



Ministério da Saúde
Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde
Departamento de Ciência e Tecnologia
Coordenação-Geral de Fomento à Pesquisa em Saúde
Coordenação de Gestão de Programas de Pesquisa

PARECER TÉCNICO Nº 180/2021-COPP/CGFPS/DECIT/SCTIE/MS

Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON)	
Instituição: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – Fundação Faculdade de Medicina.	
CNPJ: 56.577.059/0006-06	UF: SP
Título do projeto: Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento.	
Número Único de Protocolo (NUP): 25000.172859/2020-01	
Período de execução: 36 meses	
Valor solicitado: R\$ 6.004.164,31	
Campo de atuação: realização de pesquisas clínicas, epidemiológicas e experimentais.	
Área prioritária: realização de pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos custo-efetivos para diagnóstico e terapêutica em câncer; realização de pesquisas epidemiológicas, descritivas e analíticas, dos vários tipos de câncer existentes; realização de pesquisa e desenvolvimento de inovações, tecnologias e/ou produtos para prevenção, diagnóstico e/ou tratamento de câncer; realização de pesquisas básicas e pré-clínicas que levem ao desenvolvimento de novos métodos diagnósticos ou terapêuticos em oncologia.	
Assunto: análise técnica inicial	

1. Trata-se da análise inicial do projeto “Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento”, registrado sob o NUP 25000.173199/2020-77, apresentado pelo Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – Fundação Faculdade de Medicina no âmbito do Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica (PRONON), no valor de R\$ 6.004.164,31 (seis milhões, quatro mil cento e sessenta e quatro reais e trinta e um centavos) para execução em 36 meses, conforme anexo LXXXVI à Portaria de Consolidação nº05, 28 de setembro de 2017.
2. A justificativa apresentada para o desenvolvimento do projeto está pautada na necessidade da integração de dados epidemiológicos, moleculares, clínicos e patológicos, gerados pelo presente estudo, no desenvolvimento de possíveis ferramentas com utilidade na prevenção, diagnóstico, seguimento personalizado, estratificação de recorrência/óbito e melhor direcionamento das estratégias terapêuticas e de seguimento para pacientes com CECP (Câncer Epidermóide Cabeça e Pescoço), considerando que o CECP tem alta incidência, apresenta alta mortalidade e morbidade e resulta em alto custo para o sistema de saúde no Brasil.

3. O objetivo geral do projeto é compreender as diferenças na caracterização epidemiológica, clínica e molecular dos pacientes brasileiros com CECP em diferentes faixas etárias, bem como suas implicações no atraso do diagnóstico, impacto em qualidade de vida e no aperfeiçoamento de programas de prevenção, detecção precoce e decisões terapêuticas. Os objetivos específicos foram apresentados para cada um dos cinco subprojetos em SEI 0022853974, fls. 19-21.
4. O presente projeto realizará um estudo epidemiológico, exploratório, longitudinal, experimental, envolvendo pesquisa básica e translacional, com coleta de material prospectiva e retrospectiva. O projeto foi subdividido em cinco subprojetos, com os seguintes escopos:
- I - **Subprojeto 1 (Epidemiologia, perfil clínico e qualidade de vida)** - fará uma análise prospectiva observacional do perfil clínico e epidemiológico de pacientes com CECP com menos de 40 anos, não tabagistas/etilistas, provenientes do ICESP e de centros de tratamento do câncer na cidade de São Paulo, codificados com a Classificação Internacional de Doenças 10 (CID-10). Avaliará o impacto do atraso do diagnóstico na evolução clínica e na trajetória dos pacientes no serviço de saúde a partir da queixa principal. Avaliará também o impacto financeiro na renda familiar e a qualidade de vida dos participantes de pesquisa.
 - II - **Subprojeto 2 (Metagenômica e Estudo Molecular do CECP)** - Recrutará participantes de pesquisa com CECP jovens e/ou sem fatores de risco aparente (n=50) e controles saudáveis (n=50), pareados por idade e sexo. Os participantes de pesquisa responderão a um questionário epidemiológico que investiga estilo de vida e fatores de risco ligados ao CECP. Amostras de swab bucal serão coletadas para análise metagenômica e extração de DNA (ácido desoxirribonucleico) com o objetivo de identificar agentes biológicos que estejam associados às lesões que estão sendo investigadas neste estudo. Realizará a identificação de mutações germinativas em pacientes jovens e/ou com histórico familiar de câncer e/ou ausência de histórico de tabagismo e infecção por HPV. Analisará o perfil de mutações somáticas e alterações no transcriptoma de tumores de pacientes jovens e de não tabagistas/etilistas. Fará a análise de miRNAs (micro ácido ribonucleico) e o remodelamento da matriz extracelular.
 - III - **Subprojeto 3 (Papel do Microambiente Tumoral no CECP)** – Analisará o perfil de resposta imune de pacientes com câncer de boca e o metabolismo e modulação de respostas imunes, marcadores e oportunidades terapêuticas. Avaliará *in situ* os biomarcadores relacionados ao estroma no microambiente tumoral, com ênfase na via Hippo.
 - IV - **Subprojeto 4 (Estudos Funcionais com CECP)** - Pretende estabelecer modelos de sensibilidade a drogas que possam ter aplicação em câncer de cabeça e pescoço para a personalização do tratamento. Nesta etapa, ocorrerá o processamento do tecido tumoral fresco para estabelecimento de cultura primária, para avaliar sensibilidade de CECP a fármacos, usados e/ou com potencial uso na prática clínica, em modelo de PDX (xenoinxertos derivados de pacientes) em zebrafish. Ademais, avaliará a sensibilidade de CECP a fármacos em modelo de PDX em camundongos.
 - V - **Subprojeto 5 (Biópsia líquida para seguimento dos participantes)** – Serão coletados sangue periférico e saliva dos participantes de pesquisa para a obtenção de ctDNA (DNA tumoral circulante). A intenção é identificar mutações somáticas em ctDNA coletado ao diagnóstico e na recidiva da doença ou ao final de 2 anos (o que ocorrer antes), para avaliar a capacidade de detecção precoce de recidiva. Se for detectada nova mutação na segunda avaliação, será realizada uma busca pregressa desta mutação específica, através de sequenciamento de ctDNA de amostras coletadas durante o seguimento clínico do paciente.
5. A análise inicial do projeto foi realizada de acordo com o anexo LXXXVI da Portaria acima referida, tendo sido avaliados: justificativa, objetivos, metodologia, orçamento, cronograma,

informações adicionais e anexos.

6. A instituição proponente apresentou a seguinte documentação (SEI 0018013664): a) requerimento de apresentação do projeto (fls. 03-136); b) cópia do ato que deferiu o credenciamento da instituição (fl. 621); c) declaração de responsabilidade técnica (fl. 164); d) declaração de capacidade técnica operacional (fl. 165); e) comprovação de anuência prévia favorável ao projeto do gestor de saúde municipal/estadual (fl. 622); f) declaração de comprometimento a submeter o projeto a apreciação ética e sanitária (fl. 620); g) cronograma de execução do projeto em meses (fl. 122); h) demonstrativo de projeção de despesas (Anexo VI) (fl. 390); i) planilha de detalhamento de itens (137-158); j) cotações orçamentárias (fls. 166-617); e k) formulário de informações complementares para propostas que preveem a aquisição de equipamentos e materiais permanentes no âmbito do PRONON (Anexo VII) (fls. 617-619) em conformidade com os termos do art. 26 do Anexo LXXXVI à Portaria de Consolidação nº05, de 28 de setembro de 2017.
7. Buscando sanar dúvidas referentes à proposta submetida, foram realizadas diligências (SEI 0019913002; 0022230016; 0022628992; 0022853571), nas quais foram solicitados documentos faltantes e esclarecimentos quanto: (1) à fundamentação que justifique a hipótese; (2) à inserção do objetivo geral no projeto; (3) ao detalhamento do recrutamento dos participantes; (4) ao sequenciamento do genoma em 4 anos; (5) ao depósito de patentes para métodos relacionados ao projeto; (6) ao parecer de credenciamento do Banco de Tumores do ICESP; (7) à justificativa para quantidade de profissionais por atividades; (8) ao tamanho amostral por subprojeto e a fundamentação teórica; (9) aos riscos e benefícios relacionados aos participantes de pesquisa; (10) ao fornecimento dos resultados das análises nas amostras biológicas dos participantes de pesquisa; (11) ao aconselhamento genético; (12) à análise dos dados e como serão correlacionados; (12) aos riscos previstos no projeto e as ações mitigadoras; (13) ao envio dos questionários que serão aplicados aos participantes de pesquisa. As diligências foram respondidas de acordo o preconizado no § 1º do art. 48 da Portaria supracitada (SEI 0019913090; 0022230024; 0022629059; 0022853657) e consideradas pertinentes. Ademais, a instituição encaminhou a versão atualizada contemplando todas as alterações solicitadas (SEI 0022853974).
8. Para subsidiar a análise de mérito e relevância realizada pela área técnica do Departamento de Ciência e Tecnologia da Secretaria de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde do Ministério da Saúde (Decit/SCTIE/MS), a proposta foi enviada para avaliação externa por consultores *ad hoc*, que atuaram de modo independente e voluntário, assinando termos de confidencialidade e ausência de conflito de interesses.
9. Mediante a avaliação externa, o projeto apresentado foi considerado inovador para tumores de cabeça e pescoço, na caracterização imunológica, genética somática e germinativa. Aspectos clínicos e epidemiológicos, embora tenham sido amplamente estudados, são válidos por possibilitar correlação molecular, configurando uma pesquisa translacional de altíssima relevância. A metodologia apresentada foi considerada pertinente, com objetivos adequados e exequíveis com a proposta. A identificação de novos fatores etiológicos biológicos associados ao CECP, assim como, a identificação das alterações germinativas e polimorfismos genéticos relacionados ao aumento de risco ao CECP, são relevantes para as possibilidades do diagnóstico precoce. Os resultados gerados serão úteis para o entendimento da dinâmica de atendimento de pacientes com câncer e introdução de novos métodos diagnósticos e de avaliação do prognóstico do câncer de cabeça e pescoço. Por fim, os dados coletados de pacientes incluídos de forma prospectiva constituirão um banco de dados para análise agregada dos investigadores, aspecto inovador deste projeto, pois agrega estudo epidemiológico e molecular, que permitirá uma análise integrada, que poderá revelar resultados inéditos (SEI 0022230024).
10. O orçamento informado pela instituição apresentou as despesas e as categorias dos gastos, conforme preconiza o art. 27 da Portaria supracitada. A partir do detalhamento orçamentário do projeto, foi possível identificar a composição dos itens: a) diárias e passagens para a análise dos dados; b) serviços de terceiros para a contratação de auditoria independente, serviço de análise estatística, sequenciamentos, serviço de bioinformática, análises de RNA e transporte de amostras; c) recursos humanos para contratação de dois enfermeiros de pesquisa, um monitor de

pesquisa e um biólogo; e) bolsas científicas, uma de doutorado e uma de pós-doutorado; f) material de consumo para aquisição de insumos para a execução das atividades previstas no projeto; g) equipamentos e materiais permanentes; e h) equipamentos de informática para aquisição de computadores, licenças do Microsoft Office e equipamentos para armazenamento de dados.

11. O valor inicial da proposta foi de R\$ 6.004.164,31, no entanto, após as diligências (SEI 0019913061; 0022230024; 0022629059; 0022853657), o valor foi ajustado para R\$ 5.325.073,44, dividido em Despesas de Custeio (R\$ 4.440.709,36 - 83,39%) e Despesas de Capital (R\$ 884.364,08 - 16,61%). A instituição apresentou planilha com orçamento ajustado e detalhado por rubricas (SEI 0022855038) e cronograma de execução financeira para os meses de atividade. O orçamento total solicitado no projeto está detalhado no quadro abaixo:

DESCRIÇÃO	ORÇAMENTO APRESENTADO (R\$)	ORÇAMENTO APROVADO (R\$)	% SOBRE O VALOR TOTAL DO PROJETO
DESPESA DE CUSTEIO	4.936.938,89	4.440.709,36	83,39%
Diárias e Passagens	6.000,00	4.800,00	0,09%
Captação de Recursos e Elaboração de Projeto	-	-	0,00%
Serviço de Terceiros - PF	-	-	0,00%
Serviço de Terceiros - PJ	54.154,00	88.064,00	1,65%
Coordenação	-	-	0,00%
Recursos Humanos (RPA)	760.985,49	763.588,79	14,34%
Bolsas	346.594,80	346.594,80	6,51%
Auditoria	-	-	0,00%
Material de Consumo	3.769.204,60	3.237.661,78	60,80%
Outros (Especificar)	-	-	0,00%
DESPESA DE CAPITAL	1.067.225,42	884.364,08	16,61%
Imobilizado Tangível	-	-	0,00%
Obras (Reformas) e Instalações	-	-	0,00%
Equipamentos e Material Permanente	615.540,58	603.494,58	11,33%
Equipamentos de Informática	451.684,84	280.869,50	5,27%
Outros (Especificar)	-	-	0,00%
Imobilizado Intangível (Especificar)	-	-	0,00%
PREVISÃO TOTAL	6.004.164,31	5.325.073,44	100,00%

12. Em relação à análise orçamentária, quanto à rubrica “Diárias e Passagens”, o valor orçado foi de R\$ 6.000,00, previsto para os custos de diárias para 3 integrantes do projeto em 5 viagens à Botucatu/SP, necessárias para a realização das análises de dados da pesquisa. Durante a análise do projeto, foi solicitada adequação do orçamento da rubrica em consonância com às diretrizes praticadas por esta Coordenação, ademais, questionou-se a necessidade do acompanhamento da equipe na realização das análises dos dados. Em resposta, a instituição ajustou o valor das diárias nacionais e justificou a necessidade das viagens. A análise técnica considerou a justificativa pertinente para o desenvolvimento do projeto e aprova o valor de R\$ 4.800,00 para essa rubrica.
13. Quanto à rubrica “Serviços de Terceiros - PJ”, o valor orçado foi de R\$ 54.154,00, para a contratação de auditoria independente, serviço de análise estatística, sequenciamentos, serviço de bioinformática, análises de RNA e transporte de amostras. Durante a análise do projeto, a instituição solicitou aumento na quantidade de horas para o serviço de estatística (de 40 para 200 horas), pois houve adequação nas atividades previstas. A análise técnica entendeu que os serviços descritos na rubrica estão condizentes com as atividades propostas e que as cotações apresentadas eram pertinentes. Portanto, o valor aprovado para essa rubrica é de R\$ 88.064,00.
14. Quanto à rubrica “Recursos Humanos (RPA)”, o valor orçado foi de R\$ 760.985,49, para a contratação de dois enfermeiros de pesquisa (30 meses/Valor Total Mensal: R\$ 6.522,20 /Valor-Hora: R\$ 40,76), um monitor de pesquisa (32 meses/Valor Total Mensal: R\$ 7.774,70 /Valor-Hora: R\$ 48,59) e um biólogo (32 meses/Valor Total Mensal: R\$ 3.776,96 /Valor-Hora: R\$ 23,61). A referência salarial é o valor praticado pela instituição, que apresentou documento da sua política salarial. Foi necessário ajuste na carga horária dos profissionais no decorrer da análise em razão das mudanças nas atividades previstas, o que aumentou o orçamento total da rubrica. Os valores por hora, no entanto, ficaram menores, tendo sido aprovado R\$ 37,06 para os enfermeiros, R\$ 44,49 para o monitor e R\$ 21,61 para o biólogo. As previsões orçamentárias desses custos apresentaram referências pertinentes e em montante razoável para a execução das atividades do projeto. O valor aprovado para essa rubrica é de R\$ 763.588,79.
15. Quanto à rubrica “Bolsas”, o valor orçado foi de R\$ 346.594,80, para a contratação de uma bolsa de doutorado e uma bolsa de pós-doutorado. Os valores das remunerações foram devidamente referenciados e as atividades previstas foram consideradas condizentes com as necessidades do projeto. Ressalta-se que a contratação de bolsas acadêmicas deve estar obrigatoriamente vinculada a cursos de mesmo nível, de preferência em tempo coincidente e com apresentação de trabalho acadêmico relacionado às atividades do projeto, e a instituição reafirmou seu compromisso com o cumprimento das exigências solicitadas. As previsões orçamentárias desses custos apresentaram referências pertinentes e em montante razoável para a execução das atividades do projeto. O valor aprovado para essa rubrica é de R\$ 346.594,80.
16. Quanto à rubrica “Material de Consumo”, a versão inicial do projeto previa a aquisição de 184 itens com o valor total orçado em R\$ 3.769.204,60. Alguns itens foram apresentados sem cotações ou justificativas para a precificação selecionada. Após as diligências, a instituição explicou que a opção por precificar grande parte dos itens por meio de carta de exclusividade se deu pela necessidade de cumprir com protocolos operacionais pelo uso de equipamentos que demandariam insumos específicos. Para os demais itens, foram apresentadas cotações de diferentes fornecedores, sendo aprovado o menor valor pelo o critério da economicidade. Após os ajustes, a lista de materiais e suas cotações foram consideradas pertinentes e o valor aprovado para a rubrica totalizou R\$ 3.237.661,78, para aquisição de 178 itens.
17. Quanto à rubrica “Equipamentos e Materiais Permanentes”, o valor orçado foi de R\$ 615.540,58 para a aquisição de 9 equipamentos. Os valores e métodos de precificação de alguns dos itens solicitados foram questionados em diligência. Foram solicitadas a apresentação de cotações de mercado e a consulta ao banco de dados do SIGEM. Após essa consulta, o orçamento de alguns itens foi ajustado de modo a contemplar as especificações descritas no banco de preços oficial. Para outros itens, foram solicitados orçamentos adicionais para justificar os valores demandados, os quais foram apresentados. Após os ajustes, o valor aprovado para a rubrica é de R\$ 603.494,58.

