K V. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol* [Internet]. 2002 Apr;55(4):244–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11919208>
 55. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, Herrero R, Castellsagué X, Shah K V., et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2003 Feb 6;348(6):518–27. Available from:

- <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa021641>
56. Hobbs CGL, Sterne JAC, Bailey M, Heyderman RS, Birchall MA, Thomas SJ. Human papillomavirus and head and neck cancer: a systematic review and meta-analysis. *Clin Otolaryngol* [Internet]. 2006 Aug;31(4):259–66. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1749-4486.2006.01246.x>
 57. D’Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, Pawlita M, Fakhry C, Koch WM, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2007 May 10;356(19):1944–56. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa065497>
 58. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Vital signs: current cigarette smoking among adults aged ≥ 18 years --- United States, 2009. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* [Internet]. 2010 Sep 10;59(35):1135–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20829747>
 59. Malta DC, Flor LS, Machado ÍE, Felisbino-Mendes MS, Brant LCC, Ribeiro ALP, et al. Trends in prevalence and mortality burden attributable to smoking, Brazil and federated units, 1990 and 2017. *Popul Health Metr* [Internet]. 2020;18(Suppl 1):24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32993660>
 60. Mehta V, Yu G-P, Schantz SP. Population-based analysis of oral and oropharyngeal carcinoma: changing trends of histopathologic differentiation, survival and patient demographics. *Laryngoscope* [Internet]. 2010 Nov;120(11):2203–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20938956>
 61. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* [Internet]. 2008 Feb 1;26(4):612–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18235120>
 62. Chaturvedi AK, Engels EA, Pfeiffer RM, Hernandez BY, Xiao W, Kim E, et al. Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States. *J Clin Oncol* [Internet]. 2011 Nov 10;29(32):4294–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21969503>
 63. Dahlstrom KR, Calzada G, Hanby JD, Garden AS, Glisson BS, Li G, 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* [Internet]. 2013 Jan 1;119(1):81–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22736261>
64. de Martel C, Ferlay J, Franceschi S, Vignat J, Bray F, Forman D, et al. Global burden of cancers attributable to infections in 2008: a review and synthetic analysis. *Lancet Oncol* [Internet]. 2012 Jun;13(6):607–15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575588>
65. D’Souza G, Wentz A, Kluz N, Zhang Y, Sugar E, Youngfellow RM, et al. Sex Differences in Risk Factors and Natural History of Oral Human Papillomavirus Infection. *J Infect Dis* [Internet]. 2016;213(12):1893–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26908748>
66. D’Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis* [Internet]. 2009 May 1;199(9):1263–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19320589>
67. Herbenick D, Reece M, Schick V, Sanders SA, Dodge B, Fortenberry JD. Sexual behavior in the United States: results from a national probability sample of men and women ages 14-94. *J Sex Med* [Internet]. 2010 Oct;7 Suppl 5:255–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21029383>
68. Giuliano AR, Nyitray AG, Kreimer AR, Pierce Campbell CM, Goodman MT, Sudenga SL, et al. EUROGIN 2014 roadmap: differences in human papillomavirus infection natural history, transmission and human papillomavirus-related cancer incidence by gender and anatomic site of infection. *Int J cancer* [Internet]. 2015 Jun 15;136(12):2752–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25043222>
69. Gillison ML, Broutian T, Pickard RKL, Tong Z, Xiao W, Kahle L, et al. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009-2010. *JAMA* [Internet]. 2012 Feb 15;307(7):693–703. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22282321>
70. Farsi NJ, El-Zein M, Gaied H, Lee YCA, Hashibe M, Nicolau B, et al. Sexual behaviours and head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2015 Dec;39(6):1036–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26372414>
71. Syrjänen S. Oral manifestations of human papillomavirus infections. *Eur J Oral Sci*

- [Internet]. 2018;126 Suppl:49–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30178562>
72. Allen CT, Lewis JS, El-Mofty SK, Haughey BH, Nussenbaum B. Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. *Laryngoscope* [Internet]. 2010 Sep;120(9):1756–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20669304>
73. Pyeon D, Newton MA, Lambert PF, den Boon JA, Sengupta S, Marsit CJ, et al. Fundamental differences in cell cycle deregulation in human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative head/neck and cervical cancers. *Cancer Res* [Internet]. 2007 May 15;67(10):4605–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17510386>
74. Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in Cancer Progression. *Exp Cell Res* [Internet]. 2001 Mar;264(1):42–55. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014482700951498>
75. Hara E, Smith R, Parry D, Tahara H, Stone S, Peters G. Regulation of p16CDKN2 expression and its implications for cell immortalization and senescence. *Mol Cell Biol* [Internet]. 1996 Mar;16(3):859–67. Available from: <http://mcb.asm.org/lookup/doi/10.1128/MCB.16.3.859>
76. El-Naggar AK, Westra WH. p16 expression as a surrogate marker for HPV-related oropharyngeal carcinoma: a guide for interpretative relevance and consistency. *Head Neck* [Internet]. 2012 Apr;34(4):459–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22180304>
77. Lechner M, Chakravarthy AR, Walter V, Masterson L, Feber A, Jay A, et al. Frequent HPV-independent p16/INK4A overexpression in head and neck cancer. *Oral Oncol* [Internet]. 2018;83:32–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30098776>
78. Bouvard V, Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, et al. A review of human carcinogens--Part B: biological agents. *Lancet Oncol* [Internet]. 2009 Apr;10(4):321–2. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1470204509700968>
79. 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* [Internet]. 2005 Feb;14(2):467–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15734974>
80. Zhang Z-Y, Sdek P, Cao J, Chen W-T. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2004 Jan;33(1):71–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14690662>
 81. Brentnall AR, Vasiljevic N, Scibior-Bentkowska D, Cadman L, Austin J, Cuzick J, et al. HPV33 DNA methylation measurement improves cervical pre-cancer risk estimation of an HPV16, HPV18, HPV31 and \textit{EPB41L3} methylation classifier. *Cancer Biomark* [Internet]. 2015;15(5):669–75. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26406956>
 82. Steinau M, Saraiya M, Goodman MT, Peters ES, Watson M, Cleveland JL, et al. Human papillomavirus prevalence in oropharyngeal cancer before vaccine introduction, United States. *Emerg Infect Dis* [Internet]. 2014 May;20(5):822–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24751181>
 83. De Cicco R, de Melo Menezes R, Nicolau UR, Pinto CAL, Villa LL, Kowalski LP. Impact of human papillomavirus status on survival and recurrence in a geographic region with a low prevalence of HPV-related cancer: A retrospective cohort study. *Head Neck* [Internet]. 2020;42(1):93–102. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31633252>
 84. Ang KK, Harris J, Wheeler R, Weber R, Rosenthal DI, Nguyen-Tân PF, et al. Human Papillomavirus and Survival of Patients with Oropharyngeal Cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Jul 1;363(1):24–35. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0912217>
 85. Fakhry C, Zhang Q, Nguyen-Tan PF, Rosenthal D, El-Naggar A, Garden AS, et al. Human papillomavirus and overall survival after progression of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* [Internet]. 2014 Oct 20;32(30):3365–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24958820>
 86. Chernock RD, El-Mofty SK, Thorstad WL, Parvin CA, Lewis JS. HPV-related nonkeratinizing squamous cell carcinoma of the oropharynx: utility of microscopic features in predicting patient outcome. *Head Neck Pathol* [Internet]. 2009 Sep;3(3):186–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20596971>

87. Miller DL, Puricelli MD, Stack MS. Virology and molecular pathogenesis of HPV (human papillomavirus)-associated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Biochem J* [Internet]. 2012 Apr 15;443(2):339–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22452816>
88. Bishop JA, Lewis JS, Rocco JW, Faquin WC. HPV-related squamous cell carcinoma of the head and neck: An update on testing in routine pathology practice. *Semin Diagn Pathol* [Internet]. 2015 Sep;32(5):344–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25724476>
89. Parfenov M, Pedomallu CS, Gehlenborg N, Freeman SS, Danilova L, Bristow CA, et al. Characterization of HPV and host genome interactions in primary head and neck cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Oct 28;111(43):15544–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25313082>
90. GlaxoSmithKline Brasil Ltda. Cervarix®. Bula Original da ANVISA; 2018.
91. Merck Sharp & Dohme Farmacêutica Ltda. GARDASIL® vacina papilomavírus humano 6, 11, 16 e 18 (recombinante). Bula Original da ANVISA; 2016.
92. Herrero R, Quint W, Hildesheim A, Gonzalez P, Struijk L, Katki HA, et al. Reduced prevalence of oral human papillomavirus (HPV) 4 years after bivalent HPV vaccination in a randomized clinical trial in Costa Rica. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(7):e68329. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23873171>
93. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* [Internet]. 2005 Jan;17(1):1–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15585605>
94. Mirza AH, Thomas G, Ottensmeier CH, King E V. Importance of the immune system in head and neck cancer. *Head Neck* [Internet]. 2019 Aug;41(8):2789–800. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/hed.25716>
95. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, et al. *Molecular biology of the cell*. 6th ed. W. W. Norton & Company; 2014. 429–432 p.
96. Mizgerd JP, Spieker MR, Doerschuk CM. Early response cytokines and innate immunity: essential roles for TNF receptor 1 and type I IL-1 receptor during *Escherichia coli* pneumonia in mice. *J Immunol* [Internet]. 2001 Mar 15;166(6):4042–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11238652>
97. Esche C, Stellato C, Beck LA. Chemokines: Key Players in Innate and Adaptive

- Immunity. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2005 Oct;125(4):615–28. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X15324684>
98. den Haan JMM, Arens R, van Zelm MC. The activation of the adaptive immune system: cross-talk between antigen-presenting cells, T cells and B cells. *Immunol Lett* [Internet]. 2014 Dec;162(2 Pt B):103–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25455596>
99. Chimal-Ramírez GK, Espinoza-Sánchez NA, Fuentes-Pananá EM. Protumor activities of the immune response: insights in the mechanisms of immunological shift, oncotraining, and oncopromotion. *J Oncol* [Internet]. 2013;2013:835956. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23577028>
100. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8°. Elsevier; 2015.
101. Chiossone L, Dumas P-Y, Vienne M, Vivier E. Natural killer cells and other innate lymphoid cells in cancer. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2018 Nov;18(11):671–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30209347>
102. Ren Y-X, Yang J, Zhang L-J, Sun R-M, Zhao L-F, Zhang M, et al. Downregulation of expression of transporters associated with antigen processing 1 and 2 and human leukocyte antigen I and its effect on immunity in nasopharyngeal carcinoma patients. *Mol Clin Oncol* [Internet]. 2014 Jan;2(1):51–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24649307>
103. Ferris RL. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2015 Oct 10;33(29):3293–304. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26351330>
104. Moutsopoulos NM, Wen J, Wahl SM. TGF-beta and tumors--an ill-fated alliance. *Curr Opin Immunol* [Internet]. 2008 Apr;20(2):234–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18486463>
105. Pallandre J-R, Brillard E, Créhange G, Radlovic A, Remy-Martin J-P, Saas P, et al. Role of STAT3 in CD4+CD25+FOXP3+ regulatory lymphocyte generation: implications in graft-versus-host disease and antitumor immunity. *J Immunol* [Internet]. 2007 Dec 1;179(11):7593–604. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18025205>
106. Gameiro SF, Ghasemi F, Barrett JW, Koropatnick J, Nichols AC, Mymryk JS, et al. Treatment-naïve HPV+ head and neck cancers display a T-cell-inflamed phenotype

- distinct from their HPV- counterparts that has implications for immunotherapy. *Oncoimmunology* [Internet]. 2018;7(10):e1498439. Available from: <https://doi.org/10.1080/2162402X.2018.1498439>
107. Solomon B, Young RJ, Bressel M, Urban D, Hendry S, Thai A, et al. Prognostic Significance of PD-L1⁺ and CD8⁺ Immune Cells in HPV⁺ Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Immunol Res* [Internet]. 2018 Jan 29;295–305. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29378694>
 108. Andersen AS, Koldjaer Sølling AS, Ovesen T, Rusan M. The interplay between HPV and host immunity in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J cancer* [Internet]. 2014 Jun 15;134(12):2755–63. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23913554>
 109. Park JS, Kim EJ, Kwon HJ, Hwang ES, Namkoong SE, Um SJ. Inactivation of interferon regulatory factor-1 tumor suppressor protein by HPV E7 oncoprotein. Implication for the E7-mediated immune evasion mechanism in cervical carcinogenesis. *J Biol Chem* [Internet]. 2000 Mar 10;275(10):6764–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10702232>
 110. Ashrafi GH, Haghshenas MR, Marchetti B, O'Brien PM, Campo MS. E5 protein of human papillomavirus type 16 selectively downregulates surface HLA class I. *Int J cancer* [Internet]. 2005 Jan 10;113(2):276–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15386416>
 111. Guess JC, McCance DJ. Decreased migration of Langerhans precursor-like cells in response to human keratinocytes expressing human papillomavirus type 16 E6/E7 is related to reduced macrophage inflammatory protein-3 α production. *J Virol* [Internet]. 2005 Dec;79(23):14852–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16282485>
 112. McCance DJ. Human papillomaviruses and cell signaling. *Sci STKE* [Internet]. 2005 Jun 14;2005(288):pe29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15956361>
 113. Stanley M. Pathology and epidemiology of HPV infection in females. *Gynecol Oncol* [Internet]. 2010 May;117(2 Suppl):S5-10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20304221>

114. Lehoux M, D'Abramo CM, Archambault J. Molecular mechanisms of human papillomavirus-induced carcinogenesis. *Public Health Genomics* [Internet]. 2009;12(5–6):268–80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19684440>
115. Heusinkveld M, Goedemans R, Briet RJP, Gelderblom H, Nortier JWR, Gorter A, et al. Systemic and local human papillomavirus 16-specific T-cell immunity in patients with head and neck cancer. *Int J cancer* [Internet]. 2012 Jul 15;131(2):E74–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020783>
116. Hoffmann TK, Arsov C, Schirlau K, Bas M, Friebe-Hoffmann U, Klussmann JP, et al. T cells specific for HPV16 E7 epitopes in patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Int J cancer* [Internet]. 2006 Apr 15;118(8):1984–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16284959>
117. Nordfors C, Grün N, Tertipis N, Ährlund-Richter A, Haegglblom L, Sivars L, et al. CD8+ and CD4+ tumour infiltrating lymphocytes in relation to human papillomavirus status and clinical outcome in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer* [Internet]. 2013 Jul;49(11):2522–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959804913002220>
118. Chen X, Yan B, Lou H, Shen Z, Tong F, Zhai A, et al. Immunological network analysis in HPV associated head and neck squamous cancer and implications for disease prognosis. *Mol Immunol* [Internet]. 2018;96:28–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29477933>
119. Hess A-K, Jöhrens K, Zakarneh A, Balermipas P, Von Der Grün J, Rödel C, et al. Characterization of the tumor immune micromilieu and its interference with outcome after concurrent chemoradiation in patients with oropharyngeal carcinomas. *Oncoimmunology* [Internet]. 2019;8(8):1614858. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31413922>
120. Chakravarthy A, Henderson S, Thirdborough SM, Ottensmeier CH, Su X, Lechner M, et al. Human Papillomavirus Drives Tumor Development Throughout the Head and Neck: Improved Prognosis Is Associated With an Immune Response Largely Restricted to the Oropharynx. *J Clin Oncol* [Internet]. 2016 Dec 1;34(34):4132–41. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2016.68.2955>
121. Mandal R, Şenbabaoğlu Y, Desrichard A, Havel JJ, Dalin MG, Riaz N, et al. The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. *JCI insight*

- [Internet]. 2016 Oct 20;1(17):e89829. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27777979>
122. Näsman A, Romanitan M, Nordfors C, Grün N, Johansson H, Hammarstedt L, et al. Tumor infiltrating CD8+ and Foxp3+ lymphocytes correlate to clinical outcome and human papillomavirus (HPV) status in tonsillar cancer. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(6):e38711. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22701698>
 123. Mirghani H, Amen F, Tao Y, Deutsch E, Levy A. Increased radiosensitivity of HPV-positive head and neck cancers: Molecular basis and therapeutic perspectives. *Cancer Treat Rev* [Internet]. 2015 Dec;41(10):844–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26476574>
 124. Gubanov E, Brown B, Ivanov S V, Helleday T, Mills GB, Yarbrough WG, et al. Downregulation of SMG-1 in HPV-positive head and neck squamous cell carcinoma due to promoter hypermethylation correlates with improved survival. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2012 Mar 1;18(5):1257–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22247495>
 125. Cancer Genome Atlas Network, Lawrence MS, Sougnez C, Lichtenstein L, Cibulskis K, Lander E, et al. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature* [Internet]. 2015 Jan 29;517(7536):576–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25631445>
 126. Seiwert TY, Zuo Z, Keck MK, Khattri A, Peadarallu CS, Stricker T, et al. Integrative and comparative genomic analysis of HPV-positive and HPV-negative head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2015 Feb 1;21(3):632–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25056374>
 127. Lohavanichbutr P, Houck J, Fan W, Yueh B, Mendez E, Futran N, et al. Genomewide gene expression profiles of HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer: potential implications for treatment choices. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2009 Feb;135(2):180–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19221247>
 128. Wilting SM, Smeets SJ, Snijders PJF, van Wieringen WN, van de Wiel MA, Meijer GA, et al. Genomic profiling identifies common HPV-associated chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of cervix and head and neck. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2009 Jun 1;2:32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19486517>

129. Martinez I, Wang J, Hobson KF, Ferris RL, Khan SA. Identification of differentially expressed genes in HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Eur J Cancer* [Internet]. 2007 Jan;43(2):415–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079134>
130. Klussmann JP, Mooren JJ, Lehnen M, Claessen SMH, Stenner M, Huebbers CU, et al. Genetic signatures of HPV-related and unrelated oropharyngeal carcinoma and their prognostic implications. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2009 Mar 1;15(5):1779–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19223504>
131. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* [Internet]. 1991 Jul 5;253(5015):49–53. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1905840>
132. Li VD, Li KH, Li JT. TP53 mutations as potential prognostic markers for specific cancers: analysis of data from The Cancer Genome Atlas and the International Agency for Research on Cancer TP53 Database. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2019 Mar;145(3):625–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30542790>
133. Petljak M, Alexandrov LB. Understanding mutagenesis through delineation of mutational signatures in human cancer. *Carcinogenesis* [Internet]. 2016;37(6):531–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27207657>
134. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Aparicio SAJR, Behjati S, Biankin A V, et al. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* [Internet]. 2013 Aug 22;500(7463):415–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23945592>
135. de Gruijl FR, van Kranen HJ, Mullenders LH. UV-induced DNA damage, repair, mutations and oncogenic pathways in skin cancer. *J Photochem Photobiol B* [Internet]. 2001 Oct;63(1–3):19–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11684448>
136. Nik-Zainal S, Kucab JE, Morganella S, Glodzik D, Alexandrov LB, Arlt VM, et al. The genome as a record of environmental exposure. *Mutagenesis* [Internet]. 2015 Nov;30(6):763–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26443852>
137. Nakagawa H, Fujita M. Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine. *Cancer Sci* [Internet]. 2018 Mar;109(3):513–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29345757>

138. Helleday T, Eshtad S, Nik-Zainal S. Mechanisms underlying mutational signatures in human cancers. *Nat Rev Genet* [Internet]. 2014 Sep;15(9):585–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24981601>
139. Alexandrov LB, Jones PH, Wedge DC, Sale JE, Campbell PJ, Nik-Zainal S, et al. Clock-like mutational processes in human somatic cells. *Nat Genet* [Internet]. 2015 Dec;47(12):1402–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26551669>
140. Alexandrov LB, Ju YS, Haase K, Van Loo P, Martincorena I, Nik-Zainal S, et al. Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science* [Internet]. 2016;354(6312):618–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27811275>
141. Chan K, Roberts SA, Klimczak LJ, Sterling JF, Saini N, Malc EP, et al. An APOBEC3A hypermutation signature is distinguishable from the signature of background mutagenesis by APOBEC3B in human cancers. *Nat Genet* [Internet]. 2015 Sep;47(9):1067–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26258849>
142. Harris RS, Dudley JP. APOBECs and virus restriction. *Virology* [Internet]. 2015 May;479–480:131–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25818029>
143. Roberts SA, Gordenin DA. Hypermutation in human cancer genomes: footprints and mechanisms. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2014;14(12):786–800. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25568919>
144. Henderson S, Chakravarthy A, Su X, Boshoff C, Fenton TR. APOBEC-mediated cytosine deamination links PIK3CA helical domain mutations to human papillomavirus-driven tumor development. *Cell Rep* [Internet]. 2014 Jun 26;7(6):1833–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24910434>
145. Bobrovnitshaia I, Valieris R, Drummond RD, Lima JP, Freitas HC, Bartelli TF, et al. APOBEC-mediated DNA alterations: A possible new mechanism of carcinogenesis in EBV-positive gastric cancer. *Int J cancer* [Internet]. 2020;146(1):181–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31090066>
146. Tomczak K, Czerwińska P, Wiznerowicz M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp Oncol (Poznan, Poland)* [Internet]. 2015;19(1A):A68-77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25691825>

147. Refsland EW, Harris RS. The APOBEC3 family of retroelement restriction factors. *Curr Top Microbiol Immunol* [Internet]. 2013;371:1–27. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23686230>
148. Conticello SG. Creative deaminases, self-inflicted damage, and genome evolution. *Ann N Y Acad Sci* [Internet]. 2012 Sep;1267:79–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22954220>
149. Harris RS, Liddament MT. Retroviral restriction by APOBEC proteins. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2004 Nov;4(11):868–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15516966>
150. Münk C, Willemsen A, Bravo IG. An ancient history of gene duplications, fusions and losses in the evolution of APOBEC3 mutators in mammals. *BMC Evol Biol* [Internet]. 2012 May 28;12:71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22640020>
151. Conticello SG, Thomas CJF, Petersen-Mahrt SK, Neuberger MS. Evolution of the AID/APOBEC family of polynucleotide (deoxy)cytidine deaminases. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2005 Feb;22(2):367–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15496550>
152. Münk C, Beck T, Zielonka J, Hotz-Wagenblatt A, Chareza S, Battenberg M, et al. Functions, structure, and read-through alternative splicing of feline APOBEC3 genes. *Genome Biol* [Internet]. 2008;9(3):R48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18315870>
153. LaRue RS, Jónsson SR, Silverstein KAT, Lajoie M, Bertrand D, El-Mabrouk N, et al. The artiodactyl APOBEC3 innate immune repertoire shows evidence for a multi-functional domain organization that existed in the ancestor of placental mammals. *BMC Mol Biol* [Internet]. 2008 Nov 18;9:104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19017397>
154. Conticello SG. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol* [Internet]. 2008;9(6):229. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18598372>
155. Muto T, Muramatsu M, Taniwaki M, Kinoshita K, Honjo T. Isolation, tissue distribution, and chromosomal localization of the human activation-induced cytidine deaminase (AID) gene. *Genomics* [Internet]. 2000 Aug 15;68(1):85–8. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10950930>
156. Nakamuta M, Chang BH, Zsigmond E, Kobayashi K, Lei H, Ishida BY, et al. Complete phenotypic characterization of apobec-1 knockout mice with a wild-type genetic background and a human apolipoprotein B transgenic background, and restoration of apolipoprotein B mRNA editing by somatic gene transfer of Apobec-1. *J Biol Chem* [Internet]. 1996 Oct 18;271(42):25981–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8824235>
 157. Liao W, Hong SH, Chan BH, Rudolph FB, Clark SC, Chan L. APOBEC-2, a cardiac- and skeletal muscle-specific member of the cytidine deaminase supergene family. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 1999 Jul 5;260(2):398–404. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10403781>
 158. Wedekind JE, Dance GSC, Sowden MP, Smith HC. Messenger RNA editing in mammals: new members of the APOBEC family seeking roles in the family business. *Trends Genet* [Internet]. 2003 Apr;19(4):207–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12683974>
 159. Jarmuz A, Chester A, Bayliss J, Gisbourne J, Dunham I, Scott J, et al. An anthropoid-specific locus of orphan C to U RNA-editing enzymes on chromosome 22. *Genomics* [Internet]. 2002 Mar;79(3):285–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11863358>
 160. Nik-Zainal S, Alexandrov LB, Wedge DC, Van Loo P, Greenman CD, Raine K, et al. Mutational processes molding the genomes of 21 breast cancers. *Cell* [Internet]. 2012 May 25;149(5):979–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22608084>
 161. Burns MB, Lackey L, Carpenter MA, Rathore A, Land AM, Leonard B, et al. APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature* [Internet]. 2013 Feb 21;494(7437):366–70. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23389445>
 162. Burns MB, Temiz NA, Harris RS. Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Sep;45(9):977–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23852168>
 163. Roberts SA, Lawrence MS, Klimczak LJ, Grimm SA, Fargo D, Stojanov P, et al. An

- APOBEC cytidine deaminase mutagenesis pattern is widespread in human cancers. *Nat Genet* [Internet]. 2013 Sep;45(9):970–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23852170>
164. Henderson S, Fenton T. APOBEC3 genes: retroviral restriction factors to cancer drivers. *Trends Mol Med* [Internet]. 2015 May;21(5):274–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25820175>
 165. Swanton C, McGranahan N, Starrett GJ, Harris RS. APOBEC Enzymes: Mutagenic Fuel for Cancer Evolution and Heterogeneity. *Cancer Discov* [Internet]. 2015 Jul;5(7):704–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26091828>
 166. Salter JD, Bennett RP, Smith HC. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends Biochem Sci* [Internet]. 2016;41(7):578–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27283515>
 167. Lackey L, Law EK, Brown WL, Harris RS. Subcellular localization of the APOBEC3 proteins during mitosis and implications for genomic DNA deamination. *Cell Cycle* [Internet]. 2013 Mar 1;12(5):762–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23388464>
 168. Landry S, Narvaiza I, Linfesty DC, Weitzman MD. APOBEC3A can activate the DNA damage response and cause cell-cycle arrest. *EMBO Rep* [Internet]. 2011 May;12(5):444–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21460793>
 169. Sharma S, Patnaik SK, Taggart RT, Kannisto ED, Enriquez SM, Gollnick P, et al. APOBEC3A cytidine deaminase induces RNA editing in monocytes and macrophages. *Nat Commun* [Internet]. 2015 Apr 21;6:6881. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25898173>
 170. Stenglein MD, Burns MB, Li M, Lengyel J, Harris RS. APOBEC3 proteins mediate the clearance of foreign DNA from human cells. *Nat Struct Mol Biol* [Internet]. 2010 Feb;17(2):222–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20062055>
 171. Zou J, Wang C, Ma X, Wang E, Peng G. APOBEC3B, a molecular driver of mutagenesis in human cancers. *Cell Biosci* [Internet]. 2017;7:29. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28572915>
 172. Reprinted from Olson ME, Harris RS, Harki DA. APOBEC Enzymes as Targets for Virus and Cancer Therapy. *Cell Chem Biol* [Internet]. 2018;25(1):36–49. Available

- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29153851> with permission from Elsevier.
173. Ellrott K, Bailey MH, Saksena G, Covington KR, Kandath C, Stewart C, et al. Scalable Open Science Approach for Mutation Calling of Tumor Exomes Using Multiple Genomic Pipelines. *Cell Syst* [Internet]. 2018;6(3):271-281.e7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29596782>
 174. Yoshihara K, Shahmoradgoli M, Martínez E, Vegesna R, Kim H, Torres-Garcia W, et al. Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data. *Nat Commun* [Internet]. 2013;4:2612. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24113773>
 175. Newman AM, Liu CL, Green MR, Gentles AJ, Feng W, Xu Y, et al. Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat Methods* [Internet]. 2015 May;12(5):453–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25822800>
 176. Becht E, Giraldo NA, Lacroix L, Buttard B, Elarouci N, Petitprez F, et al. Estimating the population abundance of tissue-infiltrating immune and stromal cell populations using gene expression. *Genome Biol* [Internet]. 2016;17(1):218. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27765066>
 177. Rosales RA, Drummond RD, Valieris R, Dias-Neto E, da Silva IT. signeR: an empirical Bayesian approach to mutational signature discovery. *Bioinformatics* [Internet]. 2017;33(1):8–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27591080>
 178. Blokzijl F, Janssen R, van Boxtel R, Cuppen E. MutationalPatterns: comprehensive genome-wide analysis of mutational processes. *Genome Med* [Internet]. 2018;10(1):33. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29695279>
 179. Gehring JS, Fischer B, Lawrence M, Huber W. SomaticSignatures: inferring mutational signatures from single-nucleotide variants. *Bioinformatics* [Internet]. 2015 Nov 15;31(22):3673–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26163694>
 180. Bergstrom EN, Huang MN, Mahto U, Barnes M, Stratton MR, Rozen SG, et al. SigProfilerMatrixGenerator: a tool for visualizing and exploring patterns of small mutational events. *BMC Genomics* [Internet]. 2019 Aug 30;20(1):685. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31470794>
 181. Rosenthal R, McGranahan N, Herrero J, Taylor BS, Swanton C. DeconstructSigs: delineating mutational processes in single tumors distinguishes DNA repair deficiencies

- and patterns of carcinoma evolution. *Genome Biol* [Internet]. 2016 Feb 22;17:31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26899170>
182. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* [Internet]. 2014;15(12):550. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25516281>
 183. Huber W, Carey VJ, Gentleman R, Anders S, Carlson M, Carvalho BS, et al. Orchestrating high-throughput genomic analysis with Bioconductor. *Nat Methods* [Internet]. 2015 Feb;12(2):115–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25633503>
 184. Grüning B, Dale R, Sjödin A, Chapman BA, Rowe J, Tomkins-Tinch CH, et al. Bioconda: sustainable and comprehensive software distribution for the life sciences. *Nat Methods* [Internet]. 2018 Jul 2;15(7):475–6. Available from: <http://www.nature.com/articles/s41592-018-0046-7>
 185. Hay A, Nixon IJ. Recent advances in the understanding and management of oropharyngeal cancer. *F1000Research* [Internet]. 2018;7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30228861>
 186. Worsham MJ, Stephen JK, Chen KM, Mahan M, Schweitzer V, Havard S, et al. Improved survival with HPV among African Americans with oropharyngeal cancer. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2013 May 1;19(9):2486–92. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23532894>
 187. Dayyani F, Etzel CJ, Liu M, Ho C-H, Lippman SM, Tsao AS. Meta-analysis of the impact of human papillomavirus (HPV) on cancer risk and overall survival in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). *Head Neck Oncol* [Internet]. 2010 Jun 29;2:15. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20587061>
 188. Mahal BA, Catalano PJ, Haddad RI, Hanna GJ, Kass JI, Schoenfeld JD, et al. Incidence and Demographic Burden of HPV-Associated Oropharyngeal Head and Neck Cancers in the United States. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2019;28(10):1660–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31358520>
 189. Ko HC, Harari PM, Sacotte RM, Chen S, Wieland AM, Yu M, et al. Prognostic implications of human papillomavirus status for patients with non-oropharyngeal head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2017

- Nov;143(11):2341–50. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28752235>
190. Fakhry C, Westra WH, Li S, Cmelak A, Ridge JA, Pinto H, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2008 Feb 20;100(4):261–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18270337>
191. Forman D, de Martel C, Lacey CJ, Soerjomataram I, Lortet-Tieulent J, Bruni L, et al. Global burden of human papillomavirus and related diseases. *Vaccine* [Internet]. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F12-23. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199955>
192. Gillison ML, Alemany L, Snijders PJF, Chaturvedi A, Steinberg BM, Schwartz S, et al. Human papillomavirus and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine* [Internet]. 2012 Nov 20;30 Suppl 5:F34-54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23199965>
193. Varn FS, Schaafsma E, Wang Y, Cheng C. Genomic Characterization of Six Virus-Associated Cancers Identifies Changes in the Tumor Immune Microenvironment and Altered Genetic Programs. *Cancer Res* [Internet]. 2018;78(22):6413–23. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30254145>
194. Hong AM, Martin A, Chatfield M, Jones D, Zhang M, Armstrong B, et al. Human papillomavirus, smoking status and outcomes in tonsillar squamous cell carcinoma. *Int J cancer* [Internet]. 2013 Jun 15;132(12):2748–54. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23180456>
195. Gillison ML, Zhang Q, Jordan R, Xiao W, Westra WH, Trotti A, et al. Tobacco smoking and increased risk of death and progression for patients with p16-positive and p16-negative oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* [Internet]. 2012 Jun 10;30(17):2102–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22565003>
196. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med* [Internet]. 1997 Apr 10;336(15):1066–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9091804>
197. Baldwin AS. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest* [Internet]. 2001 Jan;107(1):3–6. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11134170>
198. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 1998;16:225–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9597130>
 199. Ghosh G, Wang VY-F, Huang D-B, Fusco A. NF-κB regulation: lessons from structures. *Immunol Rev* [Internet]. 2012 Mar;246(1):36–58. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22435546>
 200. Senftleben U, Cao Y, Xiao G, Greten FR, Krähn G, Bonizzi G, et al. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science* [Internet]. 2001 Aug 24;293(5534):1495–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11520989>
 201. Seiwert TY, Burtneess B, Mehra R, Weiss J, Berger R, Eder JP, et al. Safety and clinical activity of pembrolizumab for treatment of recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (KEYNOTE-012): an open-label, multicentre, phase 1b trial. *Lancet Oncol* [Internet]. 2016 Jul;17(7):956–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27247226>
 202. Ferris RL, Blumenschein G, Fayette J, Guigay J, Colevas AD, Licitra L, et al. Nivolumab for Recurrent Squamous-Cell Carcinoma of the Head and Neck. *N Engl J Med* [Internet]. 2016 Nov 10;375(19):1856–67. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoal602252>
 203. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2000;18:217–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10837058>
 204. Biswas SK, Mantovani A. Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat Immunol* [Internet]. 2010 Oct;11(10):889–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20856220>
 205. Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* [Internet]. 2004 Dec;25(12):677–86. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15530839>
 206. Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future.

- Immunity [Internet]. 2013 Dec 12;39(6):1003–18. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24332029>
207. Hernandez C, Huebener P, Schwabe RF. Damage-associated molecular patterns in cancer: a double-edged sword. *Oncogene* [Internet]. 2016;35(46):5931–41. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27086930>
208. Srikrishna G, Freeze HH. Endogenous damage-associated molecular pattern molecules at the crossroads of inflammation and cancer. *Neoplasia* [Internet]. 2009 Jul;11(7):615–28. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19568407>
209. Heijink IH, Pouwels SD, Leijendekker C, de Bruin HG, Zijlstra GJ, van der Vaart H, et al. Cigarette smoke-induced damage-associated molecular pattern release from necrotic neutrophils triggers proinflammatory mediator release. *Am J Respir Cell Mol Biol* [Internet]. 2015 May;52(5):554–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25192219>
210. Cillo AR, Kürten CHL, Tabib T, Qi Z, Onkar S, Wang T, et al. Immune Landscape of Viral- and Carcinogen-Driven Head and Neck Cancer. *Immunity* [Internet]. 2020;52(1):183-199.e9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31924475>
211. Pytynia KB, Dahlstrom KR, Sturgis EM. Epidemiology of HPV-associated oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* [Internet]. 2014;50(5):380–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.12.019>
212. Iadecola C, Cho S, Feuerstein GZ, Hallenbeck J. Cerebral Ischemia and Inflammation. In: *Stroke* [Internet]. Elsevier; 2004. p. 883–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B0443066000500523>
213. Partlová S, Bouček J, Kloudová K, Lukešová E, Zábrodský M, Grega M, et al. Distinct patterns of intratumoral immune cell infiltrates in patients with HPV-associated compared to non-virally induced head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* [Internet]. 2015 Jan;4(1):e965570. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25949860>
214. Clancy T, Dannenfels R, Troyanskaya O, Malmberg KJ, Hovig E, Kristensen V. Bioinformatics Approaches to Profile the Tumor Microenvironment for Immunotherapeutic Discovery. *Curr Pharm Des* [Internet]. 2017;23(32):4716–25.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28699527>

215. Finotello F, Trajanoski Z. Quantifying tumor-infiltrating immune cells from transcriptomics data. *Cancer Immunol Immunother* [Internet]. 2018;67(7):1031–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29541787>
216. Zhang Z, Bao S, Yan C, Hou P, Zhou M, Sun J. Computational principles and practice for decoding immune contexture in the tumor microenvironment. *Brief Bioinform* [Internet]. 2020 Jun 3; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32496512>
217. Gentles AJ, Newman AM, Liu CL, Bratman S V, Feng W, Kim D, et al. The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* [Internet]. 2015 Aug;21(8):938–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26193342>
218. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reyniès A, Schlicker A, Soneson C, et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat Med* [Internet]. 2015 Nov;21(11):1350–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26457759>
219. Lechner A, Schlöber HA, Thelen M, Wennhold K, Rothschild SI, Gilles R, et al. Tumor-associated B cells and humoral immune response in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncoimmunology* [Internet]. 2019;8(3):1535293. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30723574>
220. Ward MJ, Thirdborough SM, Mellows T, Riley C, Harris S, Suchak K, et al. Tumour-infiltrating lymphocytes predict for outcome in HPV-positive oropharyngeal cancer. *Br J Cancer* [Internet]. 2014 Jan 21;110(2):489–500. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24169344>
221. Oguejiofor K, Hall J, Slater C, Betts G, Hall G, Slevin N, et al. Stromal infiltration of CD8 T cells is associated with improved clinical outcome in HPV-positive oropharyngeal squamous carcinoma. *Br J Cancer* [Internet]. 2015 Sep 15;113(6):886–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26313665>
222. 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* [Internet]. 2018;39(2):170–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29140428>

223. Merlo A, Turrini R, Dolcetti R, Martorelli D, Muraro E, Comoli P, et al. The interplay between Epstein-Barr virus and the immune system: a rationale for adoptive cell therapy of EBV-related disorders. *Haematologica* [Internet]. 2010 Oct;95(10):1769–77. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20421267>
224. Ramos CA, Narala N, Vyas GM, Leen AM, Gerdemann U, Sturgis EM, et al. Human papillomavirus type 16 E6/E7-specific cytotoxic T lymphocytes for adoptive immunotherapy of HPV-associated malignancies. *J Immunother* [Internet]. 2013 Jan;36(1):66–76. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23211628>
225. Steele JC, Mann CH, Rookes S, Rollason T, Murphy D, Freeth MG, et al. T-cell responses to human papillomavirus type 16 among women with different grades of cervical neoplasia. *Br J Cancer* [Internet]. 2005 Jul 25;93(2):248–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15986031>
226. Wang B-C, Cao R-B, Li P-D, Fu C. The effects and safety of PD-1/PD-L1 inhibitors on head and neck cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Med* [Internet]. 2019;8(13):5969–78. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31436392>
227. Wang J, Sun H, Zeng Q, Guo X-J, Wang H, Liu H-H, et al. HPV-positive status associated with inflamed immune microenvironment and improved response to anti-PD-1 therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Sci Rep* [Internet]. 2019;9(1):13404. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31527697>
228. Semenza GL. Oxygen sensing, hypoxia-inducible factors, and disease pathophysiology. *Annu Rev Pathol* [Internet]. 2014;9:47–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23937437>
229. Greijer AE, van der Wall E. The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol* [Internet]. 2004 Oct;57(10):1009–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15452150>
230. Chen B, Li L, Li M, Wang X. HIF1A expression correlates with increased tumor immune and stromal signatures and aggressive phenotypes in human cancers. *Cell Oncol (Dordr)* [Internet]. 2020 Oct;43(5):877–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32488852>
231. Segovia R, Tam AS, Stirling PC. Dissecting genetic and environmental mutation signatures with model organisms. *Trends Genet* [Internet]. 2015 Aug;31(8):465–74.

- Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940384>
232. Serero A, Jubin C, Loeillet S, Legoix-Né P, Nicolas AG. Mutational landscape of yeast mutator strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2014 Feb 4;111(5):1897–902. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24449905>
233. Zanders S, Ma X, Roychoudhury A, Hernandez RD, Demogines A, Barker B, et al. Detection of heterozygous mutations in the genome of mismatch repair defective diploid yeast using a Bayesian approach. *Genetics* [Internet]. 2010 Oct;186(2):493–503. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20660644>
234. Lee H, Popodi E, Tang H, Foster PL. Rate and molecular spectrum of spontaneous mutations in the bacterium *Escherichia coli* as determined by whole-genome sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2012 Oct 9;109(41):E2774–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22991466>
235. Lada AG, Dhar A, Boissy RJ, Hirano M, Rubel AA, Rogozin IB, et al. AID/APOBEC cytosine deaminase induces genome-wide kataegis. *Biol Direct* [Internet]. 2012 Dec 18;7:47; discussion 47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23249472>
236. Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC). Mutational Signatures [Internet]. 2020 [cited 2020 Aug 25]. Available from: <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/signatures/>
237. Alexandrov LB, Nik-Zainal S, Wedge DC, Campbell PJ, Stratton MR. Deciphering signatures of mutational processes operative in human cancer. *Cell Rep* [Internet]. 2013 Jan 31;3(1):246–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23318258>
238. Omichessan H, Severi G, Perduca V. Computational tools to detect signatures of mutational processes in DNA from tumours: A review and empirical comparison of performance. *PLoS One* [Internet]. 2019;14(9):e0221235. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31513583>
239. Baez-Ortega A, Gori K. Computational approaches for discovery of mutational signatures in cancer. *Brief Bioinform* [Internet]. 2019;20(1):77–88. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28968631>
240. Devarajan K. Nonnegative matrix factorization: an analytical and interpretive tool in computational biology. *PLoS Comput Biol* [Internet]. 2008 Jul 25;4(7):e1000029.

Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18654623>

241. Brunet J-P, Tamayo P, Golub TR, Mesirov JP. Metagenes and molecular pattern discovery using matrix factorization. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2004 Mar 23;101(12):4164–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15016911>
242. Taylor BJ, Nik-Zainal S, Wu YL, Stebbings LA, Raine K, Campbell PJ, et al. DNA deaminases induce break-associated mutation showers with implication of APOBEC3B and 3A in breast cancer kataegis. *Elife* [Internet]. 2013 Apr 16;2:e00534. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23599896>
243. Alexandrov LB, Kim J, Haradhvala NJ, Huang MN, Tian Ng AW, Wu Y, et al. The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature* [Internet]. 2020;578(7793):94–101. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32025018>
244. Wilson DM, Bohr VA. The mechanics of base excision repair, and its relationship to aging and disease. *DNA Repair (Amst)* [Internet]. 2007 Apr 1;6(4):544–59. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17112792>
245. Jansen JG, Langerak P, Tsaalbi-Shtylik A, van den Berk P, Jacobs H, de Wind N. Strand-biased defect in C/G transversions in hypermutating immunoglobulin genes in Rev1-deficient mice. *J Exp Med* [Internet]. 2006 Feb 20;203(2):319–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16476771>
246. Ross A-L, Sale JE. The catalytic activity of REV1 is employed during immunoglobulin gene diversification in DT40. *Mol Immunol* [Internet]. 2006 Apr;43(10):1587–94. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16263170>
247. Sale JE, Lehmann AR, Woodgate R. Y-family DNA polymerases and their role in tolerance of cellular DNA damage. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2012 Feb 23;13(3):141–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22358330>
248. Sasatani M, Zaharieva EK, Kamiya K. The in vivo role of Rev1 in mutagenesis and carcinogenesis. *Genes Environ Off J Japanese Environ Mutagen Soc* [Internet]. 2020;42:9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32161626>
249. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer Res* [Internet]. 1996 Oct 15;56(20):4620–4. Available from:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8840974>
250. Duensing S, Lee LY, Duensing A, Basile J, Piboonniyom S, Gonzalez S, et al. The human papillomavirus type 16 E6 and E7 oncoproteins cooperate to induce mitotic defects and genomic instability by uncoupling centrosome duplication from the cell division cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2000 Aug 29;97(18):10002–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10944189>
 251. Walboomers JM, Jacobs M V, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah K V, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* [Internet]. 1999 Sep;189(1):12–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10451482>
 252. Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Jan 18;102(3):802–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647370>
 253. Bodelon C, Untereiner ME, Machiela MJ, Vinokurova S, Wentzensen N. Genomic characterization of viral integration sites in HPV-related cancers. *Int J cancer* [Internet]. 2016;139(9):2001–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27343048>
 254. Cancer Genome Atlas Research Network, Albert Einstein College of Medicine, Analytical Biological Services, Barretos Cancer Hospital, Baylor College of Medicine, Beckman Research Institute of City of Hope, et al. Integrated genomic and molecular characterization of cervical cancer. *Nature* [Internet]. 2017;543(7645):378–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28112728>
 255. Bogerd HP, Wiegand HL, Doehle BP, Lueders KK, Cullen BR. APOBEC3A and APOBEC3B are potent inhibitors of LTR-retrotransposon function in human cells. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2006;34(1):89–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16407327>
 256. Muckenfuss H, Hamdorf M, Held U, Perković M, Löwer J, Cichutek K, et al. APOBEC3 proteins inhibit human LINE-1 retrotransposition. *J Biol Chem* [Internet]. 2006 Aug 4;281(31):22161–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735504>
 257. Warren CJ, Van Doorslaer K, Pandey A, Espinosa JM, Pyeon D. Role of the host restriction factor APOBEC3 on papillomavirus evolution. *Virus Evol* [Internet]. 2015 Jan;1(1). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27570633>

258. Long J, Delahanty RJ, Li G, Gao Y-T, Lu W, Cai Q, et al. A common deletion in the APOBEC3 genes and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2013 Apr 17;105(8):573–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23411593>
259. Qi G, Xiong H, Zhou C. APOBEC3 deletion polymorphism is associated with epithelial ovarian cancer risk among Chinese women. *Tumour Biol* [Internet]. 2014 Jun;35(6):5723–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24577894>
260. Nik-Zainal S, Wedge DC, Alexandrov LB, Petljak M, Butler AP, Bolli N, et al. Association of a germline copy number polymorphism of APOBEC3A and APOBEC3B with burden of putative APOBEC-dependent mutations in breast cancer. *Nat Genet* [Internet]. 2014 May;46(5):487–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24728294>
261. Samuels Y, Ericson K. Oncogenic PI3K and its role in cancer. *Curr Opin Oncol* [Internet]. 2006 Jan;18(1):77–82. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16357568>
262. Zhang Y, Koneva LA, Virani S, Arthur AE, Virani A, Hall PB, 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* [Internet]. 2016 Sep 15;22(18):4735–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27091409>
263. Vieira VC, Leonard B, White EA, Starrett GJ, Temiz NA, Lorenz LD, et al. Human papillomavirus E6 triggers upregulation of the antiviral and cancer genomic DNA deaminase APOBEC3B. *MBio* [Internet]. 2014 Dec 23;5(6). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25538195>
264. Warren CJ, Xu T, Guo K, Griffin LM, Westrich JA, Lee D, et al. APOBEC3A functions as a restriction factor of human papillomavirus. *J Virol* [Internet]. 2015 Jan;89(1):688–702. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25355878>
265. Vartanian J-P, Guétard D, Henry M, Wain-Hobson S. Evidence for editing of human papillomavirus DNA by APOBEC3 in benign and precancerous lesions. *Science* [Internet]. 2008 Apr 11;320(5873):230–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18403710>
266. Cannataro VL, Gaffney SG, Sasaki T, Issaeva N, Grewal NKS, Grandis JR, et al.

- APOBEC-induced mutations and their cancer effect size in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncogene* [Internet]. 2019;38(18):3475–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41388-018-0657-6>
267. Faden DL, Thomas S, Cantalupo PG, Agrawal N, Myers J, DeRisi J. Multi-modality analysis supports APOBEC as a major source of mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. 2017;74:8–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29103756>
268. Kondo S, Wakae K, Wakisaka N, Nakanishi Y, Ishikawa K, Komori T, et al. APOBEC3A associates with human papillomavirus genome integration in oropharyngeal cancers. *Oncogene* [Internet]. 2017;36(12):1687–97. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27694899>
269. Refsland EW, Stenglein MD, Shindo K, Albin JS, Brown WL, Harris RS. Quantitative profiling of the full APOBEC3 mRNA repertoire in lymphocytes and tissues: implications for HIV-1 restriction. *Nucleic Acids Res* [Internet]. 2010 Jul;38(13):4274–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20308164>
270. Peng G, Greenwell-Wild T, Nares S, Jin W, Lei KJ, Rangel ZG, et al. Myeloid differentiation and susceptibility to HIV-1 are linked to APOBEC3 expression. *Blood* [Internet]. 2007 Jul 1;110(1):393–400. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17371941>
271. Stopak KS, Chiu Y-L, Kropp J, Grant RM, Greene WC. Distinct patterns of cytokine regulation of APOBEC3G expression and activity in primary lymphocytes, macrophages, and dendritic cells. *J Biol Chem* [Internet]. 2007 Feb 9;282(6):3539–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17110377>
272. Vile RG, Melcher A, Pandha H, Harrington KJ, Pulido JS. APOBEC and Cancer Viroimmunotherapy: Thinking the Unthinkable. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2021 Feb 8; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33558423>
273. Faden DL, Ding F, Lin Y, Zhai S, Kuo F, Chan TA, et al. APOBEC mutagenesis is tightly linked to the immune landscape and immunotherapy biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. 2019;96:140–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31422205>
274. Wang F-X, Huang J, Zhang H, Ma X, Zhang H. APOBEC3G upregulation by alpha

- interferon restricts human immunodeficiency virus type 1 infection in human peripheral plasmacytoid dendritic cells. *J Gen Virol* [Internet]. 2008 Mar;89(Pt 3):722–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18272764>
275. Maruyama W, Shirakawa K, Matsui H, Matsumoto T, Yamazaki H, Sarca AD, et al. Classical NF- κ B pathway is responsible for APOBEC3B expression in cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2016;478(3):1466–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27577680>
276. Kanu N, Cerone MA, Goh G, Zalmas L-P, Bartkova J, Dietzen M, et al. DNA replication stress mediates APOBEC3 family mutagenesis in breast cancer. *Genome Biol* [Internet]. 2016;17(1):185. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27634334>
277. Chen Z, Wen W, Bao J, Kuhs KL, Cai Q, Long J, et al. Integrative genomic analyses of APOBEC-mutational signature, expression and germline deletion of APOBEC3 genes, and immunogenicity in multiple cancer types. *BMC Med Genomics* [Internet]. 2019;12(1):131. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31533728>
278. Wang S, Jia M, He Z, Liu X-S. APOBEC3B and APOBEC mutational signature as potential predictive markers for immunotherapy response in non-small cell lung cancer. *Oncogene* [Internet]. 2018;37(29):3924–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29695832>
279. Smid M, Rodríguez-González FG, Sieuwerts AM, Salgado R, Prager-Van der Smissen WJC, Vlugt-Daane M van der, et al. Breast cancer genome and transcriptome integration implicates specific mutational signatures with immune cell infiltration. *Nat Commun* [Internet]. 2016 Sep 26;7:12910. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27666519>
280. Rizvi NA, Hellmann MD, Snyder A, Kvistborg P, Makarov V, Havel JJ, et al. Cancer immunology. Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* [Internet]. 2015 Apr 3;348(6230):124–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25765070>
281. Schumacher TN, Schreiber RD. Neoantigens in cancer immunotherapy. *Science* [Internet]. 2015 Apr 3;348(6230):69–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25838375>
282. Yarchoan M, Johnson BA, Lutz ER, Laheru DA, Jaffee EM. Targeting neoantigens to

- augment antitumour immunity. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2017;17(4):209–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28233802>
283. Mullane SA, Werner L, Rosenberg J, Signoretti S, Callea M, Choueiri TK, et al. Correlation of Apobec Mrna Expression with overall Survival and pd-11 Expression in Urothelial Carcinoma. *Sci Rep* [Internet]. 2016;6:27702. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27283319>
284. Boichard A, Tsigelny IF, Kurzrock R. High expression of PD-1 ligands is associated with kataegis mutational signature and APOBEC3 alterations. *Oncoimmunology* [Internet]. 2017;6(3):e1284719. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28405512>
285. Chen H, Chong W, Teng C, Yao Y, Wang X, Li X. The immune response-related mutational signatures and driver genes in non-small-cell lung cancer. *Cancer Sci* [Internet]. 2019 Aug;110(8):2348–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31222843>
286. Liu Q, Luo Y-W, Cao R-Y, Pan X, Chen X-J, Zhang S-Y, et al. Association between APOBEC3H-Mediated Demethylation and Immune Landscape in Head and Neck Squamous Carcinoma. *Biomed Res Int* [Internet]. 2020;2020:4612375. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32775421>
287. Smith-Garvin JE, Koretzky GA, Jordan MS. T cell activation. *Annu Rev Immunol* [Internet]. 2009;27:591–619. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19132916>
288. Lanier LL, Serafini AT, Ruitenberg JJ, Cwirla S, Federspiel NA, Phillips JH, et al. The gamma T-cell antigen receptor. *J Clin Immunol* [Internet]. 1987 Nov;7(6):429–40. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3320076>
289. Freeman JD, Warren RL, Webb JR, Nelson BH, Holt RA. Profiling the T-cell receptor beta-chain repertoire by massively parallel sequencing. *Genome Res* [Internet]. 2009 Oct;19(10):1817–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19541912>
290. Li B, Li T, Pignon J-C, Wang B, Wang J, Shukla SA, et al. Landscape of tumor-infiltrating T cell repertoire of human cancers. *Nat Genet* [Internet]. 2016;48(7):725–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27240091>
291. Bolotin DA, Poslavsky S, Davydov AN, Frenkel FE, Fanchi L, Zolotareva OI, et al.