18. Quanto à rubrica “Equipamentos de Informática”, o valor orçado foi de R\$ 451.684,84 para a aquisição de computadores avançados e suas respectivas licenças do Microsoft Office e equipamentos de armazenamento de dados. Durante a análise, foi questionada a precificação, a quantidade de itens solicitados e se houve consulta ao banco do SIGEM. Em resposta, a instituição ajustou o valor dos computadores e apresentou novos orçamentos para os equipamentos de armazenamento de dados, com a justificativa para a quantidade solicitada, que foram considerados pertinentes. O valor aprovado para essa rubrica totalizou R\$ 280.869,50.
19. O orçamento aprovado está de acordo com o escopo do projeto e os parâmetros de apresentação do orçamento foram baseados em valores de mercado e no Sistema de Informação e Gerenciamento de Equipamentos e Materiais Permanentes Financiáveis para o SUS (SIGEM).
20. No que tange à destinação dos equipamentos adquiridos durante o projeto, a instituição deverá seguir o que determina o art. 38 do Anexo LXXXVI da [Portaria de Consolidação nº 05/GM/MS/2017](#).
21. Conforme preconizado no art. 82, 86 e 87 do Anexo LXXXVI da Portaria supracitada, qualquer alteração no plano de trabalho deve ser submetida à apreciação do órgão do Ministério da Saúde competente. Destaca-se ainda que o uso de rendimentos, decorrentes da aplicação dos recursos do projeto em mercado financeiro, também está sujeito às mesmas condições de prestação de contas exigidas para os recursos incentivados.
22. Cabe salientar que as faturas, recibos, notas fiscais, cheques emitidos e quaisquer outros documentos abrangidos por este artigo deverão conter a discriminação dos serviços contratados e dos produtos adquiridos, o número de registro no SIPAR e o nome do projeto, conforme preconiza § 1º do art. 95 do Anexo LXXXVI da Portaria que regulamenta o Programa.
23. Observa-se que o objeto do projeto é condizente com a expertise do grupo de pesquisa e está em consonância com as linhas de cuidado prioritárias ao SUS. No entanto, vale destacar que a instituição deve atentar aos critérios de economicidade e o uso racional de recursos públicos e isso deve estar comprovado na submissão dos relatórios de prestação de contas. Além disso, o projeto deverá ser executado seguindo o preconizado nas Resoluções da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (Conep), da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e nas demais legislações vigentes relacionadas às exigências éticas e sanitárias em pesquisa, quando aplicável.
24. Ante o exposto, o Departamento de Ciência e Tecnologia recomenda a **APROVAÇÃO** do projeto “Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento”, no valor de R\$ **R\$ 5.325.073,44**, baseado nos termos dispostos na legislação vigente.

É o parecer.

JULIANA BARBOSA VIEIRA

Consultora Técnica Científica

COPP

IVAN OSMO MARDEGAN

Consultora Técnica Financeira

COPP

De acordo. À Diretora para conhecimento e acolhimento do presente parecer.

PATRICIA DE CAMPOS COUTO

Coordenadora de Gestão de Programas de Pesquisa

COPP

SAMANTHA LEMOS TURTE-CAVADINHA

Coordenadora-Geral de Fomento à Pesquisa em Saúde

CGFPS

De acordo. Ao Secretário para conhecimento e aprovação do presente parecer.

ALESSANDRA DE SÁ EARP SIQUEIRA

Diretora do Departamento de Ciência e Tecnologia

DECIT

De acordo. Encaminhe-se ao Departamento de Economia da Saúde, Investimentos e Desenvolvimento – DESID, para conhecimento e providências decorrentes.

HÉLIO ANGOTTI NETO

Secretário de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde

SCTIE



Documento assinado eletronicamente por **Alessandra de Sá Earp Siqueira, Diretor(a) do Departamento de Ciência e Tecnologia**, em 30/09/2021, às 20:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º, do art. 4º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#); e art. 8º, da [Portaria nº 900 de 31 de Março de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Samantha Lemos Turte-Cavadinha, Coordenador(a)-Geral de Fomento à Pesquisa em Saúde**, em 01/10/2021, às 09:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º, do art. 4º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#); e art. 8º, da [Portaria nº 900 de 31 de Março de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patrícia de Campos Couto, Coordenador(a) de Gestão de Programas de Pesquisa**, em 01/10/2021, às 11:10, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º, do art. 4º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#); e art. 8º, da [Portaria nº 900 de 31 de Março de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ivan Osmo Mardegan, Consultor Técnico**, em 01/10/2021, às 13:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º, do art. 4º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#); e art. 8º, da [Portaria nº 900 de 31 de Março de 2017](#).

Documento assinado eletronicamente por **Juliana Barbosa Vieira, Consultor Técnico**, em 01/10/2021,



às 13:53, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º, do art. 4º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#); e art. 8º, da [Portaria nº 900 de 31 de Março de 2017](#).



Documento assinado eletronicamente por **Hélio Angotti Neto, Secretário(a) de Ciência, Tecnologia, Inovação e Insumos Estratégicos em Saúde**, em 08/10/2021, às 07:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º, do art. 4º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#); e art. 8º, da [Portaria nº 900 de 31 de Março de 2017](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

[http://sei.saude.gov.br/sei/controlador_externo.php?](http://sei.saude.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](http://sei.saude.gov.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0023005692** e o código CRC **BD5CD081**.

Referência: Processo nº 25000.172859/2020-01

SEI nº 0023005692

Coordenação de Gestão de Programas de Pesquisa - COPP
Esplanada dos Ministérios, Bloco G - Bairro Zona Cívico-Administrativa, Brasília/DF, CEP 70058-900
Site - saude.gov.br

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

1. Informações da Instituição		
Programa: ☒ PRONON ☐ PRONAS/PCD		
Portaria de credenciamento: Portaria nº 571, de 15/10/2020		
Razão Social: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – Fundação Faculdade de Medicina		
CNPJ: 56.577.059/0006-06		
Endereço: Av. Dr. Arnaldo 251		
Bairro: Cerqueira César	Município: São Paulo	UF: SP
CEP: 01246-000	Fone: (11) 3893-2727	Fax:
Email: icesp.direx@hc.fm.usp.br		CNES: 6123740
Representante Legal: Prof. Flávio Fava de Moraes		

2. Informações Gerais do Projeto
Título do Projeto: Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento
Pesquisador Principal Nome: Luiz Paulo Kowalski; CPF: 320.208.809-20 Telefone: (11) 3061-7373 E-mail: luiz.kowalski@hc.fm.usp.br
Valor total do projeto: R\$ 5.325.067,21 (cinco milhões trezentos e vinte e cinco mil sessenta e sete reais e vinte e um centavos)
Período de Execução: 36 meses (Julho 2021 – Julho 2024)

3. Área de atuação
☐ Prestação de serviços médico-assistencial ☐ Formação, treinamento e aperfeiçoamento de recursos humanos em todos os níveis ☒ Realização de pesquisas clínicas, epidemiológicas e experimentais

4. Área Prioritária
☒ V - realização de pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos custo-efetivos para diagnóstico e terapêutica em câncer; ☒ VI - realização de pesquisas epidemiológicas, descritivas e analíticas, dos vários tipos de câncer existentes; ☒ VII - realização de pesquisa e desenvolvimento de inovações, tecnologias e/ou produtos para prevenção, diagnóstico e/ou tratamento de câncer; ☒ VIII - realização de pesquisas básicas e pré-clínicas que levem ao desenvolvimento de novos métodos diagnósticos ou terapêuticos em oncologia; ☐ IX - desenvolvimento de bancos de tumores; ☐ X - realização de pesquisas para avaliação de políticas, serviços, programas e ações de saúde em oncologia.

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

Devido à sua alta incidência no Brasil, diagnóstico tardio e poucas modificações recentes em opções terapêuticas, o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) ainda representa um grave problema de saúde pública em nossa população, resultando em alto custo para o sistema de saúde. A incidência dessa neoplasia em indivíduos jovens ou que nunca fumaram e beberam está aumentando, provavelmente devido a mudanças de hábitos e estilo de vida, e à crescente prevalência de infecção pelo vírus do papiloma humano (HPV). Esta notável transição epidemiológica requer uma melhor caracterização deste novo perfil de pacientes.

Nossa proposta é realizar um estudo epidemiológico do tipo caso-controle, buscando evidenciar perfis de susceptibilidade ao CECP, e um estudo de coorte para a avaliação de fatores prognósticos. Investigaremos a existência de novos agentes biológicos associados ao desenvolvimento do CECP através de análise de metagenômica bem como possíveis mutações germinativas e associação de polimorfismos relacionados ao risco dessa doença em indivíduos com histórico familiar de câncer. Serão explorados o perfil molecular de tumores não relacionados a fatores de risco conhecidos, assim como estudaremos o microambiente tumoral. As informações geradas serão utilizadas para o desenvolvimento de estratégias de tratamento de precisão com estudos translacionais. Serão elaborados painéis moleculares para uso em biópsias líquidas (análise de DNA tumoral circulante e de vesículas extracelulares séricas e de saliva), assim como estabelecimento de modelos para estudos funcionais de tratamento com combinações de fármacos (xenotransplantes derivados de pacientes).

Dessa forma, com a integração de dados epidemiológicos, clínicos, patológicos e moleculares, será possível desenvolver melhores estratégias de prevenção (primária e secundária), gerar ferramentas com utilidade no diagnóstico, estratégias terapêuticas multidisciplinares e seguimento personalizado. Esta proposta contempla as seguintes áreas prioritárias do PRONON: (1) realização de pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos custo-efetivos para diagnóstico e terapêutica em câncer; (2) realização de pesquisas epidemiológicas, descritivas e analíticas, dos vários tipos de câncer existentes; (3) realização de pesquisa e desenvolvimento de inovações, tecnologias e/ou produtos para prevenção, diagnóstico e/ou tratamento de câncer; (4) realização de pesquisas básicas e pré-clínicas que levem ao desenvolvimento de novos métodos diagnósticos ou terapêuticos em oncologia.

5. Introdução

Epidemiologia do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP)

O câncer de cabeça e pescoço ocorre em vários sítios do trato aerodigestivo superior; mais de 90% dos casos são carcinomas epidermóides (CE) e ocorrem predominantemente na cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe. Segundo dados do GLOBOCAN foram estimados para 2018 cerca de 834.860 casos novos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP), dos quais cerca de 636.781 ocorreram em homens e 198.079 em mulheres, representando a sétima neoplasia mais comum no mundo¹. No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimou 22.284 novos casos de câncer de cavidade oral e laringe para o ano de 2020, sendo 17.650 casos novos em homens e 5.190 em mulheres².

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

Os fatores de risco conhecidos como relacionados ao aumento de risco de desenvolvimento da doença são o consumo de álcool e uso do tabaco, assim como a infecção pelo HPV³⁻⁷. A exposição aos fatores de risco pode ser similar em pacientes jovens e adultos, porém não se sabe se essa exposição é longa o suficiente para tornar esses agentes etiológicos as principais causas de carcinomas de cabeça e pescoço em jovens⁸. A proporção de pacientes com tumores de língua, não tabagistas e não etilistas, já foi relatada como maior em pacientes mais jovens⁹. O aparecimento desses tumores é também relatado em muitos pacientes sem exposição aos fatores de risco conhecidos¹⁰⁻¹⁴.

Estudos que avaliaram a presença do HPV em tumores de cabeça e pescoço são concordantes para o fato de que os tumores associados a este vírus são mais frequentes em pacientes jovens que possuem carcinoma de orofaringe e com menor exposição ao tabaco¹⁵. No Brasil, Kaminagakura et al. (2012) relataram que 32% dos pacientes jovens com carcinomas de cavidade oral eram HPV positivos e que os resultados de sobrevida eram melhores neste subgrupo de pacientes⁵. Na cidade de São Paulo, foi também documentado o aumento da incidência de tumores em orofaringe em adultos jovens¹⁶.

A mortalidade para estes tumores permanece alta nos países em desenvolvimento, as taxas de sobrevida em cinco anos se mantiveram em torno de 50% nas últimas décadas. Porém tem sido observado um aumento de sobrevida nos casos que são positivos para HPV^{7,17-19}.

Uma revisão sistemática recente incluindo 51 estudos reportou que atraso no diagnóstico ou no tratamento leva a uma piora significativa na sobrevida²⁰. Entretanto, não é conhecido o impacto desse atraso de acordo com a faixa etária ou associação com HPV.

Impacto econômico do CECP

O impacto econômico do tratamento do câncer é motivo de preocupação para todos os sistemas de saúde públicos e privados, para nações desenvolvidas ou em desenvolvimento. Contudo, há crescente preocupação sobre o impacto social e econômico para pacientes que sobreviveram ao câncer. Há indícios de que dificuldades financeiras podem gerar piores desfechos em saúde para diversos tipos de câncer²¹. Pacientes com maiores riscos de dificuldades financeiras são aqueles de baixos níveis socioeconômicos, mais jovens, pertencentes a minorias raciais/étnicas, provenientes de áreas rurais, com tumores em estádios mais avançados e que não possuam acesso a sistemas de saúde suplementar²².

O CECP é uma neoplasia com grande potencial de afetar negativamente a produtividade de pacientes em tratamento ou que sobreviveram ao câncer, pelo impacto em qualidade de vida, decorrente de limitações funcionais (em fala, respiração e alimentação), desfiguração e limitação de mobilidade cervical e de membros superiores, além de fatores emocionais e psicológicos.

Um estudo de base populacional na Noruega²³ demonstrou que entre diversos tipos de câncer, o CECP foi dos que apresentaram maior chance de desemprego, tanto para homens quanto para mulheres. A queda média de renda foi de 17% para homens e 17% para mulheres portadoras de CECP, sendo significativamente maior para pacientes com menores níveis de educação. Os impactos foram significativamente crescentes para pacientes com doença em estádios mais avançados. O CECP também se mostrou ser um dos tumores mais associados a perda do emprego pelo câncer entre pacientes oncológicos nos

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

EUA [15700265]. Estudo canadense mostrou que cerca de metade dos pacientes com CECP precisam diminuir sua carga de trabalho e cerca de um terço deles jamais volta a trabalhar²⁴. De fato, piores scores de qualidade de vida se associam a maior taxa de desemprego²⁵. O questionário WPAI-GH (*Work Productivity and Activity Impairment – General Health*), já validado para o Brasil²⁶, mede o impacto de sintomas de saúde gerais e específicos na produtividade no trabalho e fora dele.

Com a tendência a acometer pacientes cada vez mais jovens e com melhores taxas de sobrevivência, muito em função do aumento de casos relacionados ao HPV, a repercussão econômica para o paciente e para a sociedade devido à menor produtividade no trabalho tende a ser igualmente crescente.

As métricas mais usadas de análises de eficácia comparativa, que norteiam tomadas de decisões em saúde sobre incorporação de novas tecnologias e alocação de recursos, levam em conta dados de qualidade de vida dos pacientes, que podem ser coletados por questionários genéricos e/ou específicos. Os instrumentos genéricos têm como principais vantagens a aferição de diversas dimensões da vida e de comparabilidade entre diferentes estados de saúde ou populações. Sua conversão e validação para medidas de utilidade são mais conhecidas. Contudo, podem ser incapazes de detectar estados funcionais específicos de determinadas doenças ou mudanças temporais, tendo baixa sensibilidade e, portanto, necessitando de grandes amostras. Já questionários específicos, possuem maior sensibilidade clínica e temporal, porém falham na comparabilidade de diferentes dimensões, populações e estados de saúde²⁷. O câncer de cabeça e pescoço tem particularidades conferidas pela doença e pelo tratamento que são difíceis de serem aferidas por questionários gerais, e da mesma forma comparáveis a outros estados de doença. Deste modo, apesar de aplicação mais difícil, o uso de questionários gerais e específicos combinados para pacientes com CECP pode ser a estratégia mais adequada. No CECP, há significativa correlação entre os resultados de qualidade de vida avaliados pelo questionário genérico EQ-5D-5L e pelo específico para câncer de cabeça e pescoço EORTC-QLQ-C30²⁸. Dados de preferência, aferidos pelo método de *time trade-off*, já foram estabelecidos para uma amostra representativa da população brasileira, para os diferentes estados do questionário EQ-5D²⁹.

Microbiota oral e sua possível associação com CECP

A região da cabeça e pescoço, em especial a cavidade oral, possui uma grande diversidade bacteriana, com importante variação quantitativa e qualitativa entre indivíduos. Usando métodos tradicionais e técnicas moleculares, mais de 700 espécies bacterianas já foram identificadas na cavidade oral humana³⁰. Uma comparação entre as floras bacterianas encontradas em cavidades orais saudáveis e doentes sugere a existência de um perfil padrão para a microbiota oral em cavidades orais saudáveis³¹, e que uma correlação entre a estrutura e função da microbiota oral e o câncer possa existir^{32,33}.

As diferenças nas comunidades microbianas da saliva de indivíduos sem câncer revelam a existência de variações intra ou inter-indivíduos³⁴. Isto indica que há uma persistência de táxons específicos em um dado sujeito e cuja frequência pode flutuar entre determinados intervalos de tempo. Diante desta estabilidade inerente, é possível que alterações que possam ser relacionadas a estados patológicos de interesse sejam detectadas e mensuradas de modo consistente.

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

Alterações genéticas germinativas de alta penetrância em CECP

Em câncer de aparecimento em idade jovem existe a suspeita de presença de fatores hereditários. A identificação de mutações germinativas patogênicas tem o diferencial de permitir o aconselhamento genético de familiares, que pode auxiliar no rastreamento e prevenção do câncer.

A importância desta determinação pode ser percebida em estudo que avaliou 1120 crianças e adolescentes (<20 anos) com diversos tipos de câncer. Observaram-se mutações em genes de predisposição a câncer em 8,5% dos pacientes. É importante observar que apenas 40% dos pacientes com mutações germinativas patogênicas apresentavam histórico familiar de câncer. Este dado ilustra o fato que pacientes com câncer em idade precoce podem ser carreadores de mutações hereditárias na ausência de história familiar.