- Antigen receptor repertoire profiling from RNA-seq data. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2017;35(10):908–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29020005>
292. Zhang W, Wang L, Liu K, Wei X, Yang K, Du W, et al. PIRD: Pan Immune Repertoire Database. *Bioinformatics* [Internet]. 2020;36(3):897–903. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31373607>
293. Tickotsky N, Sagiv T, Prilusky J, Shifrut E, Friedman N. McPAS-TCR: a manually curated catalogue of pathology-associated T cell receptor sequences. *Bioinformatics* [Internet]. 2017 Sep 15;33(18):2924–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28481982>



DISSERTATION COPYRIGHT PERMISSION FORM

Title(s) of the Image(s): Terese Winslow LLC owns the copyright to the following image(s):

Title(s) of illustration(s): Head and Neck Cancer Regions; Parts of the Oropharynx.

Description of the Work: Terese Winslow LLC hereby grants permission to reproduce the above image(s) for use in the work specified:

Dissertation title: Immunological, transcriptional and mutational panorama of the tumor microenvironment in oropharyngeal squamous cell carcinoma associated or not with HPV infection

University: Postgraduate Program of the A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo-SP, Brazil.

Digital object identifier (DOI), if available:

DOI is a unique alphanumeric string assigned by a registration agency (the International DOI Foundation) to identify content and provide a persistent link to its location on the Internet. The publisher assigns a DOI when your article is published and made available electronically.

License Granted: Terese Winslow LLC hereby grants limited, non-exclusive worldwide print and electronic rights only for use in the Work specified. Terese Winslow LLC grants such rights “AS IS” without representation or warranty of any kind and shall have no liability in connection with such license.

Restrictions: Reproduction for use in any other work, derivative works, or by any third party by manual or electronic methods is prohibited. Ownership of original artwork, copyright, and all rights not specifically transferred herein remain the exclusive property of Terese Winslow LLC. Additional license(s) are required for ancillary usage(s).

Credit must be placed adjacent to the image(s) as follows:

~~For the National Cancer Institute~~ © (copyright year) Terese Winslow LLC, U.S. Govt. has certain rights

Permission granted to:

Name: Natalia Silva Alves

Mailing address: Rua Taguá, 440, Liberdade, São Paulo-SP, Brazil.

Email address: [REDACTED]

Phone number: [REDACTED]

Signature _____

Natalia Silva Alves

Natalia Silva Alves

Date 17/05/2021

Signature _____

Terese Winslow

Terese Winslow, CMI, Member

Digitally signed by TERESE WINSLOW

Date: 2021.05.18 09:47:24 -05'00'

Date _____

Terese Winslow LLC, Medical Illustration

714 South Fairfax Street, Alexandria, Virginia 22314

(703) 836-9121

terese@teresewinslow.com

www.teresewinslow.com

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Jun 28, 2021

This Agreement between AC Camargo Cancer Center -- Natalia Silva Alves ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number 5097790301236

License date Jun 28, 2021

Licensed Content
Publisher Elsevier

Licensed Content
Publication Cell Chemical Biology

Licensed Content Title APOBEC Enzymes as Targets for Virus and Cancer Therapy

Licensed Content Author Margaret E. Olson, Reuben S. Harris, Daniel A. Harki

Licensed Content Date Jan 18, 2018

Licensed Content Volume 25

Licensed Content Issue 1

Licensed Content Pages 14

Start Page 36

End Page 49

Type of Use reuse in a thesis/dissertation

Portion figures/tables/illustrations

Number of figures/tables/illustrations 1

Format electronic

Are you the author of this Elsevier article? No

Will you be translating? No

Title Immunological, transcriptional and mutational panorama of the tumor microenvironment in oropharyngeal squamous cell carcinoma associated or not with HPV infection

Institution name AC Camargo Cancer Center Graduation Program

Expected presentation date Jul 2021

Portions Figure 2

AC Camargo Cancer Center
Rua Taguá, 440

Requestor Location
São Paulo, 01508-010
Brazil
Attn: AC Camargo Cancer Center

Publisher Tax ID GB 494 6272 12

Total 0.00 USD

Terms and Conditions

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com> . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. For book authors the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the

work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.10

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.



APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **10/12/2019**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **19/11/2019**, **aprovaram** a realização do projeto n.º. **2811/19** intitulado: **“A influência dos subtipos do vírus do papiloma humano no perfil imunológico e subsequente impacto clínico em pacientes com carcinoma orofaríngeo de células escamosas.”**

Pesquisador Responsável: Kenneth John Gollob
Aluna: Natalia Silva Alves (Mestrado)

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

Nota: Para iniciar o projeto, é necessário aguardar a aprovação da CONEP.

São Paulo, 13 de dezembro de 2019.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Caíres Serrano
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa



DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: A influência dos subtipos do vírus do papiloma humano no perfil imunológico e subsequente impacto clínico em pacientes com carcinoma orofaríngeo de células escamosas

Pesquisador Responsável: Kenneth John Gollob

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;)

Versão: 4

CAAE: 24996419.8.0000.5432

Submetido em: 06/03/2020


Instituição Proponente: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

Situação da Versão do Projeto: Aprovado

Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável

Patrocinador Principal: CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLOGICO-CNPQ
FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO



Comprovante de Recepção:  PB_COMPROVANTE_RECEPCAO_1455529

+ DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

+ LISTA DE APRECIÇÕES DO PROJETO

+ HISTÓRICO DE TRÂMITES

LEGENDA:**(*) Apreciação**

PO = Projeto Original de Centro Coordenador

POp = Projeto Original de Centro Participante

POc = Projeto Original de Centro Coparticipante

E = Emenda de Centro Coordenador

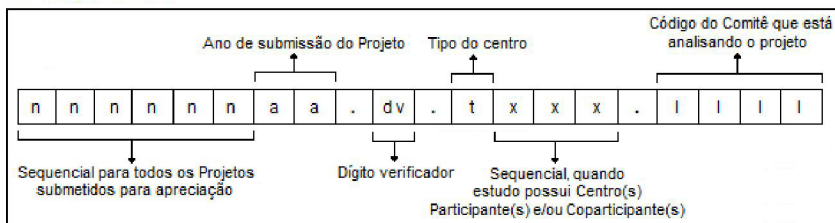
Ep = Emenda de Centro Participante

Ec = Emenda de Centro Coparticipante

N = Notificação de Centro Coordenador

Np = Notificação de Centro Participante

Nc = Notificação de Centro Coparticipante

(*) Formação do CAAE
[Voltar](#)

Suporte a sistemas: 136 - opção 8 e opção 3, solicitar ao atendente suporte Plataforma Brasil.
Fale conosco: Clique para enviar mensagem para a Plataforma Brasil



Apêndice 1 – Matriz com os valores quantificados da similaridade entre as assinaturas mutacionais extraídas *de novo* e as assinaturas mutacionais presentes no catálogo COSMIC (v2)

	MutationalPatterns.S1	MutationalPatterns.S2	SomaticSignatures.S1	SomaticSignatures.S2	SomaticSignatures.S3	signer.S1	signer.S2	signer.S3	SigProfiler.SA
MutationalPatterns.S1	1	0,296654188	0,740588487	0,591699567	0,059673007	0,869189795	0,216893181	0,105320045	0,990926811
MutationalPatterns.S2	0,296654188	1	0,58025691	0,510471361	0,101763813	0,401893728	0,84105244	0,482459371	0,353688669
SomaticSignatures.S1	0,740588487	0,58025691	1	4,44089E-16	4,44089E-16	0,745139842	0,655263827	0,01202587	0,7314111
SomaticSignatures.S2	0,591699567	0,510471361	4,44089E-16	1	0	0,374838326	0,610248033	0,031086836	0,571235192
SomaticSignatures.S3	0,059673007	0,101763813	4,44089E-16	0	1	0,084118987	0,210806943	0,345864835	0,017056409
signer.S1	0,869189795	0,401893728	0,745139842	0,374838326	0,084118987	1	0,409722277	0,095302155	0,863232918
signer.S2	0,216893181	0,84105244	0,655263827	0,610248033	0,210806943	0,409722277	1	0,097808695	0,22848465
signer.S3	0,105320045	0,482459371	0,01202587	0,031086836	0,345864835	0,095302155	0,097808695	1	0,216251764
SigProfiler.SA	0,990926811	0,353688669	0,7314111	0,571235192	0,017056409	0,863232918	0,22848465	0,216251764	1
SigProfiler.SB	0,299578907	0,968954321	0,643527868	0,557866939	0,017846864	0,420964639	0,907734686	0,278002874	0,326307826
COSMIC.S1	0,244808364	0,910071153	0,63548515	0,593591374	0,131376301	0,353546367	0,956316792	0,19663348	0,266402409
COSMIC.S2	0,871650214	0,189714888	0,623094999	0,548195218	0,140666167	0,703793746	0,095144771	0,05578103	0,85100643
COSMIC.S3	0,345819432	0,46826662	0,011174817	0,160322963	0,132750555	0,259689772	0,118587275	0,469001199	0,393652063
COSMIC.S4	0,132243174	0,470578731	0,036478377	0,02727426	0,224851939	0,103419763	0,094593861	0,599668189	0,213737534
COSMIC.S5	0,247541941	0,648459213	0,111400102	0,108190519	0,21093176	0,220048319	0,303943223	0,482238129	0,284835169
COSMIC.S6	0,16625725	0,853782435	0,502374635	0,554642031	0,082000218	0,23031248	0,750288385	0,27576475	0,207513964
COSMIC.S7	0,513826417	0,363387467	0,470387256	0,142338821	0,264789485	0,516767057	0,20933664	0,113533068	0,517877773
COSMIC.S8	0,17538396	0,545188523	0,01102808	0,069387661	0,097281487	0,152238271	0,233101824	0,500898139	0,23510248
COSMIC.S9	0,132486948	0,403031226	0,066845944	0,034866941	0,029137592	0,116794585	0,172230135	0,328610324	0,16019408
COSMIC.S10	0,225744586	0,372306066	0,277397396	0,062816725	0,055783208	0,43930784	0,333791471	0,166057566	0,24745585
COSMIC.S11	0,298144804	0,370634448	0,287283916	0,003447256	0,329423287	0,229605827	0,14389272	0,147562916	0,313091084
COSMIC.S12	0,121645	0,374889298	0,035533133	0,024806402	0,113798761	0,095983128	0,098398874	0,359099916	0,1480942
COSMIC.S13	0,752676642	0,089373068	0,454823398	0,609586737	0,070237161	0,558064031	0,023231846	0,094449589	0,756298611
COSMIC.S14	0,16654177	0,653543036	0,314120628	0,313097802	0,211735763	0,154832191	0,445950368	0,324120539	0,216448908
COSMIC.S15	0,139055513	0,61580372	0,331554856	0,354597521	0,185696042	0,142637316	0,474159474	0,185310459	0,165367345
COSMIC.S16	0,256921671	0,460937362	0,042938935	0,071109281	0,271005642	0,201295075	0,117070492	0,485921495	0,289283594
COSMIC.S17	0,097081952	0,185487941	0,002834008	0,00150058	0,031571834	0,100310195	0,095002884	0,102692401	0,101756216
COSMIC.S18	0,143103052	0,393311852	0,069880048	0,043352991	0,153965181	0,135584935	0,12870752	0,432786723	0,198022528
COSMIC.S19	0,238024041	0,576555821	0,295588111	0,160834688	0,245139482	0,198124152	0,324236925	0,2821681	0,270303338
COSMIC.S20	0,142715386	0,589647357	0,182559082	0,221112837	0,164551769	0,167306719	0,321301246	0,425791518	0,203863987
COSMIC.S21	0,072836361	0,342386622	0,035959916	0,127998003	0,035366803	0,086549929	0,200848327	0,225883614	0,090946885
COSMIC.S22	0,019561025	0,136417562	0,115319909	0,007239547	0,010618466	0,018789737	0,039933354	0,138361245	0,027940196
COSMIC.S23	0,122646067	0,345190334	0,165951982	0,102107102	0,279952671	0,090768581	0,134325073	0,146493848	0,141372691
COSMIC.S24	0,207349824	0,40607465	0,058366316	0,026884066	0,186203894	0,173175629	0,105010188	0,530466914	0,264808947
COSMIC.S25	0,241745475	0,504905499	0,068613437	0,02789267	0,063139953	0,232908681	0,265930565	0,374165326	0,274778696
COSMIC.S26	0,133931829	0,435267374	0,075122986	0,109775461	0,098093763	0,132480059	0,23415059	0,318667806	0,155745545
COSMIC.S27	0,068130689	0,12130059	0,028463174	0,003855776	0,009996698	0,058963432	0,05661543	0,097763723	0,071990626
COSMIC.S28	0,038918006	0,118357886	0,105923897	0,016487875	0,115229975	0,032864707	0,041308376	0,076642209	0,045309252
COSMIC.S29	0,145076313	0,532029891	0,117317077	0,147944165	0,13057929	0,154668215	0,278573116	0,490656755	0,20239232
COSMIC.S30	0,49014754	0,482139215	0,405933281	0,06858122	0,147441149	0,407314293	0,257260999	0,182978202	0,493760192