Em carcinoma de cabeça e pescoço, a predisposição genética pode estar associada a mutações patogênicas em genes como CDKN2A, ATR e genes relacionados à anemia de Fanconi. Mutação patogênica germinativa em CDKN2A, que codifica a proteína p16, a qual inibe o ciclo celular, é característica da síndrome FAMMM (melanoma múltiplo atípico familiar), que aumenta o risco para desenvolvimento de melanoma, câncer de pâncreas e CECP³⁵. Também em pacientes com câncer de cabeça e pescoço foram descritas mutações germinativas em CDK4, que codifica uma quinase que ativa o ciclo celular³⁶. Mutação germinativa em ATR (ataxia telangiectasia), que está envolvido na resposta a danos no DNA, pode estar associada à predisposição a carcinoma de orofaringe. Já a anemia de Fanconi (FA) é uma doença hereditária recessiva rara, caracterizada por anormalidades congênitas, falência da medula óssea e predisposição genética para leucemia e carcinoma espinocelular, incluindo o HNSCC. Mais de 13 genes FA diferentes foram descritos, estando relacionados ao reparo de dano ao DNA. Além disso, pacientes portadores de carcinoma de cabeça e pescoço podem ser carreadores de mutação patogênica em outros genes relacionados ao reparo de DNA, como RAD51C³⁷.

Polimorfismos associados ao risco do CECP

Além de mutações hereditárias em genes de alta penetrância, precisamos considerar os polimorfismos genéticos frequentes na população, mas associados a pequena variação na susceptibilidade individual ao câncer. Em pacientes jovens com CECP, por exemplo, relata-se perda de heterozigose caracterizadas por deleções de regiões de DNA, que eram mais longas do que se espera ocorrer ao acaso³⁸.

Nos últimos anos, os estudos de associação de genoma de larga escala, com grande número de amostras de pacientes possibilitaram estabelecer alguns marcadores que parecem contribuir para a tumorigênese de diferentes tipos de câncer. Entretanto, poucos estudos avaliaram polimorfismos genéticos em amostras de indivíduos com CECP, e eles também não avaliaram variações genéticas entre amostras de indivíduos jovens, tendo sido investigadas apenas polimorfismos em amostras de indivíduos idosos com histórico de exposição ao tabagismo e etilismo e com ou sem infecção pelo HPV.

Um estudo chileno conduzido com 2398 casos e 2804 controles com ancestralidade reportou a associação de seis loci (5q14.3, 6p21.33 e 6q16.1 - rs2857595 (AIF1), 11q12.2 - rs174549 (FADS1), 12q21.21 - rs10492336 (TBX1) e 16p13.2) com o risco de câncer de laringe³⁹. Em um segundo estudo conduzido com pacientes Europeus, Americanos e Sul Americanos descreveram as associações dos loci

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

gênicos 6p21.32 (rs3828805, HLA-DQB1), 10q26.13 (rs201982221, LHPP) e 11p15.4 (rs1453414, OR52N2-TRIM5) com câncer oral e de orofaringe, além das regiões 2p23.3 (rs6547741, GPN1), 9q34.12 (rs928674, LAMC3), loci-9p21.3 (rs8181047, CDKN2B-AS1) e 5p15.33 (rs10462706, CLPTM1L) com câncer oral⁴⁰. Em um estudo recente de GWAs em pacientes brancos não hispânicos foram observadas associações de um novo loci 6p22.1 (rs259919), além de dois outros loci de suscetibilidade de câncer 6p21.32 (rs3135001, HLA-DQB1) e 6p21.33 (rs1265081, CCHRCR1). Quando foram realizadas estratificações pelos subsítios tumorais os autores também encontraram relação de uma nova região genômica 18q22.2 (rs142021700) e o risco de câncer de hipofaringe e laringe⁴¹.

Esses estudos evidenciam que, ainda que existam alguns marcadores de risco em comum do câncer de cabeça e pescoço, ainda não existe uma assinatura molecular bem estabelecida para esse grupo de neoplasias. Além disso, se faz necessária a compreensão se esses marcadores de risco são os mesmos em amostras de populações sem a presença de fatores etiológicos conhecidos, assim como em pacientes jovens, para a criação de estratégias de rastreamento para prevenção do câncer, diagnóstico precoce da doença, além de possível inferência de evolução da neoplasia quando estabelecida.

Alterações genéticas somáticas em CECp

A compreensão de alterações somáticas é de grande importância por permitir desvendar vias de carcinogênese e consequentemente a identificação de alvos moleculares de tratamento. Em 2015, foi publicado o sequenciamento do exoma de 279 amostras de CECp. Demonstrou-se que tumores associados ao HPV em geral apresentam mutações no domínio helicoidal do oncogene PIK3CA, perda de TRAF3 e amplificação do gene do ciclo celular E2F1. Por outro lado, praticamente todos os tumores relacionados ao tabagismo demonstram perda de função de TP53, inativação de CDKN2A e alterações frequentes no número de cópias. Tumores da cavidade oral de bom prognóstico apresentam mutações ativadoras de HRAS ou PIK3CA, juntamente com mutações inativadoras de CASP8, NOTCH1 e TP53. Observou-se ainda, perda de função do modificador de cromatina NSD1, bem como genes da via WNT, como AJUBA e FAT1 e ativação do fator de estresse oxidativo NFE2L2, principalmente em tumores da laringe. Vale salientar que este estudo detectou alterações candidatas a intervenções terapêuticas na maioria dos CECp. Vale notar que nesta análise de exoma foram incluídas 14 amostras de pacientes jovens com menos de 40 anos, sendo nove primários de cavidade oral, três de orofaringe e dois de laringe; a grande maioria negativo para infecção por HPV (n=12)⁴².

Há estudos que indicam que o perfil molecular dos tumores de língua detectados em jovens e em idosos guarda similaridades entre si, incluindo alterações no número de cópias (CNA), regiões de alterações no número de cópias, mutações e tipo de mutações, apresentando apenas tênues diferenças. Em relação à assinatura mutacional, uma característica do câncer de língua é que em geral, não apresenta assinatura mutacional relacionada ao tabagismo, identificada como maior frequência de transversões C>A e menor frequência de transições C>T, particularmente em posição CpG, consistente com deaminação de 5-metil-citosina para uracila, desencadeada por APOBEC ou outros processos endógenos. Neste aspecto o carcinoma de língua de indivíduos jovens e idosos pode ser considerado similar. Considerando-se o perfil mutacional, observou-se também que a mediana do número de mutações é maior no tumor de idosos do que no de jovens.

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

Dentre os genes mais frequentemente mutados encontram-se aqueles envolvidos em funções biológicas como adesão celular, apoptose, proliferação e ativação de células T. Relata-se menor frequência de mutação em FAT1 (7% vs 26%) e tendência a maior chance de mutação de TP53 (93% vs 76%) e menor chance de PIK3CA (3% vs 15%) em tumores de pacientes jovens em relação a tumores de idosos⁴³. Quanto à alteração do número de cópias, relata-se que não se observou diferença entre tumores de pacientes mais jovens e mais idosos^{43,44}. Por outro lado, detectou-se tendência de menor tamanho de segmento envolvido em ganho de número de cópias em indivíduos jovens. Além disso, a análise de ganho ou perda de genes revelou tendência a menor frequência de ganho de FADD (Fas-Associated protein with Death Domain) e PIK3CA em pacientes jovens⁴³. A expressão proteica avaliada por imuno-histoquímica não revelou quaisquer diferenças entre os dois grupos: 73% dos pacientes ≤ 45 anos e 87% dos pacientes > 45 anos demonstraram positividade para p53. A grande maioria dos tumores não expressava p16, enquanto 13% dos pacientes ≤ 45 anos e 33% dos pacientes > 45 anos apresentaram positividade para p16. Todas as amostras analisadas apresentaram forte expressão de EGFR e CXCR4(50). A expressão gênica de alguns oncogenes e genes supressores tumorais foi avaliada por PCR quantitativa. A expressão de RUNX3, AKT1, PIK3CA, família RAS, TP53, MDM2, CDK4 e BCL2 foram comparáveis ou ligeiramente menores em pacientes ≤ 45 anos. Já a expressão de CDKN2A, MET, HGF, ATM, BRCA1, E2F1, FHIT, CTNNB1 e STK11 foi significativamente mais elevada em pacientes ≤ 45 anos, com diferenças de 4 a 11 vezes⁴⁵.

Recentemente, a publicação do estudo do Pan-Cancer analysis of Whole Genomes (PCAWG) mostrou resultados sobre o genoma completo de tumores e tecido normal de 2658 pacientes com vários tipos de câncer. A análise do genoma completo por ser mais abrangente permite identificar mutações pontuais condutoras e variantes estruturais, como pontos de quebra (breakpoints) e justaposições somáticas recorrentes em regiões codificadoras e não codificadoras⁴⁶. Nesse estudo, observou-se que 17% dos tumores eram carreadores de mutação germinativa patogênica em genes de predisposição ao câncer ou genes de resposta ao dano ao DNA. Observou-se que 91% dos tumores apresentavam pelo menos uma mutação driver, com média de 4,6 drivers por tumor, entretanto com grande variação numérica entre os tumores. As mutações pontuais consideradas driver em regiões não codificadoras foram menos frequentes do que as encontradas em regiões codificadoras e corresponderam a apenas 13% do total de mutações⁴⁶. Dentre os 2658 tumores, 57 correspondiam a carcinomas escamosos (CEC) de cabeça e pescoço, dentre os quais, 13 amostras de pacientes jovens (< 40 anos). As mutações driver mais frequentemente encontradas foram em TP53 (53%), CDKN2A (40%), TERT (33%), PIK3CA (21%), CDKN2B (16%), PTEN e RB1 (7% cada). Em uma amostra não havia mutação driver aparente⁴⁶.

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

Alterações epigenéticas: RNAs não codificantes

Aproximadamente 70% do genoma humano é transcrito em moléculas de RNA, sendo que apenas 2% do genoma codificam para proteínas [26149773]. Os RNAs não codificantes (ncRNAs) apresentam um papel importante na regulação da expressão de genes com funções biológicas importantes associadas à tumorigênese e progressão tumoral. Esses RNAs são encontrados frequentemente com expressão alterada no câncer comparado ao tecido não tumoral^{47,48}. Dentre os diversos tipos de ncRNA, os microRNAs (miRNAs) e os ncRNAs longos (lncRNA) são os mais estudados.

Os lncRNAs são moléculas de RNA com > 200 até 10.000 ribonucleotídeos de extensão, as quais apresentam também papel na regulação da expressão gênica e na regulação da estrutura da cromatina. Além disso, lncRNAs podem regular a expressão de mRNAs alvo funcionando como “esponjas” para microRNAs, ou seja, impedindo a ação regulatória miRNA-mRNA, influenciando assim o desenvolvimento tumoral. Relatos na literatura apontam que os lncRNAs apresentam potencial uso para o diagnóstico, prognóstico e terapia alvo no CECP⁴⁹. Kolenda et al., (2019) mostraram um aumento na expressão do lncRNA ZFAS1 em linhagens de CECP mais invasivas quando comparada a linhagens celulares com menor potencial invasivo⁵⁰. Além disso, a partir dos dados do TCGA, a expressão desse lncRNA foi maior nos tumores comparado às amostras de tecido normal. Entretanto, não há dados sobre os lncRNAs em pacientes jovens com CECP.

Os miRNAs são pequenos RNAs capazes de induzir o silenciamento gênico a nível pós-transcricional. Aumento na expressão dos miRNAs membros da família let-7, let-7f-5p, miR-30b-5p e let-7e-5p foi descrito em pacientes jovens com CEC de língua comparado com tecido normal⁵¹. Além disso, o aumento na expressão do miRNA let-7e em relação ao tecido normal foi observado apenas nos tumores agressivos e a desregulação deste microRNA não foi observada em outros estudos em CECP. Recentemente, um estudo mostrou a diminuição da expressão do miR-30e-5p em 60 pacientes com idade menor de 59 anos comparado com 57 pacientes com idade superior a 59 anos. Essa diminuição foi associada a menor sobrevida global e a expressão do miR-30e foi também um fator prognóstico independente para sobrevida⁵². Outro aspecto, além da alteração de expressão dos miRNAs, é a alteração na sequência gênica deles. Um estudo avaliou a associação entre um polimorfismo de base única (SNPs do inglês) no miR-499 A/G e no miR-149 C/T com a suscetibilidade ao desenvolvimento do CEC de cavidade oral, onde 200 pacientes e 200 controles saudáveis foram avaliados por PCR-RFLP e sequenciamento, juntamente com análise por imuno-histoquímica de possíveis alvos desses miRNAs. Como conclusão os autores apontaram que alteração no miR-499 A/G foi associada ao aumento na suscetibilidade por meio da regulação da expressão de SOX⁵³, entretanto não houve uma associação desse polimorfismo e a idade dos pacientes.

A importância do microambiente tumoral no CECP

O microambiente tumoral (TME) é complexo e tem papel determinante na progressão tumoral, onde subpopulações de células do hospedeiro são recrutadas pelas células tumorais para formar uma estrutura biológica com algum grau de autossuficiência⁵⁴. No microambiente, células tumorais interagem com células tanto do sistema imune, como fibroblastos, células endoteliais e outras. Várias moléculas regem a

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

comunicação entre as células, como citocinas, mediadores lipídicos e metabólitos.

A revisão de Hanahan e Weinberg⁵⁵ refere-se à complexidade biológica dos tumores onde seis capacidades biológicas adquiridas durante o desenvolvimento de vários estágios de tumores humanos constituem as marcas registradas da doença neoplásica. Elas incluem sustentar a sinalização proliferativa, evitar os supressores de crescimento, resistir à morte celular, possibilitar a imortalidade replicativa, induzir angiogênese e ativar invasões e metástases. Subjacentes a essas características estão a instabilidade do genoma, diante da reprogramação do metabolismo energético e a destruição imunológica. O desenvolvimento dessas capacidades não são atribuições apenas das células neoplásicas, mas somado aos vários tipos de células diferentes, como fibroblastos associados ao câncer, neutrófilos, macrófagos, células T reguladoras, células supressoras derivadas de mielóides, células NK, plaquetas e mastócitos. Essas subpopulações de células interagem entre si, bem como com as células neoplásicas, por meio de redes de comunicação complexas, através de várias citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento e proteínas secretados, formando o microambiente tumoral^{55,56}.

De grande importância, a identificação da participação de moléculas do microambiente tumoral na progressão da neoplasia está abrindo caminho para a pesquisa e para o desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas. Um crescente corpo de evidências sugere que os sinais mecânicos que emanam do microambiente da célula são reguladores fundamentais do comportamento da célula.

O componente imunológico no TME

Por diversos fatores epigenéticos e moleculares, o sistema imune responde de modo não satisfatório à presença das células cancerígenas e evolução para massa tumoral. A imunoedição, mecanismo onde as próprias células tumorais são capazes de modular e promover o escape imunológico, são alvos de estudos por diversos grupos no mundo. No entanto, a presença de maciço infiltrado de células imunes em tumores sólidos indica que o sistema está sempre vigilante e tentando destruir as células alteradas. Dentre os principais componentes do microambiente podemos citar: Linfócitos T e B, macrófagos associados ao tumor (TAM), células Natural Killer (NK), células mielóides supressoras (MDSC), células dendríticas, fibroblastos associados ao tumor (CAFs), neutrófilos associados ao tumor, além de fatores secretados como: metaloproteases, fatores de crescimento, enzimas histolíticas e citocinas (IL-10, IL-13, IL-12, TGF- β , TNF- α , IL-1, GM-CSF, IL-4, IL-6)⁵⁷.

As respostas das células T CD8 são consideradas importantes para o controle do crescimento do tumor, devido à sua citotoxicidade potente e pela habilidade de reconhecimento de células anormais por regulação negativa da expressão de MHC classe I. Em contraste, o papel das células T CD4 no contexto do câncer é pouco compreendido, embora esteja cada vez mais claro que as células T CD4 específicas do tumor têm papéis importantes que estão além da capacidade de produzir citocinas para ativar potencializar as resposta das células NK, TCD8, fagócitos e células B. As células T CD4 naïve são capazes de se diferenciar em diferentes subtipos classificados de acordo com o perfil de citocinas que secretam fatores de transcrição ativados, que podem mediar várias funções, inclusive opostas no ambiente tumoral. Os subtipos de células T auxiliares intensamente estudados são Th1 e Th2. As células Th1 secretam principalmente IFN-gama e IL-12

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

(que também está diretamente envolvida na diferenciação desse subtipo), enquanto as células Th2 surgem em um microambiente rico em IL-4 (citocina majoritariamente secretada, juntamente com IL-5) e na ausência de IL-12.

As células Th1 são consideradas anti-tumorais, uma vez que secretam citocinas (em especial IFN- γ) induzindo a ativação de macrófagos, potencializa a resposta e aumenta o número de células T killer e células TCD8⁺, via receptores de morte na superfície das células⁵⁸. Aumentando sua capacidade de apresentar antígenos associados a tumores derivados das células tumorais mortas pelas células dendríticas⁵⁹. As células Th2 já foram descritas por desempenhar tanto funções anti-tumorais como pró-tumorais. Um estudo desenvolvido por Lorvik et al. (2016) demonstrou utilizando modelos animais que a transferência de células Th2 de forma adoptiva foi capaz de erradicar o mieloma subcutâneo. Os autores demonstraram que a persistência de células Th2 se correlacionou com imunidade duradoura e que as células Th2 transferidas foram capazes de induzir uma inflamação persistente⁶⁰. Em modelos de carcinogênese mamária (MMTV-PMT *Pulmonary Metastasis of Mammary Carcinomas*), o bloqueio *in vivo* das citocinas IL-4 inibe significativamente o risco de metástase⁶¹. Os autores discutem que a resposta Th2 pro-metastática media indiretamente o controle, por meio, em parte, dos macrófagos dentro do microambiente tumoral⁶².