SigProfiler.SB	COSMIC.S1	COSMIC.S2	COSMIC.S3	COSMIC.S4	COSMIC.S5	COSMIC.S6	COSMIC.S7	COSMIC.S8	COSMIC.S9	COSMIC.S10	COSMIC.S11	COSMIC.S12
0,299578907	0,244808364	0,871650214	0,345819432	0,132243174	0,247541941	0,16625725	0,513826417	0,17538396	0,132486948	0,225744586	0,298144804	0,121645
0,968954321	0,910071153	0,189714888	0,46826662	0,470578731	0,648459213	0,853782435	0,363387467	0,545188523	0,403031226	0,372306066	0,370634448	0,374889298
0,643527868	0,63548515	0,623094999	0,011174817	0,036478377	0,111400102	0,502374635	0,470387256	0,01102808	0,066845944	0,277397396	0,287283916	0,035533133
0,557866939	0,593591374	0,548195218	0,160322963	0,02727426	0,108190519	0,554642031	0,142338821	0,069387661	0,034866941	0,062816725	0,003447256	0,024806402
0,017846864	0,131376301	0,140666167	0,132750555	0,224851939	0,21093176	0,082000218	0,264789485	0,097281487	0,029137592	0,055783208	0,329423287	0,113798761
0,420964639	0,353546367	0,703793746	0,259689772	0,103419763	0,220048319	0,23031248	0,516767057	0,152238271	0,116794585	0,43930784	0,229605827	0,095983128
0,907734686	0,956316792	0,095144771	0,118587275	0,094593861	0,303943223	0,750288385	0,20933664	0,233101824	0,172230135	0,333791471	0,14389272	0,098398874
0,278002874	0,19663348	0,05578103	0,469001199	0,599668189	0,482238129	0,27576475	0,113533068	0,500898139	0,328610324	0,166057566	0,147562916	0,359099916
0,326307826	0,266402409	0,85100643	0,393652063	0,213737534	0,284835169	0,207513964	0,517877773	0,23510248	0,16019408	0,24745585	0,313091084	0,1480942
1	0,953757186	0,202019153	0,373609907	0,320786152	0,590852723	0,854443689	0,363623903	0,443175319	0,354867386	0,359652468	0,355730544	0,323445517
0,953757186	1	0,14060868	0,273387248	0,230953603	0,487566579	0,841228713	0,258265014	0,377952941	0,295118641	0,316938612	0,271762911	0,235202653
0,202019153	0,14060868	1	0,199076987	0,084446066	0,199546067	0,075669142	0,547582807	0,13232042	0,100762885	0,141607458	0,333353231	0,123236067
0,373609907	0,273387248	0,199076987	1	0,6839968	0,820811825	0,30013918	0,244001115	0,798987487	0,610314216	0,221625248	0,306227127	0,542085607
0,320786152	0,230953603	0,084446066	0,6839968	1	0,583275333	0,284417375	0,15305665	0,80461141	0,38756693	0,265095272	0,204400974	0,337640192
0,590852723	0,487566579	0,199546067	0,820811825	0,583275333	1	0,513856155	0,362059652	0,743297901	0,725649463	0,288388104	0,453689501	0,790125073
0,854443689	0,841228713	0,075669142	0,30013918	0,284417375	0,513856155	1	0,163672105	0,347911017	0,291463757	0,223549012	0,315424766	0,278400886
0,363623903	0,258265014	0,547582807	0,244001115	0,15305665	0,362059652	0,163672105	1	0,145408888	0,151373193	0,230646648	0,764027727	0,177945848
0,443175319	0,377952941	0,13232042	0,798987487	0,80461141	0,743297901	0,347911017	0,145408888	1	0,596834223	0,348871849	0,193976219	0,46184976
0,354867386	0,295118641	0,100762885	0,610314216	0,38756693	0,725649463	0,291463757	0,151373193	0,596834223	1	0,358002132	0,177992237	0,563481778
0,359652468	0,316938612	0,141607458	0,221625248	0,265095272	0,288388104	0,223549012	0,230646648	0,348871849	0,358002132	1	0,109972054	0,110785924
0,355730544	0,271762911	0,333353231	0,306227127	0,204400974	0,453689501	0,315424766	0,764027727	0,193976219	0,177992237	0,109972054	1	0,199315809
0,323445517	0,235202653	0,123236067	0,542085607	0,337640192	0,790125073	0,278400886	0,177945848	0,46184976	0,563481778	0,110785924	0,199315809	1
0,063289444	0,05644359	0,396067	0,3761168	0,109156877	0,135674243	0,026241505	0,129333231	0,124297295	0,090590629	0,06301428	0,069496407	0,05858207
0,605704992	0,569361692	0,126279956	0,394330101	0,451842016	0,516949993	0,793441799	0,22953091	0,487293451	0,309488043	0,323210103	0,413569353	0,239345264
0,620810862	0,564164636	0,078318224	0,277674832	0,228147638	0,460727991	0,826657083	0,150901711	0,285491617	0,263170709	0,182310325	0,360741178	0,276578408
0,389931551	0,273938975	0,227531826	0,730397772	0,500690902	0,903713559	0,279106558	0,259554804	0,656976777	0,708828198	0,21380621	0,28645112	0,818701251
0,177189668	0,131875285	0,096004916	0,277927792	0,100187848	0,32654085	0,138148491	0,12721514	0,202553065	0,579615528	0,143443786	0,096833262	0,253768286
0,293983151	0,224334127	0,106309739	0,457547208	0,735988961	0,419593991	0,20749874	0,103896309	0,671524737	0,36120903	0,488459271	0,087930808	0,195488366
0,545732408	0,485095985	0,219001918	0,47562073	0,37553247	0,649805595	0,560528174	0,507219791	0,412085735	0,329088871	0,152538582	0,741044892	0,375804502
0,505269336	0,459706526	0,10734325	0,46060084	0,45965455	0,637792051	0,698571186	0,195218279	0,447404869	0,368968146	0,197011339	0,357106787	0,521326586
0,323381096	0,29622869	0,05510441	0,30383605	0,15006251	0,540362657	0,322133899	0,112489954	0,252720022	0,345866453	0,106104915	0,160184274	0,776174434
0,11879936	0,069287668	0,014288711	0,293712381	0,320945421	0,28415767	0,054955221	0,036270034	0,375618117	0,203253016	0,023534542	0,038639214	0,139542012
0,329173151	0,274784236	0,119403368	0,279639946	0,217450961	0,441005645	0,40217742	0,471333519	0,170455688	0,164188235	0,066429262	0,832294372	0,203498754
0,296424436	0,207237657	0,170014251	0,534681615	0,827398882	0,451035308	0,256978001	0,134365276	0,610987457	0,29674154	0,208101713	0,140791343	0,23195987
0,452926555	0,381529992	0,170563597	0,688983595	0,571884873	0,740604742	0,358044175	0,196577068	0,726070832	0,555846009	0,278872796	0,226818243	0,539847034
0,405902253	0,343392714	0,101689521	0,44204738	0,231142524	0,721955356	0,399968953	0,144227409	0,37403194	0,484718405	0,133162332	0,185181123	0,912302816
0,116866952	0,089394525	0,067466058	0,196089392	0,153681093	0,202799735	0,087624932	0,068861413	0,232488436	0,157685819	0,043440185	0,081613511	0,100747411
0,104039457	0,08033489	0,038712059	0,287940202	0,073005486	0,306057655	0,108094157	0,046628401	0,186124028	0,645687305	0,187621229	0,039459117	0,237553057
0,439521138	0,379112246	0,115581719	0,5376472	0,817904336	0,520471263	0,36130881	0,099189331	0,745112168	0,382590268	0,298945106	0,116288831	0,301546608
0,483210232	0,413293069	0,554526731	0,423466297	0,272474808	0,585591624	0,429015949	0,76150466	0,294943838	0,300387386	0,132528423	0,814302734	0,303225408

COSMIC.S13	COSMIC.S14	COSMIC.S15	COSMIC.S16	COSMIC.S17	COSMIC.S18	COSMIC.S19	COSMIC.S20	COSMIC.S21	COSMIC.S22	COSMIC.S23	COSMIC.S24	COSMIC.S25
0,752676642	0,16654177	0,139055513	0,256921671	0,097081952	0,143103052	0,238024041	0,142715386	0,072836361	0,019561025	0,122646067	0,207349824	0,241745475
0,089373068	0,653543036	0,61580372	0,460937362	0,185487941	0,393311852	0,576555821	0,589647357	0,342386622	0,136417562	0,345190334	0,40607465	0,504905499
0,454823398	0,314120628	0,331554856	0,042938935	0,002834008	0,069880048	0,295588111	0,182559082	0,035959916	0,115319909	0,165951982	0,058366316	0,068613437
0,609586737	0,313097802	0,354597521	0,071109281	0,00150058	0,043352991	0,160834688	0,221112837	0,127998003	0,007239547	0,102107102	0,026884066	0,02789267
0,070237161	0,211735763	0,185696042	0,271005642	0,031571834	0,153965181	0,245139482	0,164551769	0,035366803	0,010618466	0,279952671	0,186203894	0,063139953
0,558064031	0,154832191	0,142637316	0,201295075	0,100310195	0,135584935	0,198124152	0,167306719	0,086549929	0,018789737	0,090768581	0,173175629	0,232908681
0,023231846	0,445950368	0,474159474	0,117070492	0,095002884	0,12870752	0,324236925	0,321301246	0,200848327	0,039933354	0,134325073	0,105010188	0,265930565
0,094449589	0,324120539	0,185310459	0,485921495	0,102692401	0,432786723	0,2821681	0,425791518	0,225883614	0,138361245	0,146493848	0,530466914	0,374165326
0,756298611	0,216448908	0,165367345	0,289283594	0,101756216	0,198022528	0,270303338	0,203863987	0,090946885	0,027940196	0,141372691	0,264808947	0,274778696
0,063289444	0,605704992	0,620810862	0,389931551	0,177189668	0,293983151	0,545732408	0,505269336	0,323381096	0,11879936	0,329173151	0,296424436	0,452926555
0,05644359	0,569361692	0,564164636	0,273938975	0,131875285	0,224334127	0,485095985	0,459706526	0,29622869	0,069287668	0,274784236	0,207237657	0,381529992
0,396067	0,126279956	0,078318224	0,227531826	0,096004916	0,106309739	0,219001918	0,10734325	0,05510441	0,014288711	0,119403368	0,170014251	0,170563597
0,3761168	0,394330101	0,277674832	0,730397772	0,277927792	0,457547208	0,47562073	0,46060084	0,30383605	0,293712381	0,279639946	0,534681615	0,688983595
0,109156877	0,451842016	0,228147638	0,500690902	0,100187848	0,735988961	0,37553247	0,45965455	0,15006251	0,320945421	0,217450961	0,827398882	0,571884873
0,135674243	0,516949993	0,460727991	0,903713559	0,32654085	0,419593991	0,649805595	0,637792051	0,540362657	0,28415767	0,441005645	0,451035308	0,740604742
0,026241505	0,793441799	0,826657083	0,279106558	0,138148491	0,20749874	0,560528174	0,698571186	0,322133899	0,054955221	0,40217742	0,256978001	0,358044175
0,129333231	0,22953091	0,150901711	0,259554804	0,12721514	0,103896309	0,507219791	0,195218279	0,112489954	0,036270034	0,471333519	0,134365276	0,196577068
0,124297295	0,487293451	0,285491617	0,656976777	0,202553065	0,671524737	0,412085735	0,447404869	0,252720022	0,375618117	0,170455688	0,610987457	0,726070832
0,090590629	0,309488043	0,263170709	0,708828198	0,579615528	0,36120903	0,329088871	0,368968146	0,345866453	0,203253016	0,164188235	0,29674154	0,555846009
0,06301428	0,323210103	0,182310325	0,21380621	0,143443786	0,488459271	0,152538582	0,197011339	0,106104915	0,023534542	0,066429262	0,208101713	0,278872796
0,069496407	0,413569353	0,360741178	0,28645112	0,096833262	0,087930808	0,741044892	0,357106787	0,160184274	0,038639214	0,832294372	0,140791343	0,226818243
0,05858207	0,239345264	0,276578408	0,818701251	0,253768286	0,195488366	0,375804502	0,521326586	0,776174434	0,139542012	0,203498754	0,23195987	0,539847034
1	0,043675089	0,040392862	0,184239126	0,031660802	0,100593067	0,094601094	0,034827	0,018684462	0,009302386	0,030227837	0,143458388	0,185464211
0,043675089	1	0,744852038	0,302020036	0,111684282	0,410196134	0,559692269	0,707727238	0,245635268	0,047694076	0,430098386	0,401812518	0,362802634
0,040392862	0,744852038	1	0,270021443	0,103785329	0,196288447	0,547405157	0,473987382	0,336912444	0,056815297	0,475239031	0,280694346	0,291565433
0,184239126	0,302020036	0,270021443	1	0,350979715	0,336971389	0,47371668	0,494670807	0,483674176	0,259627913	0,26417934	0,37756686	0,65741268
0,031660802	0,111684282	0,103785329	0,350979715	1	0,075538868	0,126664339	0,156391	0,125506281	0,064714628	0,062291154	0,071320066	0,236929913
0,100593067	0,410196134	0,196288447	0,336971389	0,075538868	1	0,199558531	0,274692518	0,078755179	0,076108866	0,068938758	0,700830598	0,374690921
0,094601094	0,559692269	0,547405157	0,47371668	0,126664339	0,199558531	1	0,550620397	0,271256218	0,100418931	0,890512594	0,267862292	0,399219031
0,034827	0,707727238	0,473987382	0,494670807	0,156391	0,274692518	0,550620397	1	0,362332391	0,072543351	0,422022168	0,304032047	0,435490999
0,018684462	0,245635268	0,336912444	0,483674176	0,125506281	0,078755179	0,271256218	0,362332391	1	0,075415011	0,174526488	0,106834577	0,386606341
0,009302386	0,047694076	0,056815297	0,259627913	0,064714628	0,076108866	0,100418931	0,072543351	0,075415011	1	0,040190623	0,101653471	0,725637134
0,030227837	0,430098386	0,475239031	0,26417934	0,062291154	0,068938758	0,890512594	0,422022168	0,174526488	0,040190623	1	0,135357882	0,212412148
0,143458388	0,401812518	0,280694346	0,37756686	0,071320066	0,700830598	0,267862292	0,304032047	0,106834577	0,101653471	0,135357882	1	0,348730628
0,185464211	0,362802634	0,291565433	0,65741268	0,236929913	0,374690921	0,399219031	0,435490999	0,386606341	0,725637134	0,212412148	0,348730628	1
0,076348648	0,327896622	0,397038871	0,723058614	0,202010933	0,128139657	0,337125821	0,52593267	0,885635587	0,098366421	0,176117813	0,15244283	0,491363614
0,032000826	0,088244499	0,092976601	0,156802722	0,032876046	0,083064367	0,12463631	0,088310904	0,066075991	0,424777249	0,082117511	0,104076583	0,39847845
0,016361564	0,073679272	0,079070428	0,330687619	0,622195188	0,049309547	0,076238662	0,140939539	0,113343602	0,074813993	0,027038221	0,042765499	0,215703245
0,066822385	0,491393559	0,28898848	0,426291366	0,094226855	0,812202538	0,277682687	0,393084353	0,187356334	0,078426449	0,102429204	0,849933852	0,416699757
0,139776023	0,457388686	0,398082997	0,40261689	0,185315108	0,159132847	0,693139314	0,438625233	0,224099831	0,125588614	0,672676945	0,25021506	0,392094433

COSMIC.S26	COSMIC.S27	COSMIC.S28	COSMIC.S29	COSMIC.S30
0,133931829	0,068130689	0,038918006	0,145076313	0,49014754
0,435267374	0,12130059	0,118357886	0,532029891	0,482139215
0,075122986	0,028463174	0,105923897	0,117317077	0,405933281
0,109775461	0,003855776	0,016487875	0,147944165	0,06858122
0,098093763	0,009996698	0,115229975	0,13057929	0,147441149
0,132480059	0,058963432	0,032864707	0,154668215	0,407314293
0,23415059	0,05661543	0,041308376	0,278573116	0,257260999
0,318667806	0,097763723	0,076642209	0,490656755	0,182978202
0,155745545	0,071990626	0,045309252	0,20239232	0,493760192
0,405902253	0,116866952	0,104039457	0,439521138	0,483210232
0,343392714	0,089394525	0,08033489	0,379112246	0,413293069
0,101689521	0,067466058	0,038712059	0,115581719	0,554526731
0,44204738	0,196089392	0,287940202	0,5376472	0,423466297
0,231142524	0,153681093	0,073005486	0,817904336	0,272474808
0,721955356	0,202799735	0,306057655	0,520471263	0,585591624
0,399968953	0,087624932	0,108094157	0,36130881	0,429015949
0,144227409	0,068861413	0,046628401	0,099189331	0,76150466
0,37403194	0,232488436	0,186124028	0,745112168	0,294943838
0,484718405	0,157685819	0,645687305	0,382590268	0,300387386
0,133162332	0,043440185	0,187621229	0,298945106	0,132528423
0,185181123	0,081613511	0,039459117	0,116288831	0,814302734
0,912302816	0,100747411	0,237553057	0,301546608	0,303225408
0,076348648	0,032000826	0,016361564	0,066822385	0,139776023
0,327896622	0,088244499	0,073679272	0,491393559	0,457388686
0,397038871	0,092976601	0,079070428	0,28898848	0,398082997
0,723058614	0,156802722	0,330687619	0,426291366	0,40261689
0,202010933	0,032876046	0,622195188	0,094226855	0,185315108
0,128139657	0,083064367	0,049309547	0,812202538	0,159132847
0,337125821	0,12463631	0,076238662	0,277682687	0,693139314
0,52593267	0,088310904	0,140939539	0,393084353	0,438625233
0,885635587	0,066075991	0,113343602	0,187356334	0,224099831
0,098366421	0,424777249	0,074813993	0,078426449	0,125588614
0,176117813	0,082117511	0,027038221	0,102429204	0,672676945
0,15244283	0,104076583	0,042765499	0,849933852	0,25021506
0,491363614	0,39847845	0,215703245	0,416699757	0,392094433
1	0,094278534	0,190948673	0,252487792	0,261008226
0,094278534	1	0,028857151	0,099161547	0,158065068
0,190948673	0,028857151	1	0,075714039	0,111884913
0,252487792	0,099161547	0,075714039	1	0,218528179
0,261008226	0,158065068	0,111884913	0,218528179	1

Apêndice 2 – Quadro com os valores de log2FoldChange e p-valor ajustado da análise diferencial de genes conduzida pelo software DESeq2

external_gene_name	log2FoldChange	pvalue	padj
NOS2	5,98579414	2,24E-26	3,17E-23
MS4A1	3,525532252	9,45E-10	4,86E-08
CD19	3,136890879	1,16E-11	1,04E-09
KIR2DL3	2,151232678	0,000116998	0,000982401
IL17A	2,054402788	0,000895271	0,005130996
IL12A	2,047623675	7,54E-08	2,06E-06
IL13	1,97128206	0,001822909	0,00916577
KLRK1	1,955546863	1,16E-06	2,14E-05
KIR3DL2	1,924765467	0,000169278	0,001327574
IL17F	1,754472329	0,007391529	0,028037063
IL2	1,402396052	0,003857009	0,016729765
CD3D	1,389071216	7,66E-05	0,000689889
PDCD1	1,379528318	0,000412484	0,002726353
APOBEC3H	1,359001773	4,77E-05	0,000464629
IFNG	1,309269861	0,007713395	0,028970563
CD3E	1,281147797	0,000440003	0,002872466
IL12B	1,19545674	0,009615143	0,034397408
APOBEC3G	1,193012048	3,45E-05	0,00035461
KLRD1	1,17852094	0,003135723	0,014119467
RELB	1,167794789	0,000123112	0,001021637
CD8A	1,154114695	0,006595506	0,025601589
APOBEC3B	1,14151814	0,000525552	0,003328168
APOBEC3D	1,125800855	0,000132782	0,001084569
HLA-DOA	1,083907537	0,007846151	0,029381625
HLA-DMB	1,071271151	0,001940415	0,009608059
LAG3	1,069329193	0,007006737	0,026852847
GZMB	1,064931314	0,007114146	0,02716486
KLRC2	1,03487494	0,062059175	0,144400236
CTLA4	1,009625033	0,00122725	0,006626332
CD1A	0,987420573	0,03112242	0,085690597
FOXP3	0,980348932	0,002442976	0,011593831
HLA-DQB2	0,920355414	0,026344627	0,075550717
HLA-DRB5	0,901167247	0,02629108	0,075409865
IL4	0,892623107	0,14840419	0,274259646
GZMA	0,868838416	0,037378008	0,098422901
IL23A	0,867662196	0,01134123	0,039200155
KIR2DL4	0,856695924	0,052355431	0,127259483
CD40	0,847074249	0,002031169	0,00997264
HLA-DMA	0,833890779	0,010402328	0,036662388
ICOS	0,797655218	0,028325781	0,079806522
KLRC1	0,794636595	0,051683704	0,126067934
ITGAM	0,778592651	0,037690524	0,099079554
HLA-DQB1	0,765930418	0,052069434	0,126709116
NFKB2	0,764201573	0,005530454	0,022194859
HLA-DOB	0,761245627	0,020321533	0,061978103
IL2RA	0,756413784	0,031124279	0,085690597
CD4	0,747891097	0,037162425	0,098024465
PRF1	0,722893577	0,059631915	0,140125769
HLA-DPB1	0,72089697	0,042095504	0,108004112
HLA-DQA1	0,709387379	0,072383893	0,162131151
HLA-DQA2	0,690718007	0,120906272	0,236834202
HLA-DPA1	0,676773133	0,059852799	0,140476583
APOBEC3F	0,653773168	0,001674528	0,008545138
IL5	0,653417733	0,246653023	0,394997679
IL9	0,627778946	0,508729642	NA
APOBEC3C	0,600764545	0,000740465	0,004396288
HLA-DRA	0,592857117	0,095876116	0,1994875
ITGAX	0,556678541	0,076073686	0,168222202
HLA-DPB2	0,479196087	0,367368094	0,521536416
HAVCR2	0,381299074	0,22369493	0,368872268
STAT3	0,380951383	0,028637319	0,080471079
ITGAE	0,351665786	0,146282356	0,271414303
HLA-DRB1	0,320923106	0,405303332	0,557912109
MS4A6A	0,29042299	0,371247019	0,52516414
HLA-DRB6	0,215305199	0,551678796	0,688955737
HLA-F	0,156026471	0,602308784	0,729380228
ENTPD1	0,082759018	0,65791418	0,772553149
NFKB1	0,073296904	0,684032824	0,791775962
TNF	0,055794928	0,875589168	0,923275678

FCGR3A	0,035477421	0,926879172	0,954928774
CD274	0,024605851	0,950432696	0,96961797
CD80	0,023070543	0,946657532	0,967403342
CD86	-0,114311138	0,697948695	0,80177519
HLA-B	-0,119691161	0,700867244	0,80398504
CD14	-0,131332649	0,661778294	0,77492478
STAT6	-0,135801805	0,299432344	0,452177917
REL	-0,146211177	0,647975454	0,764469966
HLA-C	-0,206003186	0,449584694	0,599491267
HLA-A	-0,284483809	0,297149886	0,449989095
APOBEC3A	-0,28571517	0,598396562	0,726228065
RELA	-0,289701223	0,009800083	0,034912219
CD163	-0,347337583	0,399265379	0,552242926
STAT1	-0,374303779	0,186663756	0,323152962
PTGS2	-0,382647842	0,457764849	0,606834424
IL10	-0,438695497	0,105137102	0,213666413
CD68	-0,464539051	0,056129334	0,133973454
B2M	-0,475177787	0,040207788	0,104096724
TAP1	-0,522152083	0,122970104	0,239754717
TAP2	-0,595365513	0,052593701	0,127720053
LAMP1	-0,618367836	4,26E-06	6,29E-05
HLA-E	-0,67613348	0,004700459	0,019505671
HLA-G	-0,683482606	0,071340805	0,16023431
PDCD1LG2	-0,976160082	0,005137838	0,020928325
TGFB1	-1,136303043	7,18E-10	3,82E-08
HIF1A	-1,26602073	1,37E-06	2,47E-05
CXCR2	-1,367759853	0,001361007	0,007206751
IL1B	-1,624949707	3,31E-05	0,000341821
IL6	-1,646538701	1,05E-05	0,000132719
NCAM1	-1,785275875	0,000443651	0,002890184
IL8	-2,092396	9,623308E-07	1,828657E-05
IL1A	-2,169804199	4,26E-06	6,29E-05
CXCR1	-2,701255816	6,68E-09	2,65E-07

Apêndice 3 – Quadro com os valores do coeficiente de correlação de Spearman e p-valor das correlações entre os scores gerados pelo software ESTIMATE e os valores de expressão normalizados das APOBEC3s dos pacientes com tumores HPV- (à esquerda) e HPV+ (à direita)