Assim como nas células T, há grande plasticidade na ativação de macrófagos, levando a distintas funções efectoras⁶¹. Em parte, instruídos por células T auxiliares, os programas de ativação de macrófagos foram divididos em tipo M1 e tipo M2. Macrófagos do tipo TAM (*Tumor-associated macrophages*) são, em sua maioria, células M2 polarizadas que promovem o crescimento tumoral através da liberação de fatores angiogênicos⁶³. Resultados preliminares obtidos pelo nosso grupo demonstraram que vesículas extracelulares derivadas de HSC-3 (linhagem celular com alto potencial metastático derivada de sítio primário de OSCC) podem promover a regulação de macrófagos *in vitro* para um perfil mais próximo ao fenótipo M2 (dados não publicados, Oliveira AK e Paes Leme et al.).

Um subtipo de célula T CD4 identificado por desempenhar um papel importante na manutenção da tolerância imunológica são células T reguladoras (Tregs). A ligação entre Tregs e o desenvolvimento do tumor e supressão da imunidade antitumoral foi claramente estabelecida em diversos artigos científicos, sendo demonstrado um grande número dessas células circulantes, nas margens do tumor, nos órgãos linfóides primários e secundários em pacientes com diferentes tipos de câncer, assim como pelo seu papel direto nessa regulação. A ação das Tregs pode ocorrer no contato célula-célula ou por mediadores secretados. Existem evidências de que o antígeno de linfócito T citotóxico 4 (CTLA-4) é um potente mediador da imunossupressão induzida por Treg, em especial no primeiro momento da comunicação entre célula apresentadora de antígenos (APC) e as células T. O CTLA-4 é capaz de se ligar com alta avidéz às moléculas CD80 e CD86 presentes na superfície das APCs, promovendo uma ativação negativa das células T. As Tregs secretam potentes citocinas imunossupressoras como TGF- β e IL-10⁶⁴. Em pacientes com CECP, a frequência de células Treg foi significativamente maior em comparação aos pacientes com doença não evidente⁶⁵.

Independentemente da localização do tumor, as células T CD8⁺ e CD4⁺ parecem desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento do CECP associado ao HPV, e sua infiltração provavelmente está associada a um impacto significativo na sobrevida global e na sobrevida livre de recorrência⁶². Além disso,

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

observa-se que o perfil imunológico de HPV+ versus HPV- está associado a um desfecho significativamente melhor. Ainda, sugere-se que a resposta específica do sistema imunológico ao HPV tem influência na melhor resposta à terapia de pacientes HPV+⁶⁶. De fato, a presença ou ausência de HPV é um determinante crítico de prognóstico em tumores, principalmente nos casos de orofaringe, e os indivíduos infectados apresentam melhores respostas ao tratamento e aumento da sobrevida livre de doença e sobrevida global em 50%⁶⁷. Em relação às outras populações do sistema imune como de Tregs, macrófagos, DCs e MDSCs, não está claro ainda o seu papel e o seu valor prognóstico nesse contexto, na presença ou ausência de HPV⁶².

Resultados de uma revisão sistemática e meta-análise recente do grupo demonstrando o benefício da imunoterapia para aumentar a taxa de resposta e a sobrevida global de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, com benefício maior para pacientes HPV+ e PD-L1+⁶⁸, indica que a resposta ao tratamento desses pacientes é dependente do microambiente imune. Dessa forma, é fundamental conhecer o perfil imunológico desses pacientes para antecipar a progressão da doença e guiar as estratégias terapêuticas.

É interessante notar por um dos estudos do grupo que características clinicopatológicas e de imunossupressão entre grupos jovens e adultos são similares, mas existe uma tendência de algumas características presentes em jovens associarem com o pior prognóstico⁶⁸. Apesar de não existir consenso sobre a agressividade e prognóstico comparando-se com pacientes adultos e jovens, um estudo multicêntrico comparando a histopatologia do estroma e do epitélio entre grupos de pacientes jovens e mais velhos, indicou que a análise histológica de tecido de paciente jovens apresenta maior intensidade de tumor *buddings*, de score de risco histológico, de padrão de infiltração de invasão e de razão tumor-estroma, apesar de não significante⁶⁹.

Metabolismo e modulação de respostas imunes

O metabolismo de células tumorais tem papel na modulação de respostas imunes. Por exemplo, o uso preferencial da via glicolítica ao invés da fosforilação oxidativa, leva ao acúmulo de lactato, que pode ser transportado para o meio extracelular, onde sinaliza para células do sistema imune inibindo respostas adaptativas e citotóxicas ou modulando a resposta de macrófagos e células dendríticas para fenótipo tolerogênico. Por outro lado, citocinas e mediadores lipídicos produzidos no microambiente tumoral podem tanto levar ao recrutamento de células com perfil Th1 e citotóxico (tumores com perfil imunogênico), como podem recrutar células com perfil supressor (tumores com perfil tolerogênico). Moléculas produzidas no microambiente tumoral também podem ter efeitos sistêmicos se produzidas em quantidade suficiente para entrar na circulação sanguínea e linfática. De fato, observa-se aumento significativo na concentração de várias dessas moléculas no soro ou plasma de pacientes com câncer. Essas moléculas agem em outros tecidos, incluindo tecidos linfóides. Um dos efeitos sistêmicos de tumores sólidos é a leucocitose. Há mais de um tipo de leucocitose, mas focaremos no efeito de citocinas como G-CSF, IL-6, IL-3 e outras que podem induzir aumento da produção e mobilização de células mielóides pela medula óssea. Essas células podem ter diferentes fenótipos, sendo populações mistas, como células mieloderivadas supressoras e neutrófilos de baixa densidade, por exemplo. Apesar de mistas, essas populações têm em comum fenótipo imaturo e capacidade de suprimir respostas de linfócitos T. Com isso, efeitos sistêmicos de tumores podem envolver, pelo menos

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

parcialmente, imunossupressão⁷⁰.

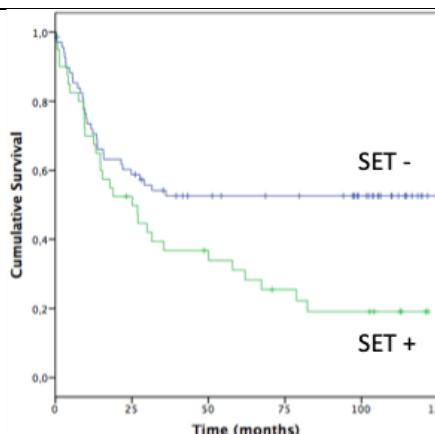
Tumores de cabeça e pescoço são considerados imunossupressores⁷¹. Porém, há bastante variação entre o perfil imunológico e metabólico desses tumores. Essa etapa do projeto focará principalmente em tumores da orofaringe. Os tumores da orofaringe têm principalmente dois tipos de etiologia, consumo crônico de tabaco e álcool, e infecção por HPV.

Os tumores HPV positivos, devido à atividade da oncoproteína E6, apresentam inativação da proteína p53, enquanto os tumores HPV negativos apresentam, com alta frequência, mutação do gene que codifica a proteína p53, muitas vezes com perda ou alteração de função. Os tumores HPV positivos têm várias características semelhantes a tumores da cérvix uterina. A atividade de p53 promove, direta ou indiretamente, o metabolismo oxidativo, enquanto inibindo a glicólise aeróbica, através da inibição de GLUT1/4, HIF1 α e c-myc e ativação de PTEN, cuja atividade inibe a ativação de Akt por PI3K. Artigos mostrando diferenças metabólicas entre tumores HPV positivos e negativos estão disponíveis na literatura, mas ainda sem consenso quanto ao perfil metabólico dos diferentes tipos de tumores.

No laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP), estudando células de câncer do colo uterino, foi identificada uma proteína diferencialmente expressa na linhagem C33A (negativa para HPV) transduzida com vetor que codifica E6 e E7 de HPV16. Foi, pelo nosso grupo, observado em ensaios de proteômica, aumento significativo de SET isoforma 2, em células transduzidas com esses genes em comparação com células transduzidas com retrovírus vazio. A proteína SET inibe a atividade da fosfatase PP2A que, por sua vez, inibe a atividade de c-Myc, através da remoção do fosfato no resíduo Ser62, o que leva à redução da meia-vida da proteína, além de c-Myc e muito relevante para tumores da orofaringe, a regulação negativa de Akt por PP2A também é importante, uma vez que a via PI3K/Akt é uma via central de regulação metabólica. A proteína SET é considerada um protooncogene e sua expressão aparece aumentada em vários tipos de tumor. Em um ensaio preliminar, testamos a expressão de SET em uma coorte de pacientes com câncer de cabeça e pescoço e observamos que sua alta expressão é um marcador de mau prognóstico, mostrando correlação com menor tempo de sobrevivência (gráfico 1). Nessa coorte, aproximadamente 10% dos casos eram HPV positivos, indicando que apesar de termos identificado SET através da indução da expressão de E6 e E7 em célula derivada de câncer do colo uterino, o mesmo pode não ser verdade para os tumores contemplados nesse projeto.

Gráfico 1. Sobrevivência de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em relação a expressão de SET.

	Descrição do Projeto - PRONON		
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento		



Fonte: O autor (2020).

Dados recentes do grupo mostram que com a progressão de lesões de alto grau para câncer invasivo do colo uterino, há um aumento significativo da expressão de STAT3 e redução significativa de p65 NFκB em células mononucleares de sangue periférico. A via de STAT3 está envolvida no processo de carcinogênese de tumores de orofaringe. A ativação do eixo IL-6/STAT3, com alta expressão de STAT3 Tyr705 fosforilada em carcinomas orofaríngeos apresenta correlação com menor sobrevivência de pacientes. Por outro lado, há um trabalho que usa a expressão de p65 NFκB juntamente com outros marcadores para dividir tumores de orofaringe HPV positivos e negativos, onde a expressão de p65 é alta em tumores HPV positivos e baixa em tumores HPV negativos. Esse mesmo artigo mostra expressão constitutiva de STAT3 nos tumores.

Importância da via Hippo no estroma do CECP

A via Hippo é uma importante via de sinalização que controla a proliferação e apoptose celular. É conservado evolutivamente em mamíferos e é estimulado pelo contato célula-célula, inibindo a proliferação celular em resposta ao aumento da densidade celular. Durante o desenvolvimento embrionário inicia a via de sinalização Hippo regula o desenvolvimento e o tamanho dos órgãos, e suas funções resultam no equilíbrio coordenado entre proliferação, apoptose e diferenciação. Seus principais efetores, YAP (Yes-associated protein) e TAZ (transcriptional coactivator with PDZ-binding motif), regulam a sinalização pelas células-tronco embrionárias e determinam o destino e a histogênese das células⁷². A disfunção dessa via contribui para o desenvolvimento do câncer^{73,74}

Vários estudos de análise genômica, demonstram amplificação e a superexpressão do YAP / TAZ nos CECP, inferindo a sua função oncogênica⁷⁵. O nível de expressão de YAP parece ser maior nos tecidos de carcinoma oral do que nos tecidos normais adjacentes e o YAP poderia conduzir a transcrição dos genes bcl-2 e c-myc, levando subsequentemente à resistência à apoptose. A expressão de TAZ foi significativamente maior em células e espécimes de carcinoma de língua do que em células não-cancerígenas e na mucosa normal, significativamente associado ao tamanho do tumor, grau patológico, estágio clínico, expressão de Ki-67, redução geral e sobrevida livre de doença⁷⁵.

A fibrose (desmoplasia) do estroma tumoral é caracterizada por síntese excessiva, remodelação e contração da matriz extracelular produzida pelos miofibroblastos. Para desenvolver terapias anti-fibróticas, é

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

de suma importância entender as bases moleculares das vias de sinalização que contribuem para a ativação e manutenção dos miofibroblastos. Várias vias de transdução de sinal, como fator de crescimento transformador (TGF) β , Wntless/Int (WNT) e mais recentemente proteína 1 (YAP)/coativador transcricional associado à sinalização de motivo de ligação a PDZ (TAZ), foram ligadas à fisiopatologia da fibrose⁷⁶. Em contraste, nas células epiteliais, o YAP / TAZ é ativado pela ruptura da polaridade celular e pelo aumento da rigidez da MEC nos tecidos fibróticos, o que promove a proliferação e sobrevivência das células epiteliais. O YAP / TAZ também está envolvido na transição epitelial-mesenquimal (EMT), que contribui para a progressão do tumor e a formação de câncer⁷⁷.

Os fibroblastos associados a câncer (CAFs) surgem da população de fibroblastos circulantes e coevoluem com o tumor desenvolvendo um fenótipo distinto e desempenhando um papel ativo na carcinogênese⁷⁸. Frequentemente, demonstram acúmulo ultraestrutural de actina do músculo liso α (α -SMA), característica da diferenciação miofibroblástica. No CECP, os CAFs frequentemente apresentam esse fenótipo miofibroblástico e estão associados à deposição densa de colágeno e desmoplasia do estroma. CAFs também são caracterizados pela expressão da integrina $\alpha 6$, que é crítica para a adesão celular e sinalização da superfície.

A mutação mais frequentemente identificada no CECP não relacionado ao HPV ocorre no gene TP53, que ocorre em aproximadamente metade dos casos e é provavelmente um evento precoce, já que é encontrada também em lesões pré-malignas. É interessante que estas mutações, parece estar associada com aumento da migração dos CAFs para o TME através da produção de CXCL12⁷⁹. Além disso, a inativação de FAT1 (deleção/ mutações) ou a ativação de PIK3CA (superexpressão) estão associadas à ativação transcricional dependente de YAP no CECP⁸⁰. Os mecanismos moleculares precisos nesta interação não são totalmente compreendidos, mas em outras linhagens epiteliais o PI3K ativado recruta PDK1 para a membrana plasmática, interrompendo sua associação com as quinases do complexo central Hippo e promovendo a desfosforilação de YAP^{80,81}.

A resistência a medicamentos é outro grande desafio no tratamento do câncer e a desregulação da sinalização da YAP/TAZ pode ser um mecanismo de resistência intrínseca adquirida durante as várias terapêuticas utilizadas⁸². Eventualmente, uma estratégia contra o YAP/TAZ poderia impedir ou pelo menos retardar a progressão dos CECP.

Biópsia Líquida no diagnóstico e seguimento do CECP

O prognóstico para os pacientes com CECP é determinado principalmente pelo estadiamento clínico ao diagnóstico. Uma parcela dos pacientes apresenta tumor em estágio avançado no momento do diagnóstico, sendo que 43% deles apresentam metástase em linfonodos regionais e 10% com metástase à distância⁸³. O diagnóstico precoce da doença é frequentemente prejudicado pela natureza assintomática desses tumores e apenas um terço dos pacientes é diagnosticado com tumores em estágio precoce da doença⁸⁴. Desta maneira, é clara a necessidade do desenvolvimento de novas metodologias com maior sensibilidade e especificidade para auxiliar no diagnóstico precoce.

Atualmente, diversos estudos têm investigado o uso e aplicabilidade das biópsias líquidas como uma

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

técnica diagnóstica e de monitoramento, a qual tem se mostrado muito eficiente por ser pouco invasiva e com potencial de ser mais sensível que as técnicas atuais. A biópsia líquida consiste em detectar componentes derivados do tecido tumoral em fluídos corporais, como plasma, saliva, urina, entre outros. Esta abordagem é fundamental no monitoramento da resposta a tratamentos oncológicos e na detecção de progressão tumoral e recidiva, assim como no diagnóstico precoce de câncer. Os principais componentes do plasma e saliva que têm sido explorados e já se mostraram eficazes na detecção da presença de tumor no organismo são o DNA tumoral circulante (ctDNA), as células tumorais circulantes (CTCs) e as vesículas extracelulares (VEs) derivadas do tumor e seu microambiente⁸⁵.

As alterações gênicas podem também ser pesquisadas no DNA circulante, pela análise de ctDNA. Esses biomarcadores sanguíneos têm o potencial de refletir a carga tumoral e fornecer informações sobre o comportamento longitudinal do tumor, desde que amostras sejam coletadas ao longo da evolução do paciente. A análise de ctDNA tem sido cada vez mais utilizada no ambiente clínico para testar mutações somáticas específicas em genes *drivers* em câncer⁸⁶⁻⁸⁸. Consiste predominantemente em pequenos fragmentos de DNA (~140-200 pb) e é derivado de tecidos normais e malignos. O ctDNA é liberado na corrente sanguínea após a morte celular e os níveis estão relacionados ao estágio e prognóstico do tumor^{89,90}. Potenciais aplicações clínicas da análise do ctDNA incluem rastreamento, prognóstico, monitoramento da carga da doença, avaliação de resposta ao tratamento, detecção de doença residual mínima e detecção precoce de recidiva tumoral⁹¹. Os níveis de ctDNA alteram com o tempo e em resposta ao tratamento. Um aumento do nível de ctDNA tem sido frequentemente correlacionado com maior carga de doença em vários tipos de câncer, como melanoma⁹², ovário e mama⁹³, cólon⁹⁴ e próstata^{95,96}.

Em CECF embora a literatura seja bem mais escassa se comparada a outros tipos tumorais, os estudos explorando o uso de ctDNA como ferramenta no diagnóstico, prognóstico e seguimento da doença, tem resultados preliminares promissores (revisto por Galot and Machiels 2020). Diferentes estudos utilizando uma abordagem direcionada detectaram no plasma a presença de mutações oncogênicas acionáveis nos genes *PIK3CA*⁹⁷, *HRAS*⁹⁸, *TP53*⁹⁹, entre outros, e biomarcadores relacionados ao HPV¹⁰⁰ para uso como prognóstico ou preditores para estabelecer e ajustar uma terapia direcionada. Com propósitos semelhantes, estudos focados em padrão de metilação¹⁰¹ alterações em microssatélite¹⁰² ou no número de cópias¹⁰³ também foram realizados.