Var1	Var2	R	p.value
APOBEC3B	APOBEC3B	1	NA
APOBEC3C	APOBEC3B	0.08978328173	0.7231227826
APOBEC3G	APOBEC3B	0.08978328173	0.7231227826
APOBEC3D	APOBEC3B	-0.05469556244	0.8293348338
APOBEC3A	APOBEC3B	0.2156862745	0.3900270258
APOBEC3F	APOBEC3B	0.3168214654	0.2002049944
APOBEC3H	APOBEC3B	0.06501547988	0.7977151314
Stromal_score	APOBEC3B	-0.1640866873	0.515294731
Immune_score	APOBEC3B	0.1847265222	0.4630613329
Tumor_purity	APOBEC3B	0.06707946336	0.7914253838
APOBEC3B	APOBEC3C	0.08978328173	0.7231227826
APOBEC3C	APOBEC3C	1	NA
APOBEC3G	APOBEC3C	0.7296181631	0.0005890520867
APOBEC3D	APOBEC3C	0.653250774	0.003285641103
APOBEC3A	APOBEC3C	0.4035087719	0.09680965248
APOBEC3F	APOBEC3C	0.4427244582	0.06578236404
APOBEC3H	APOBEC3C	0.5706914345	0.01338428135
Stromal_score	APOBEC3C	0.3849329205	0.1147080269
Immune_score	APOBEC3C	0.7750257998	0.0001583378269
Tumor_purity	APOBEC3C	-0.5830753354	0.01109244362
APOBEC3B	APOBEC3G	0.08978328173	0.7231227826
APOBEC3C	APOBEC3G	0.7296181631	0.0005890520867
APOBEC3G	APOBEC3G	1	NA
APOBEC3D	APOBEC3G	0.8286893705	2.15E-05
APOBEC3A	APOBEC3G	0.3498452012	0.1546923218
APOBEC3F	APOBEC3G	0.6862745098	0.001660913535
APOBEC3H	APOBEC3G	0.6305469556	0.005025142219
Stromal_score	APOBEC3G	0.5128998968	0.02950655372
Immune_score	APOBEC3G	0.8142414861	3.91E-05
Tumor_purity	APOBEC3G	-0.64499484	0.003849373039
APOBEC3B	APOBEC3D	-0.05469556244	0.8293348338
APOBEC3C	APOBEC3D	0.653250774	0.003285641103
APOBEC3G	APOBEC3D	0.8286893705	2.15E-05
APOBEC3D	APOBEC3D	1	NA
APOBEC3A	APOBEC3D	0.2280701754	0.3627002085
APOBEC3F	APOBEC3D	0.7667698658	0.0002053541651
APOBEC3H	APOBEC3D	0.6326109391	0.004841232347
Stromal_score	APOBEC3D	0.5005159959	0.03438377918
Immune_score	APOBEC3D	0.6759545924	0.002073952449
Tumor_purity	APOBEC3D	-0.5810113519	0.01145085401
APOBEC3B	APOBEC3A	0.2156862745	0.3900270258
APOBEC3C	APOBEC3A	0.4035087719	0.09680965248
APOBEC3G	APOBEC3A	0.3498452012	0.1546923218
APOBEC3D	APOBEC3A	0.2280701754	0.3627002085
APOBEC3A	APOBEC3A	1	NA
APOBEC3F	APOBEC3A	0.1124871001	0.6567565631
APOBEC3H	APOBEC3A	0.2404540764	0.3364896474
Stromal_score	APOBEC3A	-0.3126934985	0.2064536417
Immune_score	APOBEC3A	0.3684210526	0.1324871564
Tumor_purity	APOBEC3A	0.06501547988	0.7977151314
APOBEC3B	APOBEC3F	0.3168214654	0.2002049944
APOBEC3C	APOBEC3F	0.4427244582	0.06578236404
APOBEC3G	APOBEC3F	0.6862745098	0.001660913535
APOBEC3D	APOBEC3F	0.7667698658	0.0002053541651
APOBEC3A	APOBEC3F	0.1124871001	0.6567565631
APOBEC3F	APOBEC3F	1	NA
APOBEC3H	APOBEC3F	0.3642930857	0.1372167161
Stromal_score	APOBEC3F	0.4674922601	0.05043751945
Immune_score	APOBEC3F	0.5562435501	0.01651840305
Tumor_purity	APOBEC3F	-0.5335397317	0.0225880298
APOBEC3B	APOBEC3H	0.06501547988	0.7977151314
APOBEC3C	APOBEC3H	0.5706914345	0.01338428135
APOBEC3G	APOBEC3H	0.6305469556	0.005025142219
APOBEC3D	APOBEC3H	0.6326109391	0.004841232347
APOBEC3A	APOBEC3H	0.2404540764	0.3364896474
APOBEC3F	APOBEC3H	0.3642930857	0.1372167161
APOBEC3H	APOBEC3H	1	NA
Stromal_score	APOBEC3H	0.2837977296	0.2537564179
Immune_score	APOBEC3H	0.6388028896	0.004322124803
Tumor_purity	APOBEC3H	-0.4344685243	0.07159701126
APOBEC3B	Stromal_score	-0.1640866873	0.515294731
APOBEC3C	Stromal_score	0.3849329205	0.1147080269

Var1	Var2	R	p.value
APOBEC3B	APOBEC3B	1	NA
APOBEC3C	APOBEC3B	0.5397748593	0.0003248809816
APOBEC3G	APOBEC3B	0.4123827392	0.008186950554
APOBEC3D	APOBEC3B	0.4566604128	0.003056646471
APOBEC3A	APOBEC3B	0.234521576	0.1452229341
APOBEC3F	APOBEC3B	0.4393996248	0.004557497051
APOBEC3H	APOBEC3B	0.4159474672	0.007598082358
Stromal_score	APOBEC3B	-0.2356472795	0.1432460438
Immune_score	APOBEC3B	-0.004502814259	0.9780008353
Tumor_purity	APOBEC3B	0.1397748593	0.3896700848
APOBEC3B	APOBEC3C	0.5397748593	0.0003248809816
APOBEC3C	APOBEC3C	1	NA
APOBEC3G	APOBEC3C	0.71369606	2.35E-07
APOBEC3D	APOBEC3C	0.7701688555	6.23E-09
APOBEC3A	APOBEC3C	0.1904315197	0.2391907916
APOBEC3F	APOBEC3C	0.7915572233	1.19E-09
APOBEC3H	APOBEC3C	0.4774859287	0.001835472846
Stromal_score	APOBEC3C	0.1202626642	0.4597988282
Immune_score	APOBEC3C	0.4330206379	0.005255713427
Tumor_purity	APOBEC3C	-0.3140712946	0.04842361096
APOBEC3B	APOBEC3G	0.4123827392	0.008186950554
APOBEC3C	APOBEC3G	0.71369606	2.35E-07
APOBEC3G	APOBEC3G	1	NA
APOBEC3D	APOBEC3G	0.8311444653	3.16E-11
APOBEC3A	APOBEC3G	0.1075046904	0.5090762113
APOBEC3F	APOBEC3G	0.8506566604	3.67E-12
APOBEC3H	APOBEC3G	0.7686679174	6.95E-09
Stromal_score	APOBEC3G	0.1866791745	0.2487470925
Immune_score	APOBEC3G	0.6101313321	2.92E-05
Tumor_purity	APOBEC3G	-0.4780487805	0.001809541027
APOBEC3B	APOBEC3D	0.4566604128	0.003056646471
APOBEC3C	APOBEC3D	0.7701688555	6.23E-09
APOBEC3G	APOBEC3D	0.8311444653	3.16E-11
APOBEC3D	APOBEC3D	1	NA
APOBEC3A	APOBEC3D	0.0861163227	0.5972495362
APOBEC3F	APOBEC3D	0.8407129456	1.14E-11
APOBEC3H	APOBEC3D	0.5337711069	0.0003896076574
Stromal_score	APOBEC3D	0.1088180113	0.5038840003
Immune_score	APOBEC3D	0.4889305816	0.001367805707
Tumor_purity	APOBEC3D	-0.3714821764	0.01826950772
APOBEC3B	APOBEC3A	0.234521576	0.1452229341
APOBEC3C	APOBEC3A	0.1904315197	0.2391907916
APOBEC3G	APOBEC3A	0.1075046904	0.5090762113
APOBEC3D	APOBEC3A	0.0861163227	0.5972495362
APOBEC3A	APOBEC3A	1	NA
APOBEC3F	APOBEC3A	0.0168855347	0.9176340385
APOBEC3H	APOBEC3A	0.03039399625	0.852306879
Stromal_score	APOBEC3A	-0.07861163227	0.6296885406
Immune_score	APOBEC3A	0.1138836773	0.4841111565
Tumor_purity	APOBEC3A	-0.04090056285	0.8021388615
APOBEC3B	APOBEC3F	0.4393996248	0.004557497051
APOBEC3C	APOBEC3F	0.7915572233	1.19E-09
APOBEC3G	APOBEC3F	0.8506566604	3.67E-12
APOBEC3D	APOBEC3F	0.8407129456	1.14E-11
APOBEC3A	APOBEC3F	0.0168855347	0.9176340385
APOBEC3F	APOBEC3F	1	NA
APOBEC3H	APOBEC3F	0.612195122	2.69E-05
Stromal_score	APOBEC3F	0.1983114447	0.2199400368
Immune_score	APOBEC3F	0.4729831144	0.00205499836
Tumor_purity	APOBEC3F	-0.4033771107	0.009851944868
APOBEC3B	APOBEC3H	0.4159474672	0.007598082358
APOBEC3C	APOBEC3H	0.4774859287	0.001835472846
APOBEC3G	APOBEC3H	0.7686679174	6.95E-09
APOBEC3D	APOBEC3H	0.5337711069	0.0003896076574
APOBEC3A	APOBEC3H	0.03039399625	0.852306879
APOBEC3F	APOBEC3H	0.612195122	2.69E-05
APOBEC3H	APOBEC3H	1	NA
Stromal_score	APOBEC3H	0.2934333959	0.06611041486
Immune_score	APOBEC3H	0.6341463415	1.12E-05
Tumor_purity	APOBEC3H	-0.5287054409	0.000452966624
APOBEC3B	Stromal_score	-0.2356472795	0.1432460438
APOBEC3C	Stromal_score	0.1202626642	0.4597988282

APOBEC3G	Stromal_score	0.5128998968	0.02950655372
APOBEC3D	Stromal_score	0.5005159959	0.03438377918
APOBEC3A	Stromal_score	-0.3126934985	0.2064536417
APOBEC3F	Stromal_score	0.4674922601	0.05043751945
APOBEC3H	Stromal_score	0.2837977296	0.2537564179
Stromal_score	Stromal_score	1	NA
Immune_score	Stromal_score	0.572755418	0.01297817883
Tumor_purity	Stromal_score	-0.91124871	1.46E-07
APOBEC3B	Immune_score	0.1847265222	0.4630613329
APOBEC3C	Immune_score	0.7750257998	0.0001583378269
APOBEC3G	Immune_score	0.8142414861	3.91E-05
APOBEC3D	Immune_score	0.6759545924	0.002073952449
APOBEC3A	Immune_score	0.3684210526	0.1324871564
APOBEC3F	Immune_score	0.5562435501	0.01651840305
APOBEC3H	Immune_score	0.6388028896	0.004322124803
Stromal_score	Immune_score	0.572755418	0.01297817883
Immune_score	Immune_score	1	NA
Tumor_purity	Immune_score	-0.7791537668	0.0001384760252
APOBEC3B	Tumor_purity	0.06707946336	0.7914253838
APOBEC3C	Tumor_purity	-0.5830753354	0.01109244362
APOBEC3G	Tumor_purity	-0.64499484	0.003849373039
APOBEC3D	Tumor_purity	-0.5810113519	0.01145085401
APOBEC3A	Tumor_purity	0.06501547988	0.7977151314
APOBEC3F	Tumor_purity	-0.5335397317	0.0225880298
APOBEC3H	Tumor_purity	-0.4344685243	0.07159701126
Stromal_score	Tumor_purity	-0.91124871	1.46E-07
Immune_score	Tumor_purity	-0.7791537668	0.0001384760252
Tumor_purity	Tumor_purity	1	NA

APOBEC3G	Stromal_score	0.1866791745	0.2487470925
APOBEC3D	Stromal_score	0.1088180113	0.5038840003
APOBEC3A	Stromal_score	-0.07861163227	0.6296885406
APOBEC3F	Stromal_score	0.1983114447	0.2199400368
APOBEC3H	Stromal_score	0.2934333959	0.06611041486
Stromal_score	Stromal_score	1	NA
Immune_score	Stromal_score	0.6307692308	1.28E-05
Tumor_purity	Stromal_score	-0.8454033771	6.74E-12
APOBEC3B	Immune_score	-0.004502814259	0.9780008353
APOBEC3C	Immune_score	0.4330206379	0.005255713427
APOBEC3G	Immune_score	0.6101313321	2.92E-05
APOBEC3D	Immune_score	0.4889305816	0.001367805707
APOBEC3A	Immune_score	0.1138836773	0.4841111565
APOBEC3F	Immune_score	0.4729831144	0.00205499836
APOBEC3H	Immune_score	0.6341463415	1.12E-05
Stromal_score	Immune_score	0.6307692308	1.28E-05
Immune_score	Immune_score	1	NA
Tumor_purity	Immune_score	-0.921575985	0
APOBEC3B	Tumor_purity	0.1397748593	0.3896700848
APOBEC3C	Tumor_purity	-0.3140712946	0.04842361096
APOBEC3G	Tumor_purity	-0.4780487805	0.001809541027
APOBEC3D	Tumor_purity	-0.3714821764	0.01826950772
APOBEC3A	Tumor_purity	-0.04090056285	0.8021388615
APOBEC3F	Tumor_purity	-0.4033771107	0.009851944868
APOBEC3H	Tumor_purity	-0.5287054409	0.000452966624
Stromal_score	Tumor_purity	-0.8454033771	6.74E-12
Immune_score	Tumor_purity	-0.921575985	0
Tumor_purity	Tumor_purity	1	NA