Outro componente das biópsias líquidas são as vesículas extracelulares (VE). Exossomos são corpos multivesiculares maduros de membrana dupla (MVBs) com 30 a 150 nm, originários da via endossômica¹⁰⁴. Os exossomos desempenham importante gama de funções extracelulares, que incluem interações com o microambiente celular por meio de mediação imunológica, recrutamento celular e transferência horizontal de material genético^{105,106}. Além disso, o conteúdo dos exossomos geralmente sofre mudanças dinâmicas, que reflete sua origem e o estágio da doença, sendo assim alvos importantes para a descoberta de biomarcadores¹⁰⁷.

Os exossomos têm sido descritos como promotores da progressão tumoral¹⁰⁸. Melo et al., (2014) demonstraram como os exossomos liberados pelas células tumorais mamárias podem fazer com que as células dos tecidos epiteliais adjacentes se transformem em células tumorais. Além disso, fibroblastos associados ao

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

tumor (CAFs), que são as células mais abundantes no microambiente tumoral, são capazes de liberar exossomos que transferem microRNAs (miRs -21, -378e, e -143) e proteínas que aceleram o crescimento tumoral¹⁰⁹. Os efeitos dos exossomos liberados pelo CEC de cavidade oral no microambiente tumoral e no processo de metástase à distância não são ainda completamente conhecidos.

Os ncRNA exercem papel no tecido tumoral e podem ser encontradas em diversos biofluidos como plasma, soro, saliva, urina, entre outros¹¹⁰, podendo circular protegidos dentro de vesículas extracelulares, como exossomos e microvesículas, ou associados a proteínas circulantes^{109,111}. Kawakubo-Yasukochi et al. (2017) demonstraram que o miR-200c-3p é um miRNA oncogênico capaz de induzir potencial invasivo em células não invasivas dentro de uma massa tumoral em CE de cavidade oral¹¹². Outros trabalhos identificaram o papel do miRNA-26a e miRNA-26b na modulação da migração e invasão¹¹³ e a associação da expressão do miRNA-21 circulante à expressão de HIF-1 α / HIF-2 α , estágio T e metástase linfonodal em pacientes com CE de cavidade oral¹¹⁴. Estudos anteriores relatam que moléculas de miRNA são fluidos corporais específicas, provavelmente exercendo papéis funcionais associados aos tecidos circundantes¹¹⁵. A saliva, um fluido corporal de fácil acesso e próximo aos sítios envolvidos no CECP, é uma amostra de acesso não invasivo promissora para a detecção de biomarcadores. Devido à troca de substâncias entre sangue e os tecidos durante a circulação e ao extenso suprimento sanguíneo nas glândulas salivares, as moléculas presentes nesses tecidos e no plasma provavelmente também estão presentes na saliva¹¹⁶. Os ncRNAs integram uma parte importante dos exossomos salivares e são capazes de alterar conteúdo protéico de células receptoras desempenhando um papel na proliferação e morte celular, bem como na resposta imune¹¹⁷. As informações disponíveis neste campo são limitadas e muito recentes. A maior parte concentra-se na quantificação e qualificação dos ncRNAs no tecido tumoral e na comparação com tecido não tumoral, bem como, na detecção de exossomos no plasma ou na saliva.

6. Justificativa

O CECP tem alta incidência, apresenta alta mortalidade e morbidade e resulta em alto custo para o sistema de saúde no Brasil. Além do mais, o CECP é pouco compreendido quando não relacionado a fatores etiológicos conhecidos, em parte pelos poucos estudos realizados. Neste projeto, investigaremos diversos aspectos dessa doença, como foco em pacientes não tabagistas e não etilistas, assim como em jovens. Com isso, buscaremos melhorias em estratégias de prevenção (primária e secundária), diagnóstico e tratamento, com base na integração de dados epidemiológicos e moleculares. As mudanças de hábitos e estilo de vida (diminuição do uso do tabaco, aumento do consumo de álcool e alta incidência de infecção pelo vírus do papiloma humano) requerem uma melhor caracterização deste novo perfil de pacientes com lesões malignas em idade precoce. Para isso, propomos realizar um estudo caso-controle para a busca de fatores de susceptibilidade, além de uma coorte de pacientes para avaliação da trajetória no serviço de saúde, impacto socioeconômico e seguimento oncológico com estudo de novas estratégias de seguimento oncológico (**Subprojeto 1 – Epidemiologia, perfil clínico e qualidade de vida**).

Também investigaremos a existência de possíveis novos fatores etiológicos biológicos pela

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

caracterização do microbioma oral de pacientes com CECP sem fatores de risco aparente. O sequenciamento do exoma e análise de polimorfismos pontuais na linhagem germinativa também será aplicado com o objetivo de revelar variações genéticas de predisposição ao CECP em pacientes com histórico familiar, podendo contribuir para o rastreamento e prevenção em indivíduos com alto risco. A análise genômica e transcriptômica do CECP permitirá a expansão do conhecimento de mutações driver, não apenas em regiões codificadoras, mas também em regiões não codificadoras e identificar variantes estruturais, com foco em pacientes jovens (**Subprojeto 2 – Metagenômica e perfil molecular**).

A influência de componentes do microambiente tumoral na tumorigênese, progressão e resposta a terapias também será estudada (**Subprojeto 3 - Microambiente tumoral**). Esses resultados poderão contribuir para o esclarecimento da carcinogênese nestes indivíduos, detecção de possíveis alvos de tratamento e para o desenvolvimento de estratégias de tratamento de precisão. Modelos baseados em cultura primária, zebrafish e xenotransplante derivado de pacientes serão estabelecidos para corroborar as hipóteses geradas e para o teste de combinações de tratamentos (**Subprojeto 4 - Estudos funcionais**).

Informações obtidas durante as etapas preliminares de caracterização molecular serão também utilizadas para a construção de painéis moleculares para uso em biópsias líquidas. Serão incluídas análises de DNA tumoral circulante (ctDNA) e vesículas extracelulares (VEs) séricas e de saliva para verificar o seu possível papel no manejo desses pacientes (**Subprojeto 5 - Papel da biópsia líquida**).

Dessa forma, com a integração dos dados epidemiológicos, moleculares, clínicos e patológicos, será possível gerar ferramentas com utilidade na prevenção, diagnóstico, seguimento personalizado, estratificação de recorrência/óbito e melhor direcionamento das estratégias terapêuticas e de seguimento para pacientes com CECP.

7. Hipótese

- O estudo epidemiológico permitirá conhecer o perfil mais atual de pacientes com CECP em nossa população. Essa etapa também poderá revelar o impacto no atraso de diagnóstico e tratamento na evolução clínica do paciente, e do impacto do tratamento na qualidade de vida. O perfil epidemiológico habitualmente observado caracteriza-se por homens entre 5ª e 6ª década de vida, tabagistas e etilistas. Esse padrão norteia tanto as ações de educação em saúde e screening, como também a prática clínica. No entanto, observa-se um número crescente de pacientes mais jovens, não tabagistas ou etilistas, com CECP. Essa mudança de perfil ainda não foi incorporada às estratégias de prevenção ou detecção precoce. A prática clínica nos serviços especializados demonstra que o diagnóstico para esse grupo específico de pacientes é negligenciado, tanto por falta de conhecimento da população, como de profissionais de saúde da atenção primária. Por esse motivo, esse estudo pretende entender os fatores envolvidos nesta mudança de perfil epidemiológico, para que sejam propostas ações visando à prevenção e o diagnóstico precoce de pacientes cada vez mais jovens.
- Devido ao aumento da incidência do CECP sem a presença de fatores etiológicos bem

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

estabelecidos, como o consumo de tabaco, álcool e infecção pelo HPV, novos fatores biológicos podem estar relacionados com a carcinogênese. Esses potenciais agentes podem ser identificados pela associação de estudos epidemiológicos e por metodologias de metagenômica.

- O CECP surge também em indivíduos com história familiar de câncer, porém, muitos não possuem mutações germinativas conhecidamente relacionadas a esse tipo de neoplasia. A identificação de novas mutações germinativas patogênicas ou combinação de variantes de baixa penetrância pode ser útil no rastreamento e prevenção do câncer e auxiliar no aconselhamento genético de familiares.
- A biologia do CECP de indivíduos sem a presença de fatores de risco aparentes e de pacientes jovens é pouco compreendida, em parte pelos poucos estudos realizados. A caracterização ampla de alterações em níveis genômicos e transcricionais pode permitir a expansão do conhecimento de alterações drivers, e assim contribuir para o esclarecimento da carcinogênese nestes indivíduos e detecção de possíveis alvos de tratamento.
- O microambiente tumoral tem papel determinante na progressão tumoral, com uma complexa interação entre células tumorais e células do sistema imune, fibroblastos, células endoteliais entre outras. A caracterização dessas interações e moléculas participantes pode levar ao desenvolvimento de novas possibilidades terapêuticas.
- As alterações moleculares tumorais identificadas podem também ser pesquisadas em biofluidos. A biópsia líquida tem o potencial de estimar a carga tumoral e fornecer informações sobre o comportamento longitudinal do tumor. O desenvolvimento de painéis de biomarcadores tumorais para uso em biópsias líquidas pode ter grande desempenho e aplicabilidade no diagnóstico/seguimento e prognóstico desses pacientes.
- Recentemente, tem aumentado o interesse no desenvolvimento de modelos funcionais que possam reter as principais características histológicas e genéticas do tumor do doador e permanecer estável em todas as passagens. Esses modelos demonstram poder preditivo de resultados clínicos e estão sendo usados como alternativas de medicina personalizada. Dessa forma, iremos usar essa estratégia para teste de fármacos e confirmar hipóteses derivadas de análises de biologia de sistemas para gerar métodos de personalização de tratamento nesses pacientes.

8. Objetivos

Geral

Compreender as diferenças na caracterização epidemiológica, clínica e molecular dos pacientes brasileiros com CECP em diferentes faixas etárias, bem como suas implicações no atraso do diagnóstico, impacto em qualidade de vida e na aperfeiçoamento de programas de prevenção, detecção precoce e decisões terapêuticas.

Subprojeto 1

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

- 1.1. Caracterização clínica e epidemiológica de pacientes com CECP (*workpackage 1.1*);
- 1.2. Avaliar a trajetória dos pacientes no serviço de saúde, bem como atrasos no tempo até o diagnóstico e tratamento (*workpackage 1.2*);
- 1.3. Avaliar a qualidade de vida de pacientes com CECP e o impacto econômico da doença para o indivíduo e a sociedade (*workpackage 1.3*).

Subprojeto 2

- 2.1. Identificar novos fatores etiológicos biológicos associados ao CECP em indivíduos sem fatores de risco aparente (*workpackage 2.1*);
- 2.2. Identificar alterações germinativas e polimorfismos genéticos relacionados ao aumento de risco ao CECP em pacientes jovens e/ou com histórico familiar de câncer e/ou não fumantes e HPV negativo (*workpackage 2.2*);
- 2.3. Identificar alterações somáticas em CECP de pacientes jovens e/ou não relacionados ao tabagismo, ao etilismo e ao HPV (*workpackage 2.3*);
- 2.4. Avaliar o papel do remodelamento da matriz extracelular mediado por microRNAs nos pacientes acometidos por CE da cavidade oral, orofaringe e laringe (*workpackage 2.4*);

Subprojeto 3

- 3.1. Caracterização do componente imunológico do carcinoma oral (*workpackage 3.1*);
- 3.2. Análise de componentes de vias de regulação metabólica na modulação de respostas imunes em carcinoma de orofaringe (*workpackage 3.2*);
- 3.3. Estudar a expressão de proteínas relacionadas ao estroma do microambiente tumoral no contexto da mecanotransdução em casos de CECP de cavidade oral e orofaringe, avaliando-os como possíveis marcadores prognósticos e alvos terapêuticos (*workpackage 3.3*).

Subprojeto 4

4. Estabelecer modelos para estudos funcionais de CECP.

Subprojeto 5

- 5.1. Avaliar o possível papel da biópsia líquida para o manejo de pacientes com CECP.

Específico

Subprojeto 1

- Comparar os achados referentes à caracterização clínica e epidemiológica dos pacientes com CECP com menos de 40 anos, e/ou não tabagistas e etilistas com o perfil clínico e epidemiológico da população mundial em geral revista em literatura e de diferentes centros de oncologia no Brasil;
- Identificar a prevalência de HPV nessa população, e correlacionar com os dados conhecidos para a população mundial e de outros centros brasileiros;

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

- Avaliar a trajetória nos serviços de saúde e o tempo até o diagnóstico e tratamento dos pacientes com CECP, e comparar de acordo com faixas etárias;
- Verificar o impacto na qualidade de vida e na produtividade no trabalho de pacientes após o tratamento por CECP, através da aplicação de questionários específicos;
- Verificar o impacto econômico da doença e tratamento para o indivíduo e sociedade.

Subprojeto 2

- Analisar a microbiota da cavidade oral de pacientes jovens e/ou não tabagistas e etilistas para identificar agentes biológicos previamente não associados ao CECP;
- Elaborar estratégias de prevenção, detecção e erradicação dos novos patógenos identificados;
- Identificar mutações germinativas patogênicas em genes de predisposição ao câncer em pacientes com histórico familiar;
- Identificar polimorfismos genéticos associados ao risco, evolução, tratamento e prognóstico da doença e quando possível, relacionar com os dados de perfil de inflamação;
- Identificar mutações somáticas e variantes estruturais *driver* em regiões codificadoras e não codificadoras em pacientes jovens e/ou não tabagistas e etilistas;
- Comparar as principais alterações genéticas e epigenéticas encontradas com os achados do TCGA, e compará-las aos achados de pacientes de demais faixas etárias, tabagistas e etilistas;
- Verificar expressão diferencial de mRNA e RNAs não codificantes (microRNAs e lncRNA) em pacientes com linfonodos comprometidos e não comprometidos;
- Identificar potenciais transcritos alvo dos ncRNA circulantes em plasma, através de ferramentas de bioinformática;
- Determinar a expressão dos transcritos identificados pela análise *in silico*, em células metastáticas no linfonodo;
- Relacionar os microRNAs diferentemente expressos com os respectivos alvos moleculares envolvidos nos processos biológicos através da análise de marcadores imunistoquímicos;
- Correlacionar dados clínicos com as alterações moleculares encontradas.

Subprojeto 3

- Selecionar e otimizar a análise de peptídeos referentes às proteínas-marcadoras das populações de células do sistema imune - neutrófilos, monócitos, células NK e linfócitos T CD8+, células T CD4+ - por proteômica baseada em alvos utilizando monitoramento seletivo de reações (SRM);
- Quantificar por SRM as proteínas que caracterizam as populações de células do sistema imune em papa leucocitária de pacientes com CE oral;
- Correlacionar a abundância das proteínas-marcadoras com os desfechos clínicos;

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

- Selecionar as proteínas-marcadoras com potencial de classificação e construir um modelo preditivo;
- Correlacionar a abundância das proteínas-marcadoras selecionadas com análise de quantificação e caracterização baseada em citometria de fluxo para validação dos anticorpos;
- Desenvolver um ensaio de ELISA quantitativo baseando-se nas proteínas-marcadoras selecionadas;
- Validar o modelo preditivo em amostras independentes;
- Transferir o método de ELISA quantitativo para prover acessibilidade do teste aos laboratórios de medicina diagnóstica;
- Estudar a expressão de SET, PP2A e c-Myc em amostras de câncer de orofaringe por imunohistoquímica;
- Determinar a frequência de populações mielóides e linfóides circulantes em sangue periférico;
- Comparar o perfil de expressão gênica e proteômica entre células mononucleares de sangue de pacientes com câncer de orofaringe e voluntários clinicamente saudáveis;
- Determinar a frequência de populações mielóides com fenótipo supressor em sangue periférico de pacientes com carcinoma de orofaringe e estudo da expressão de STAT3 e NFκB nas PBMCs;
- Determinar a expressão de STAT3 e p65 NFκB em carcinoma orofaríngeo para comparação com dados sistêmicos;
- Avaliar a expressão protéica do YAP/TAZ nos CECP e correlacionar com os parâmetros clínicos e histopatológicos, em especial com os subtipos histológicos;
- Avaliar a expressão protéica de TGF-β e WNT e correlacioná-la com a expressão protéica do YAP/TAZ e os parâmetros clínicos, histopatológicos, presença de fibrose e inflamação no microambiente tumoral e padrões de invasão.

Subprojeto 4

- Estabelecer cultura primária de células de CECP;
- Avaliar sensibilidade de CECP a fármacos, usados e/ou com potencial uso na prática clínica, em modelo de PDX em Zebrafish;
- Avaliar sensibilidade de CECP a fármacos em modelo de PDX com camundongos.

Subprojeto 5

- Verificar a eficiência e aplicabilidade do uso de ctDNA em plasma e saliva no seguimento e prognóstico do paciente;
- Avaliar a expressão de ncRNAs previamente identificados no tecido tumoral, em vesículas extracelulares do tipo exossomal circulantes em plasma e saliva;
- Verificar a eficiência e aplicabilidade da quantificação e caracterização molecular de

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

vesículas extracelulares no prognóstico do CECP;

- Comparar o desempenho de métodos de biópsia líquida baseados na análise de plasma e saliva e de ctDNA e vesículas extracelulares.

9. Procedimentos Metodológicos

Desenho do Estudo

O estudo será epidemiológico, exploratório, longitudinal, experimental, envolvendo pesquisa básica e translacional, com coleta prospectiva e retrospectiva de material de estudo.

É importante ressaltar que este projeto considera:

- Pacientes adultos jovens: indivíduos com idade entre 18 (idade mínima permitida no Icesp) e 39 anos de idade no momento do diagnóstico, de acordo com o U.S.Department of health inhuman services, NIH (<https://www.cancer.gov/types/aya/research/ayao-august-2006.pdf>)
- Pacientes não-tabagistas (“never smoker”): um adulto que nunca fumou ou fumou menos de 100 cigarros durante toda a vida (https://www.cdc.gov/nchs/nhis/tobacco/tobacco_glossary.htm);
- Não-etilistas (“former and current infrequent drinker”): menos de 12 drinques em qualquer ano, inclusive no último ano (https://www.cdc.gov/nchs/nhis/alcohol/alcohol_glossary.htm, acesso em 30/07/2021).

O estudo epidemiológico será do tipo caso-controle, composto por pacientes portadores de CECP e controles saudáveis, pareados por idade e sexo. Adicionalmente, será realizado estudo caso-caso, em que pacientes jovens ou não tabagistas nem etilistas serão comparados a pacientes com mais de 40 anos, tabagistas e etilistas. Os casos e controles serão entrevistados por meio de um questionário sobre estilo de vida que investiga os hábitos de vida, como tabagismo, etilismo assim como a infecção pelo HPV, histórico de câncer na família, histórico de câncer em jovens na família e histórico de tabagismo dos pais. O questionário será online e será salvo em banco de dados do núcleo de epidemiologia e estatística. Para os casos serão incluídas as informações clínico-patológicas como morfologia do tumor e estadiamento clínico e patológico. Serão colhidas também informações sobre a trajetória dos pacientes no serviço de saúde a partir da queixa principal.

O estudo utilizará amostras coletadas e armazenadas no Biobanco Institucional (tecido congelado, sangue venoso periférico e saliva, conforme necessidade de cada subprojeto), tanto em amostras já existentes para estudos retrospectivos como em amostras a serem incluídas prospectivamente. As amostras de swab oral serão coletadas e armazenadas como biorrepositório. Os pacientes que aceitarem participar da pesquisa assinarão o TCLE específico deste estudo e o TCLE do Biobanco. Deste modo, após a utilização da amostra

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

nos experimentos deste estudo, eventual amostra sobressalente ficará armazenada no Biobanco da Instituição.

Participantes de pesquisa e tamanho amostral

Todos os subprojetos serão desenvolvidos com base na coleta prospectiva de amostras de pacientes com câncer de cabeça e pescoço diagnosticados em idade jovem ou pacientes que não apresentam fatores de risco clássicos.

A análise de Genome Wide Association (GWAs) será aplicada no subprojeto 2 e incluirá todos os pacientes prospectivos e os pacientes retrospectivos que fizeram parte dos projetos de pesquisa tipo caso-controle intitulados "Avaliação de polimorfismos genéticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço" (CAPPesq n°115/03) e "Marcadores Moleculares provenientes de pacientes de carcinoma epidermóide de cavidade oral" (CAPPesq n°148/05) e (Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis n°374). (aprovações em anexo).

No subprojeto 3, estudo do microambiente tumoral, serão incluídas amostras de arquivo (emblocadas em parafina, depositadas no Serviço de Patologia do ICESP), bem como amostras obtidas de modo prospectivo. Neste caso, foram priorizadas amostras de câncer de cavidade oral e orofaringe.

Critérios de inclusão

Todos os indivíduos atendidos no ICESP/HC-FMUSP com diagnóstico de CEC de cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe nos primeiros 24 meses do projeto são potenciais candidatos para a inclusão. Também será incluído um grupo de pacientes sem câncer, de base hospitalar, atendidos por condições que não compartilhem fatores de risco com os casos. Indivíduos que aceitarem participar no estudo deverão assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Os participantes com CEC de cavidade oral deverão estar codificados de acordo com o CID-O3, segundo as seguintes topografias – cavidade oral (C00-06), orofaringe (C09-10), hipofaringe (C12-13) e laringe (C32).

Critérios de exclusão

Serão excluídos pacientes que apresentam outros tumores previamente tratados ou cânceres sincrônicos, exceto câncer de pele não melanoma. Pacientes com metástase à distância ou doenças crônicas debilitantes concomitantes também serão excluídos do estudo.

Estimativa do tamanho de amostra

Com base na rotina do serviço de cirurgia de cabeça e pescoço, estimamos a inclusão de aproximadamente 240 casos nos 2 primeiros anos do estudo. Estes pacientes serão incluídos em todos os estudos clínicos, com o pareamento de um número aproximado de controles saudáveis. Para os estudos moleculares, serão incluídos casos selecionados de acordo com o objetivo específico do subprojeto e ou do *workpackage*. Em relação aos pacientes jovens, foram registrados no ICESP, 60 pacientes com carcinoma de

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

cabeça e pescoço (excluindo carcinoma de nasofaringe) com idade até 39 anos, entre os anos 2008 e 2015. Quanto aos hábitos, cerca de 15% dos pacientes atendidos por CECP não fumavam ou bebiam. Desta forma, cerca de 38 pacientes ao ano apresentam esse perfil.

Para o projeto em específico, serão incluídos, pelas estimativas institucionais, ao menos 10 pacientes jovens ao ano. O que, em um período de 2 anos, acarretaria entre 15 e 20 pacientes provenientes apenas do complexo ICESP-HCFMUSP. O segundo grupo de 30 pacientes não tabagistas e não etilistas independe da faixa etária e, de acordo com nossa estimativa baseada em análises prévias, cerca de 30% dos pacientes admitidos não são tabagistas ou etilistas. Deste modo, prevemos um total de recrutamento de até 30 pacientes ao ano, com este perfil. Em caso de não alcançarmos a meta de recrutamento para os primeiros 12 meses, incluiremos pacientes SUS do A.C. Camargo Cancer Center e adotaremos a estratégia de recrutamento ativo em outros serviços ligados ao SUS no Estado de São Paulo. Em resumo: o alcance do número de pacientes propostos para o estudo é factível.

Os cálculos de tamanho de amostras por subprojeto são apresentados a seguir.

Subprojeto 1: Epidemiologia, perfil clínico e qualidade de vida

No total, são previstos aproximadamente 50 casos com dados clínicos e epidemiológicos de pacientes com CECP jovens ou não tabagistas / não etilistas levantados prospectivamente.

Estudos prévios com pacientes jovens e/ou não-tabagistas / não-etilistas incluem naturalmente um número limitado de participantes, excetuados análises de dados agrupados de consórcios internacionais. No caso do presente estudo, propõe-se incluir toda a população de pacientes, não sendo possível a ampliação do número de participantes sem prejuízo à homogeneidade do grupo, o que levaria a possível viés de seleção e dificuldade de interpretação dos achados. Nesse sentido, considerando um erro alfa de 5% e beta de 80%, calcula-se que será possível detectar uma diferença mínima de 29% na incidência dos desfechos avaliados entre os grupos de comparação nas análises, incluindo pacientes com coleta de dados prospectivos. Nas análises que utilizarão apenas os dados coletados prospectivamente, será possível detectar uma diferença de, no mínimo, 43% entre os grupos caso e controle. A análise foi realizada utilizando o software estatístico G-Power.

Subprojeto 2: Metagenômica e perfil molecular

Metagenômica: Casos (n=50) controles saudáveis pareados por idade e sexo (n=50).

O perfil molecular do tumor de pacientes jovens e/ou sem fatores de risco clássicos ainda não está bem caracterizado. Em relação ao sequenciamento completo do genoma, encontram-se descritos 13 casos na literatura de pacientes jovens (ICGC/TCGA Pan-Cancer Analysis of Whole Genomes Consortium. Pan-cancer analysis of whole genomes. Nature. 2020 Feb;578(7793):82-93. doi: 10.1038/s41586-020-1969-6).

Para o cálculo de amostra do grupo de participantes jovens e/ou sem fatores de risco habituais, usamos o conceito de população finita. Supondo-se uma população finita de 20 participantes (jovens ou sem fatores de risco habituais) em 2 anos, uma prevalência de 50% de pacientes que apresentarão variantes novas no sequenciamento do genoma, erro alpha de 5% e precisão de 6%, calcula-se uma amostra de 19

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

participantes para sequenciamento do genoma em 2 anos.

- a) **Grupo controle:** Para o estudo molecular, será utilizado como grupo referência, dados disponíveis em bancos públicos de pacientes acima de 40 anos com histórico de etilismo e tabagismo. Como não se trata de uma análise relativa, esta tem sido a estratégia habitual, desde que dados suficientes de participantes acima de 40 encontram-se disponíveis em banco de dados públicos como o bioportal (disponível em: <https://www.cbioportal.org/>).
- b) **Polimorfismos associados ao risco:** No total, são previstos aproximadamente 100 casos (50 casos com dados e material biológico levantados retrospectivamente e aproximadamente 50 casos com dados prospectivos). Além disso, são previstos dois grupos de comparação (controles) que incluem 150 controles saudáveis e 150 pacientes com CECP acima de 40 anos e tabagistas/etilistas. Os pacientes com coleta prospectiva serão os mesmos incluídos em todos os outros subprojetos. O cálculo amostral para o estudo de Genome Wide Association (GWAs) foi realizado utilizando o G*Power Versão 3.1.9.6. Foram levadas em consideração as frequências dos SNPs já associados ao câncer de cabeça e pescoço em estudos de GWAs e o poder do teste de 80% com duas caudas. Além disso, como o câncer de cabeça e pescoço é um evento raro em indivíduos abaixo de 40 anos e/ou não tabagistas e etilistas, consideramos a proporção máxima de 1 caso para 3 controles. Dessa forma, chegamos ao número amostral de 99 casos (indivíduos jovens e/ou não tabagistas e etilistas com diagnóstico de CEPC) e 297 controles (grupo que inclui tanto pacientes com diagnóstico de CEPC acima de 40 anos e/ou tabagistas e etilistas, quanto o pacientes saudáveis), conforme cálculo em anexo.

Subprojeto 3 – Microambiente tumoral

a) **Papel da proteína SET por imunohistoquímica:** Nossa estimativa é utilizar os casos de 60 pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço (excluindo carcinoma de nasofaringe) com idade até 39 anos, entre os anos 2008 e 2015 atendidos e recrutados no ICESP. Dados anteriores do laboratório, em uma coorte de 109 pacientes com câncer de cabeça e pescoço, indicaram taxa de risco para menor sobrevida 1,85 vezes maior nos pacientes com tumores com expressão positiva de SET (resultado significativo, $p=0,021$). Com os dados desse estudo preliminar, nós calculamos que será possível medir o efeito de SET nas amostras previstas no estudo aqui proposto.

b) **Caracterização do componente imunológico do carcinoma oral:** Serão incluídos os participantes do subprojeto 2. Vários estudos demonstram que tumores apresentam efeitos sistêmicos sobre células do sistema imune de pacientes. Dados anteriores do nosso laboratório demonstraram que para parâmetros como detecção de frequência alterada de populações, como células mieloderivadas supressoras, o tamanho do efeito foi muito bom, com índice de Cohen maior que 2 (dados preliminares ainda não publicados, auxílio FAPESP 2018/16989-5); para parâmetros

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

como alteração da expressão de fatores de transcrição em leucócitos circulantes, tivemos índice de Cohen de 0,8, indicativo também de tamanho do efeito bastante robusto (Alvarez et al, 2017. Local and systemic immunomodulatory mechanisms triggered by Human Papillomavirus transformed cells: a potential role for G-CSF and neutrophils. Sci. Rep. 2017; 7(1):9002. DOI 10.1038/s41598-017-09079-3). Com isso, a previsão de uso de 20 amostras de pacientes deverá ser suficiente para que possamos fazer tanto análise fenotípica das células circulantes, como uma análise mais refinada, com estudo de fatores transcrição, estado redox e outros parâmetros indicativos de atividade das células moduladas por câncer.

O tamanho amostral apresentado para este trabalho foi baseado em considerações estatísticas a fim de se obter uma conclusão confiável da pesquisa proposta. O tamanho amostral calculado foi baseado a fim de se obter um nível de confiança de no mínimo 80% com margem de erro de no máximo 10%, levando em consideração um tamanho populacional igual a 355 mil, ou seja, o número de casos de câncer oral detectado no mundo em 2018 e divulgado pelo GLOBOCAN (BRAY et al., 2018; DUPONT; PLUMMER, 1990). É importante ressaltar que o nível de confiança e erro percentual foram selecionados considerando também a disponibilidade de amostras dentro dos critérios de inclusão e exclusão para o desenvolvimento do trabalho.

A equação 1 utilizada para o cálculo do tamanho amostral pode ser descrita como:

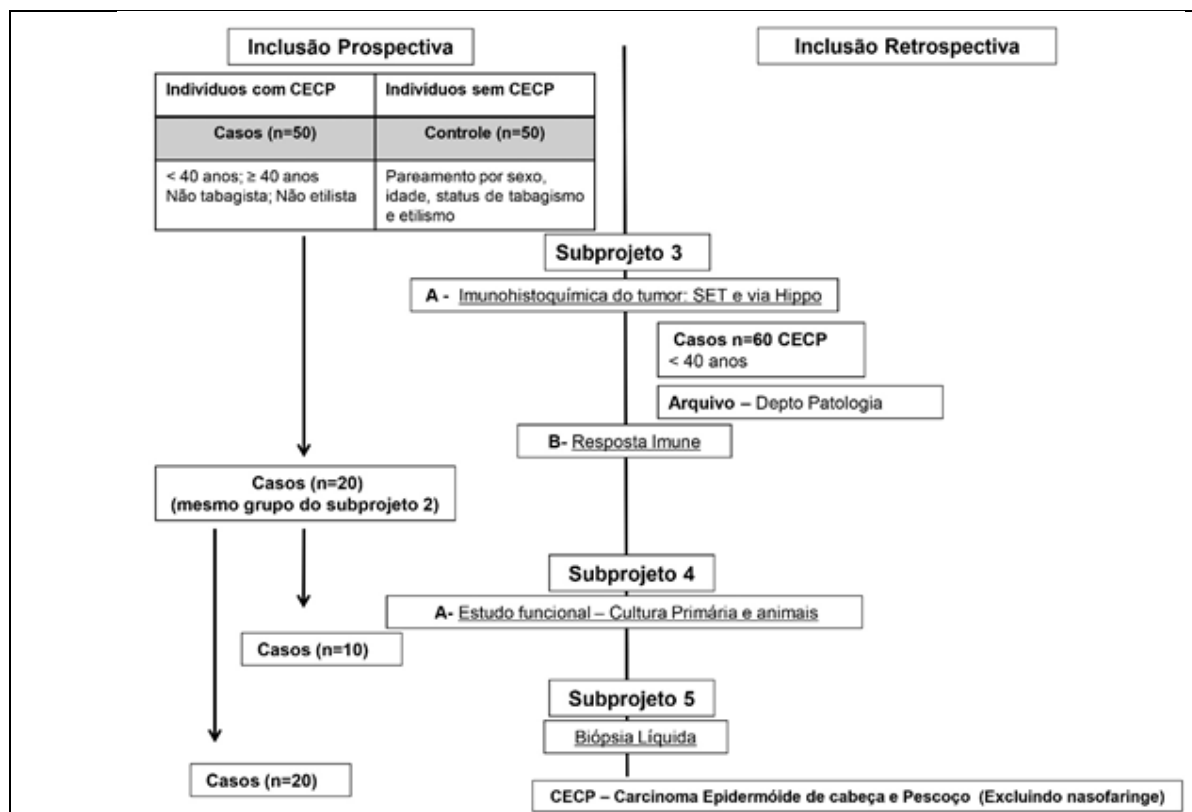
$$\text{Tamanho amostral} = \frac{\frac{z^2 \times p(1-p)}{e^2}}{1 + \left(\frac{z^2 \times p(1-p)}{e^2 N} \right)}$$

Onde, N é o tamanho populacional; e representa a margem de erro (porcentagem em forma decimal), z é o z-score (número de desvios-padrão em um determinado nível de confiança que se encontra distante da média) que possui o valor de 1,28 para um nível de confiança de 80%; p é a proporção de uma população de indivíduos, na qual foi utilizada o valor padrão de 0,5; e $1 - p$ indica uma população de indivíduos que se distingue da outra. Dessa maneira, o número de amostras necessárias para análise por espectrometria de massas e ELISA é de aproximadamente 40. Levando em consideração as limitações de análise por citometria de fluxo, serão utilizadas para esta técnica 20 amostras.

Subprojeto 4: Estudo funcional

Estabelecimento de modelos de linhagem em cultura primária, avaliação de resposta a drogas em zebrafish e xenoenxerto em camundongo: Dentre os 19 participantes do subprojeto 2 que forem submetidos à ressecção cirúrgica e apresentarem tumor ≥ 1 cm de dimensão, terão amostra submetida ao cultivo celular –

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	



Riscos e benefícios da participação no estudo

Os riscos de participação no estudo são pequenos, pois não haverá qualquer intervenção no tratamento realizado pelos pacientes incluídos. Logo, o tratamento dos participantes seguirá a rotina da instituição. Solicitaremos apenas que respondam a questionários. O risco é que o participante se sinta cansado ou chateado e, caso isso aconteça e o paciente não queira prosseguir, sua vontade será respeitada. Da mesma forma, caso o participante se sinta constrangido com alguma pergunta, poderá não respondê-la.

O tumor coletado durante a biópsia e cirurgia será submetido a exames habituais. Solicitaremos ao paciente que permita o estudo da parte restante de sua amostra de tumor e também que permita a coleta de amostra de sangue para estudo molecular. Esta coleta de sangue será exclusiva para este objetivo. A amostra de sangue será retirada em veia periférica do braço e é possível que o paciente sinta dor ou apresente hematoma, que deve regredir em poucos dias. Solicitaremos também que o paciente forneça um pouco de saliva. Neste caso, o participante fará um bochecho com água e desprezará a saliva acumulada em sua boca, em um tubo. Esta coleta não oferece riscos ao paciente.

Este estudo não trará benefícios diretos ao paciente incluído. Entretanto, permitirá a identificação de características do tumor que permitam, no futuro, formas individualizadas de diagnóstico e tratamento.

Todos os riscos e benefícios acima descritos são apresentados no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que devem ser assinados por todos os pacientes de forma prévia para que sejam incluídos na pesquisa. Os TCLEs assinados pelos participantes incluídos retrospectivamente em outros

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

estudos abordavam as mesmas questões supracitadas de maneira similar.

Descrição do local do estudo

O estudo será realizado na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), fundada em 1912 e considerada uma instituição de excelência no ensino de medicina no Brasil (alocada entre as 100 melhores faculdades de medicina do mundo), e no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo Octavio Frias de Oliveira (ICESP), fundado em 2008 e um dos maiores hospitais especializado em tratamento, ensino e pesquisa do câncer da América Latina.

A parte experimental será realizada principalmente no Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) da ICESP/FMUSP. Este centro reúne investigadores das áreas de Biologia Celular e Molecular do Câncer, Genética do Câncer, Patologia Investigativa, Virologia, Biotecnologia e Epidemiologia, que fazem parte de linhas prioritárias de pesquisa do Programa de Pós-graduação em Oncologia da Universidade de São Paulo (Epidemiologia e Prevenção; Oncologia Molecular; Pesquisa Clínica; Inovação Terapêutica e Diagnóstica em Oncologia, com ênfase em Imagenologia).

Os equipamentos localizados nas dependências do CTO participam do Programa de Rede de Equipamentos Multiusuários da FMUSP, dentre eles estão uma unidade de sequenciamento de DNA, uma plataforma de genotipagem e estudos de expressão gênica e um equipamento para citometria de fluxo. O CTO ainda sedia o BioBanco em parceria com os vários grupos de pesquisa do Sistema HCFMUSP, permitindo o armazenamento de material biológico para diversos estudos em diferentes tipos de câncer. As atividades do BioBanco seguem protocolos estabelecidos segundo parceria com o National Cancer Institute, dos Estados Unidos.

A FMUSP dispõe também de uma Diretoria Técnica de Apoio ao Ensino e Pesquisa (DTAPEP), responsável pela gestão e pela prestação de serviços voltados para a criação de animais de laboratório de qualidade genética e sanitária. Além da criação de animais, a DTAPEP tem organizado outros serviços voltados à criação e experimentação animal, além de incluir um núcleo de gestão para os demais núcleos ou serviços que tem a característica de atividade-meio para pesquisa, bem ilustrada pelos núcleos multiusuários do Programa Rede de Equipamentos Multiusuários (PREMiUM).

Além disso, o Hospital Heliópolis (sob responsabilidade do Dr. Otávio Alberto Curioni) será apoiador do estudo, pois cederá parte das amostras de DNA para análises moleculares retrospectivas de Genome Wide Association, bem como informações de tratamento, evolução e desfechos clínicos dos pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. As amostras de material genético estão armazenadas em biorrepositório de estudos tipo caso-controle anteriores conduzidos em parceria com o Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo intitulados "Avaliação de polimorfismos genéticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço" (CAPPesq nº115/03) e "Marcadores Moleculares provenientes de pacientes de carcinoma epidermóide de cavidade oral" (CAPPesq nº148/05 e (Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis nº374.

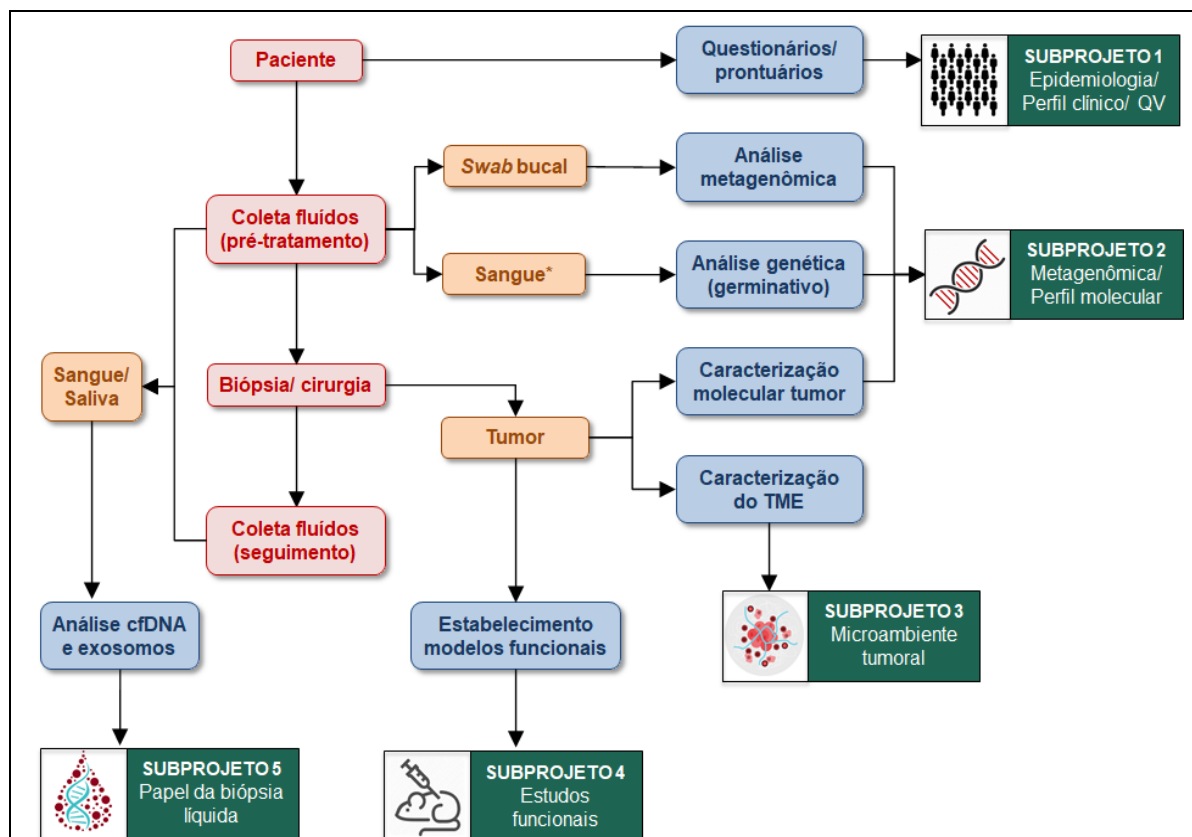
	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

Planejamento do estudo

O projeto foi subdividido em cinco subprojetos, que serão detalhados a seguir. O desenho do estudo está resumido no fluxograma abaixo (figura 1):

Figura 1. Fluxograma ilustrando o desenho da proposta. *fração de leucócitos.

	Descrição do Projeto - PRONON Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	
---	--	---



Fonte: O autor (2020).

SUBPROJETO 1 – PERFIL EPIDEMIOLÓGICO, CLÍNICO E QUALIDADE DE VIDA DE PACIENTES COM CEC

Pesquisadores envolvidos: Luiz Paulo Kowalski (FMUSP-Cirurgia), Tatiana Natasha Toporcov (FSPUSP-Epidemiologia), Alessandro Gonçalves Campolina (ICESP-Epidemiologia), Toshio Chiba (FMUSP-Epidemiologia), Gilberto de Castro Junior (ICESP-Oncologia Clínica), Alexandre Bezerra (FMUSP/ICESP-Cirurgia), Raquel Ajub Moyses (FMUSP-Cirurgia), Ana Carolina Prado-Ribeiro (ICESP-Estomatologia), Thaís Bianca Brandão (ICESP-Estomatologia).

Essa etapa do estudo foi dividida em três *workpackages*, conforme descrito abaixo:

Workpackage 1.1- Estudo epidemiológico e caracterização clínica de pacientes jovens e de não tabagistas/etilistas

Análise prospectiva observacional do perfil clínico e epidemiológico de pacientes com CEC com menos de 40 anos e de não tabagistas/etilistas, provenientes do ICESP e de centros de tratamento do câncer na cidade de São Paulo, codificados com a Classificação Internacional de Doenças (CID-10), como C00 (neoplasia maligna do lábio), C01 (neoplasia maligna da base da língua), C02 (neoplasia maligna de outras partes e de partes não especificadas), C03 (neoplasia maligna da gengiva), C04 (neoplasia maligna do

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

assolho da boca), C05 (neoplasia maligna do palato), C06 (neoplasia maligna de outras partes e de partes não especificadas), C09 (neoplasia maligna da amígdala), C10 (neoplasia maligna da orofaringe), C12 (neoplasia maligna do seio piriforme), C13 (neoplasia maligna da hipofaringe), C14 (neoplasia maligna de outras localizações e de localizações mal definidas, do lábio, da cavidade oral e faringe) e C32 neoplasia maligna da laringe). Será realizado acompanhamento da evolução clínica dos pacientes.

A partir da data de aprovação, todos os pacientes elegíveis admitidos no sistema HC/ICESP e, eventualmente, também pacientes do SUS admitidos oriundos de outros serviços serão convidados a participar voluntariamente em um período de 24 meses. Todas as informações relativas ao perfil epidemiológico, clínico e molecular serão analisadas e publicadas durante os 36 meses de vigência do projeto. As informações tardias de seguimento, que fazem parte do manejo habitual destes pacientes, serão analisadas quando todos os participantes concluírem pelo menos dois anos de seguimento e publicadas posteriormente à vigência do estudo.

Serão incluídos pacientes com confirmação histológica de CECP; disponibilidade de material de biópsia em parafina em arquivo ou possibilidade de realizar nova biópsia. Os dados clínicos, patológicos e epidemiológicos serão registrados na plataforma RedCap.

Estima-se o registro de dez pacientes jovens e 15 pacientes não tabagistas/etilistas ao ano, esperando-se incluir um total de 50 pacientes em dois anos.

A análise será dividida em quatro linhas de investigação:

1. Perfil epidemiológico, com caracterização de:

- a. Fatores de risco;
 - i. Tabagismo e etilismo (tempo, quantidade, tipo), etilismo, uso de drogas ilícitas (tempo, quantidade, tipo), história médica e familiar;
- b. Questionários de Qualidade de vida e Impacto econômico;
- c. Saúde Bucal;
- d. Trajetória no serviço de saúde desde a queixa principal;
- e. Histórico de câncer na família;
- f. Histórico de fatores de riscos dos pais.

2. Terapêutica

- a. Oncologia clínica;
- b. Radioterapia;
- c. Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

3. Impacto Sócio-econômico

- a. Equipe de paliativos;
 - i. Avaliação desde o tempo zero;
- b. Avaliação de Impacto financeiro;

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

c. Serviço social.

Serão coletados os seguintes dados: sexo, idade, fatores de risco para CEC – tabagismo (tempo, quantidade, tipo), etilismo (tempo, quantidade, tipo), uso de drogas ilícitas (tempo, quantidade, tipo), história médica e familiar, diagnóstico oncológico, localização do tumor primário, estadiamento clínico (TNM, 8ª edição) e protocolo de tratamento oncológico estabelecido; resultados de exames de imagens (ultrassonografias, tomografias computadorizadas ou ressonâncias magnéticas). Adicionalmente, serão coletadas informações referentes ao nível de escolaridade (anos de estudo), localização da residência (rural ou urbana), renda mensal individual e familiar, estado civil e acesso a meios de transporte^{118,119}.

Estudo prospectivo

Será realizado um estudo prospectivo por meio da seleção dos pacientes alvo deste projeto, descrito nos itens acima, admitidos para tratamento médico junto ao Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do ICESP, a partir da aprovação do projeto por parte da CCEP e do Comitê de Ética em Pesquisa da FMUSP.

Perfil odontológico dos pacientes (fases 1 e 2)

Todos os pacientes incluídos neste estudo serão submetidos à avaliação odontológica pré-tratamento oncológico; durante o tratamento; e 3 meses, 6 meses, 9 meses e 12 meses após o tratamento oncológico.

Na consulta odontológica inicial, estes pacientes serão submetidos à anamnese completa, exame físico extra-oral, exame físico intra-oral com avaliação das mucosas e estruturas anexas, documentação fotográfica e avaliação de radiografia panorâmica de mandíbula (APÊNDICE 1) seguindo critérios de Jackson¹²⁰.

Após diagnóstico clínico e radiográfico, passarão por tratamento odontológico nas mais diversas especialidades oferecidas pelo Serviço de Odontologia Oncológica do ICESP, entre eles a Estomatologia, Endodontia, Cirurgia, Dentística e Periodontia. Receberão orientações a respeito da alimentação adequada para o período de tratamento, importância da manutenção da higiene bucal e possíveis complicações bucais decorrentes do tratamento. Na consulta odontológica durante o tratamento, os pacientes que serão submetidos ao tratamento radioterápico, as toxicidades agudas serão avaliadas diariamente durante a radioterapia seguindo protocolo previamente estabelecido e publicado por nosso grupo¹²¹. O Common Toxicity Criteria for Adverse Events publicado pelo National Cancer Institute (NCI, Version 5.0, 2017) será utilizado para gradação de disgeusia (Graus de 0 a 2), disfagia (Graus de 0 a 5), trismo (Graus 1 a 3), radiodermite (1 a 5) e mucosite (Graus de 0 a 5). Para mucosite, adicionalmente também será utilizada a escala da Organização Mundial da Saúde (Graus de 0 a 4) (OMS, 1979). A xerostomia será avaliada de acordo com a escala adaptada de Eisbruch¹²² (Graus de 0 a 3) (APÊNDICE 2).

Os pacientes serão reavaliados de forma trimestral até 12 meses após conclusão do tratamento oncológico. A avaliação odontológica contará com exame físico extra-oral, exame físico intra-oral, avaliação de radiografia panorâmica de mandíbula e tratamento odontológico e as toxicidades crônicas associadas ao

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

tratamento serão avaliadas em cada um dos retornos incluindo cárie de radiação (CRR) utilizando o critério de *Post-Radiation Dental Index*, proposto por Walker et al., 2008¹⁸¹⁹⁶²⁸³ que classifica as lesões de CRR de acordo com a quantidade de perda de estrutura de esmalte (Graus de 0-5) e o índice CPO-d (Klein e Palmer, 1937)³⁹²³³²⁴ que será realizado na primeira consulta, após adequação bucal e nos retornos de 3, 6, 9 e 12 meses após o tratamento oncológico. A osteorradionecrose por meio de avaliação clínica, radiográfica e critério do Common Toxicity Criteria for Adverse Events publicado pelo National Cancer Institute (Graus de 0 a 5). Avaliaremos o fluxo salivar dos pacientes, realizando a coleta de saliva total não estimulada e saliva estimulada. A sialometria será realizada preferencialmente no período da manhã e os pacientes serão orientados a não ingerir alimentos, bebidas, ou escovar os dentes por pelo menos uma hora antecedendo a coleta. Sentados, de forma passiva e por 5 minutos, irão coletar a saliva não estimulada em um tubo descartável. Após o conteúdo de saliva coletado será transferido para um tubo Falcon (pré-pesado), e então a quantidade de saliva será mensurada em balança eletrônica. O peso será descrito em gramas por minuto (mg/min). O fluxo total salivar será ajustado em ml/min pela fórmula de Navazesh e Kumar, 2008. A avaliação da hipossalivação será de acordo com critérios estabelecidos por Eisbruch¹²². Por fim, com objetivo de avaliar possível diagnóstico de trismo, avaliaremos a máxima dimensão vertical (MDV) dos pacientes com o auxílio de régua milimetrada do tipo TheraBite® Range-of-Motion Scales (Denver, Colorado, Estados Unidos da América). A mensuração será realizada utilizando como parâmetro a distância interincisal (dentes 11 - 41) em pacientes dentados¹²³ ou da distância da crista óssea alveolar superior e inferior em edêntulos¹²⁴.

Sintomas em câncer de cabeça e pescoço

Os pacientes incluídos no estudo também responderão ao questionário Vanderbilt (VHNSS 2.0^{120,121} (APÊNDICE 3), que contém 50 itens distribuídos em 13 domínios: nutrição, deglutição/ingestão de alimentos, xerostomia, mucosite, dor, excesso de muco, fala/comunicação, audição, alteração de paladar, olfato, saúde dental, sensibilidade da mucosa e amplitude de movimento. As instruções, itens e opções de respostas são graduadas em uma escala de 0 - 10, de maneira que 0 (zero) significa ausência de problema e 10 (dez) presença máxima de determinado problema. Quando o score final se encontrar no intervalo entre 1-4, o sintoma é classificado como leve, entre 5-6, moderado e superior a 7 severo. O protocolo será aplicado na consulta inicial pré-tratamento oncológico, no fim do tratamento radioterápico e nos retornos trimestrais durante 12 meses programados após término do tratamento.

Experiências e preferências de comunicação diagnóstica

O presente estudo também se propõe a avaliar as experiências de revelação diagnóstica dos participantes por meio de entrevista estruturada com aplicação de questionário. O método de entrevista estruturada foi escolhido devido ao perfil de média e baixa escolaridade dos pacientes acompanhados no Serviço de Odontologia do ICESP apontado em estudos prévios, que remete a potenciais limitações na compreensão e preenchimento individual dos questionários. Embora o viés do autorrelato não possa ser descartado, considera-se que este pode ser minimizado pelo fato do entrevistador não estar envolvido em

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

nenhuma etapa do processo de diagnóstico ou tratamento dos participantes, e pela garantia de que suas respostas não afetarão seu acompanhamento subsequente na instituição.

O questionário que acessará as experiências e preferências de revelação diagnóstica dos participantes (APÊNDICE 4) foi desenvolvido com base nas recomendações do protocolo SPIKES^{122,123} uma estratégia para comunicação de más notícias no contexto oncológico referenciada no Manual de Comunicação de Notícias Difíceis do Ministério da Saúde. O questionário será composto por 21 itens apontando condutas agrupadas em seis seções que representam as dimensões do protocolo SPIKES - *Setting* (1), *Perception* (2), *Invitation* (3), *Knowledge* (4), *Emotions* (5) e *Summary and Strategy* (6). Para cada item os participantes atribuirão duas respostas, sendo o primeiro referente à experiência vivenciada em sua consulta de revelação diagnóstica, e a segunda referente à importância atribuída à referida conduta para este tipo de comunicação. As respostas serão quantificadas em escala de valores lineares tipo *Likert* de cinco pontos, variando entre pontuação “1 - *de modo algum/ nenhuma importância*” e pontuação “5 - *completamente/essencial*”. Dez perguntas complementares de múltipla escolha serão intercaladas para caracterização do contexto e cenários de comunicação diagnóstica.

Escala hospitalar de ansiedade e depressão

Com intuito de avaliar a morbidade psicológica dos participantes durante as entrevistas, será aplicada a versão em português da Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão (HADS) para avaliação dos níveis de ansiedade e depressão (APÊNDICE 5)^{124,125}. Composta por 14 itens, esta escala apresentará escores para ambas as condições, as quais serão analisadas separadamente através dos parâmetros: pontuação de 0 a 7 pontos representará condição improvável, pontuação de 8 a 11 pontos, condição possível ou questionável e pontuação de 12 a 21 pontos, condição provavelmente presente.

Workpackage 1.2- Impacto do atraso do diagnóstico na evolução clínica

Trajetória dos pacientes no serviço de saúde a partir da queixa principal

Para avaliar a trajetória dos pacientes, serão avaliados diversos intervalos de tempo. Intervalos que analisam o tempo desde a queixa principal podem indicar atraso na procura pelo serviço pelo paciente. Intervalos entre admissão e diagnóstico indicam dificuldade de acesso ao centro especializado de tratamento e diagnóstico médico e o intervalo que entre diagnóstico até o tratamento está relacionado ao funcionamento do serviço especializado. Serão avaliados os seguintes intervalos de tempo:

1. Número de dias decorridos entre a data da queixa principal (início dos sinais e sintomas), reportada pelos pacientes e a data do diagnóstico histopatológico;
2. Número de dias decorridos entre a data da queixa (início dos sinais e sintomas) reportada pelos pacientes e a data da admissão no hospital de tratamento;
3. Número de dias decorridos entre a data da queixa (início dos sinais e sintomas) reportada pelos pacientes e a data do início do primeiro tratamento realizado no hospital;
4. Número de dias decorridos entre a data do diagnóstico histopatológico e a data da admissão no hospital de tratamento;

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

5. Número de dias decorridos entre a data do diagnóstico histopatológico e a data do início do primeiro tratamento realizado no hospital;
6. Número de dias decorridos entre a data da admissão hospitalar e a data do início do primeiro tratamento realizado no hospital;
7. Número de dias decorridos entre a data da queixa (início dos sinais e sintomas) reportada pelos pacientes e a data do primeiro diagnóstico patológico obtido via RCBP;
8. Número de dias decorridos entre a data do primeiro diagnóstico histopatológico obtido via RCBP e a data da admissão no hospital de tratamento;
9. Número de dias decorridos entre a data da rebiópsia e a data da admissão no hospital de tratamento;
10. Número de dias decorridos entre a data do primeiro diagnóstico patológico obtido via RCBP e a data do início do tratamento no hospital;
11. Número de dias decorridos entre a data da rebiópsia e a data do início do primeiro tratamento realizado no hospital.

Serão realizadas perguntas abertas aos pacientes referentes a possíveis dificuldades no acesso aos serviços de saúde. Além das questões incluídas no questionário, serão também levantados dados de prontuário.

Será comparada a trajetória e os intervalos de tempo dos pacientes de acordo com os fatores de risco apresentados e com a faixa etária, comparando-se pacientes com menos de 40 com pacientes com mais de 40 anos, considerando que pacientes sem fatores de risco e jovens poderiam ter mais atraso no diagnóstico. Os pacientes atendidos e acompanhados rotineiramente no serviço serão convidados a participarem como controles para aquisição de dados epidemiológicos e clínicos e não serão submetidos a coleta de amostras biológicas ou testes moleculares. Os dados de desfecho clínico utilizados para o estudo, também fazem parte da rotina clínica destes pacientes.

Workpackage 1.3- Impacto econômico e na qualidade de vida

Aplicação de questionários

Questionários de qualidade de vida e produtividade no trabalho serão aplicados anteriormente ao tratamento, durante o tratamento, ao fim do tratamento e no seguimento de seis meses, um e dois anos.

Os seguintes questionários serão aplicados por profissionais treinados:

- 1.3.1: Questionário geral de qualidade de vida - EuroQol - EQ-5D-5L. A conversão para Utilities será estimada por dados de preferências do estudo de Andrade *et cols.*²⁹.
- 1.3.2: Questionário específico de qualidade de vida para pacientes com CECp: EORTC QLQ-H&N35 (Head and Neck 35)
- 1.3.3: Questionário de produtividade WPAI-GH (*Work Productivity and Activity Impairment – General Health*)

Os dados serão analisados conforme a idade, nível educacional, número de dependentes do

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

paciente, suporte social de familiar, o estágio e sítio da doença e o tempo para a demora no início do tratamento.

SUBPROJETO 2 – METAGENÔMICA E ESTUDO MOLECULAR DO CECP

Pesquisadores envolvidos: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira (FMUSP-Biologia molecular), Emmanuel Dias-Netto (ACCCC-Metagenômica), Luiz Paulo Kowalski (FMUSP-Cirurgia), Fátima Solange Pasini (FMUSP-Biologia molecular), Leandro Luongo de Matos (FMUSP/ICESP-Cirurgia), Fabio Albuquerque Marchi (ACCCC-Bioinformática), Mateus Camargo Barros-Filho (FMUSP-Biologia molecular), Fernanda de Toledo Gonçalves (FMUSP/ICESP-Biologia molecular), Maria Lucia Hirata Katayama (FMUSP/ICESP-Biologia molecular), Pedro Adolpho de Menezes Pacheco Serio (FMUSP/ICESP-Biologia molecular), Alexandre Bezerra (FMUSP/ICESP-Cirurgia), Raquel Ajub Moyses (FMUSP-Cirurgia), Simone Maistro (ICESP/CTO Biologia molecular), Rosimeire Aparecida Roela (FMUSP/ICESP Biologia Molecular); Isabela Cristina de Souza (FMUSP/ICESP- Biologia Molecular).

Essa etapa do estudo foi dividida em quatro *workpackages*, conforme descrito abaixo:

Workpackage 2.1- Identificação de novos fatores etiológicos biológicos em pacientes jovens e/ou sem fatores de risco aparente

Casuística

Serão prospectivamente recrutados pacientes com CECP jovens e/ou sem fatores de risco aparente (n=50) e controles saudáveis (n=50), que serão pareados por idade e sexo. Os indivíduos responderão a um questionário epidemiológico que investiga estilo de vida e fatores de risco ligados ao CECP. Será colhida uma amostra de swab bucal, para análise metagenômica, com o objetivo de identificar agentes biológicos que estejam associados às lesões que estão sendo investigadas neste estudo.

Coleta do Swab e extração de DNA

Swabs serão coletados da mucosa oral de pacientes e controles utilizando swabs comerciais (Copan Liquid Amies Elution Swab 481C). Este swab é fornecido com tubo contendo solução de transporte que mantém um pH = 7.0 ± 0.5 , na qual será imediatamente imerso após a coleta do material. Os tubos serão armazenados em freezer -80°C imediatamente após a sua chegada ao laboratório para a extração do DNA. Para a extração, as amostras serão descongeladas à temperatura ambiente e o DNA será extraído usando o kit MoBio Powersoil DNA isolation [20203603], seguindo o protocolo do fabricante.

Construção de bibliotecas shotgun e sequenciamento

O protocolo usado será o recomendado pelo fabricante do kit TruSeq Nano DNA library preparation (FC-121-4001). O processo envolve uma fragmentação preliminar pelo Covaris buscando gerar fragmentos de DNA ao redor de 500 pares de bases (pb), a remoção de fragmentos pequenos (<200bp), a ligação de adaptadores seguida de amplificação e uma size-selection para remover artefatos de PCR. Os

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

fragmentos assim preparados serão então visualizados no aparelho BioAnalyzer2100 para garantir bibliotecas contendo fragmentos na faixa de 450-650 pb. As bibliotecas serão sequenciadas em aparelho Illumina NextSeq, já disponível nos laboratórios do CIPE-AC Camargo. Os dados gerados serão processados usando o software Illumina RTA e CASAVA 1.8.2. Todas as amostras serão avaliadas pelos padrões básicos sugeridos pelo pacote CASAVA QC.

Construção de bibliotecas de amplicons 16S rDNA e sequenciamento

As regiões variáveis do gene 16S rRNA a serem amplificadas para permitir a identificação taxonômica das sequências já foram definidas através de análises in silico testando combinações de >400 iniciadores diferentes¹²⁵. Os iniciadores a serem utilizados foram os que apresentaram a maior capacidade de amplificar e identificar bactérias presentes nos bancos de dados públicos (especificamente: ARB SILVA Database e o Ribosomal Database Project) e cujo tamanho do produto amplificado seja compatível com o tamanho de leitura da plataforma de sequenciamento. Após a PCR, o produto de amplificação será usado para avaliação em gel de agarose ou no Bioanalyzer, a fim de verificar a obtenção dos produtos de tamanho esperado, ou a presença de artefatos da PCR. Os amplicons serão, a princípio, sequenciados pela plataforma Ion Torrent PGM da Applied Biosystems com o chip 318 (que atualmente gera aproximadamente 5 milhões de sequências de 400 nucleotídeos). Quantidades equimolares dos amplicons de cada indivíduo serão misturadas para atingirmos a massa de DNA necessária para a construção da biblioteca. Produtos de amplificação dos diferentes indivíduos serão marcados com barcodes específicos, permitindo o sequenciamento conjunto e a posterior individualização durante a análise bioinformática.

Workpackage 2.2- Identificação de mutações germinativas em pacientes jovens e/ou com histórico familiar de câncer e/ou ausência de histórico de tabagismo e infecção por HPV

Pacientes

Probando que tenha desenvolvido CECP em idade inferior a 40 anos e/ou possua histórico familiar, definido como presença de pelo menos um parente de primeiro grau ou dois parentes de segundo grau que tenham sido afetados com câncer e/ou não apresentem fatores predisponentes clássicos, como tabagismo e infecção por HPV.

Coleta e processamento de amostras

Amostras de sangue periférico dos pacientes e de mucosa normal adjacente coletadas na biópsia/cirurgia serão destinadas para a extração do DNA com o reagente QIAamp® DNA *Midi* Kit (Qiagen). A amostra de DNA será avaliada qualitativamente utilizando *Genomic DNA ScreenTape assay* e o *TapeStation®* (Agilent) e quantitativamente utilizando *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific Inc) e *Nanodrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc).

Identificação de mutações germinativas

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

Sequenciamento de painel de genes de câncer hereditário (n=50 amostras de DNA de linfomononucleares de pacientes do braço prospectivo). O DNA germinativo será extraído utilizando-se o kit QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen). Será realizado o sequenciamento de 113 genes relacionado a câncer ,utilizando-se o painel TruSight Cancer Hereditary (Illumina) e o protocolo Illumina® DNA Prep Tagmentation (Illumina), o qual compreende 5 etapas: Tagment Genomic DNA (fragmentação e adição de adaptadores no DNA), Post tagmentation Cleanup, amplificação de DNA fragmentado e etiquetado (tagmented), lavagem das bibliotecas e formação do pool de bibliotecas. A reação de NGS será realizada na plataforma MiSeq (Illumina). As alterações patogênicas ou provavelmente patogênicas encontradas serão avaliadas pelo sequenciamento de Sanger

Análise de polimorfismos genéticos

A genotipagem dos polimorfismos genéticos será realizada em cerca de 396 indivíduos, a saber: 50 pacientes jovens e/ou não tabagistas e etilistas com idade abaixo de 40 anos coletados prospectivamente no ICESP (os mesmos indivíduos contemplados em todos os subprojetos), 49 pacientes jovens e/ou não tabagistas e etilistas provenientes de Biorrepositórios citados anteriormente (Aprovações em anexo), 147 pacientes com idade acima de 40 anos e/ou tabagistas e etilistas com diagnóstico de CECP (pacientes retorspectivos pertencentes aos Biorrepositórios supracitados) e 150 controles saudáveis (50 que serão coletados prospectivamente a partir da aprovação do presente estudo no ICESP e 100 controles dos Biorrepositórios anteriormente citados) pareados por sexo e idade. As análises de GWAS serão realizadas no equipamento multiusuário do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular Instituto do Coração (Incor) / HCFMUSP, usando ensaio de microarray Axiom Precision Medicine Diversity Research Array (PMDA), desenvolvido pela Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, CA, EUA). Este ensaio abrange genes e polimorfismos específicos para humanos, projetado especificamente para testar associações de resposta inflamatória, metabolismo de drogas com a resposta à terapia, cânceres e ancestralidade genética, com a finalidade de entender a diversidade genética de populações e a susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças e resposta a terapias. Nesse ensaio, estão presentes 850.000 SNPs (polimorfismos em um único nucleotídeo). Os resultados da genotipagem serão avaliados entre os grupos de pacientes considerados (casos x controles e casos x casos) para estimativa de risco, além de análises de associação desses polimorfismos com progressão, tratamento do tumor, desfecho clínico e dados de inflamação. Os Biorrepositórios que contemplam as amostras retrospectivas citadas são provenientes de projetos de pesquisa conduzidos anteriormente em parceria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo com o Hospital Heliópolis (“Avaliação de polimorfismos genéticos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço” (CAPPesq n°115/03) e “Marcadores Moleculares provenientes de pacientes de carcinoma epidermóide de cavidade oral” (CAPPesq n°148/05), cujos DNAs já extraídos dos pacientes encontram-se armazenados em freezer -80°C

A extração do DNA dos pacientes prospectivos será realizada a partir de 2mL de sangue periférico total de cada indivíduo com o reagente QIAamp® DNA Midi Kit (Qiagen). A amostra de DNA será avaliada qualitativamente utilizando Genomic DNA ScreenTape assay e o TapeStation® (Agilent) e

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

quantitativamente utilizando *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific Inc) e em seguida será diluída para a concentração final de 50ng/uL em volume de 50uL para ser utilizado no microarray em questão.

Workpackage 2.3- Perfil de mutações somáticas e alterações no transcriptoma de tumores de pacientes jovens e de não tabagistas/etilistas

Coleta e processamento das amostras

Cerca de 20 amostras a fresco de tumor e mucosa normal adjacente de pacientes jovens e de não tabagistas/etilistas serão coletadas na biópsia ou cirurgia e fragmentos serão separados e armazenados parte em nitrogênio líquido e parte em meio de cultura (apenas tumor) DMEM acrescido de antibióticos. Uma lâmina será corada com hematoxilina-eosina (HE) para demarcação pelo patologista das áreas contendo células tumorais. A região de interesse será pulverizada com *Biopulverizer* (Bio-pulverizer™ BioSpec Products Inc., Oklahoma, EUA). Para a extração do DNA e RNA total serão utilizados os reagentes *QIAamp® DNA Midi Kit* (Qiagen) e *miRneasy mini kit* (Qiagen), respectivamente.

Identificação de alterações genômicas somáticas

Cerca de 20 amostras de CECF e tecido normal adjacente de pacientes jovens e de não tabagistas/etilistas serão avaliados por sequenciamento do genoma completo. Será utilizado o *Nextera DNA Flex Library Preparation Kit (24 Samples)* (Illumina) que permite sequenciar todos os exons, regiões 5' e 3' UTR. Será utilizado de 100-500ng de DNA de cada amostra. A primeira etapa consiste na fragmentação do DNA e a ligação de adaptadores utilizando *Bead-Linked Transposomes*. Em seguida, a amplificação do DNA com os index 1 (i7) e index 2 (i5), para possibilitar a formação de *pools*, e adaptadores (P5 e P7) necessários para a geração de clusters. A biblioteca será avaliada quanto a qualidade e quantidade com *High Sensitivity D1000 ScreenTape* e *TapeStation* (Agilent) e o *Qubit*. O sequenciamento de nova geração (NGS) será realizado na plataforma Illumina utilizando-se o equipamento *HiSeq4000* ou *NovaSeq6000*. Os limiares de qualidade para o sequenciamento serão de 30 vezes de profundidade média e serão analisadas regiões sequenciadas pelo menos 10 vezes.

Identificação de alterações transcriptômicas

Os mesmos casos avaliados pelo sequenciamento completo do genoma serão analisados pelo sequenciamento do transcriptoma tumoral (20 tumores primários e 20 tecidos histologicamente normal adjacente). O RNA total, incluindo os microRNAs, será extraído com kit *miRneasy mini kit* (Qiagen). A análise da qualidade será analisada no sistema de *RNA ScreenTape assay* e o *TapeStation®* (Agilent) e a quantificação utilizando *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific Inc) e *Nanodrop 1000 Spectrophotometer* (Thermo Fisher Scientific Inc). Serão preparadas dois tipos diferentes de bibliotecas, uma para o sequenciamento dos RNA longos (codificantes ou não) e outra específica para sequenciamento dos

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

microRNAs, utilizando o sistema TruSeq Stranded Total RNA (Illumina) de acordo com as instruções do fabricante e o material será sequenciado no sistema HiSeq 2500 com 80Mb de *reads*/amostra para RNAs longos e 50Mb de *reads*/amostra para microRNAs.

Identificação de ncRNA envolvidos em metástase linfonodal através da análise de vesículas extracelulares (VEs)

Isolamento de VEs. VEs de plasma e saliva livre de célula (SLC) (n=20 amostras, ao diagnóstico) serão isoladas por ultracentrifugação e por cromatografia por exclusão de tamanho, respectivamente. A contagem, distribuição de tamanho e caracterização das VEs serão realizadas por análise de rastreamento de nanopartículas (Nanoparticle Tracking Analysis-NTA) no equipamento NanoSight. **Extração de RNA de VEs.** A extração de RNA total das VEs obtidas será realizada com kit comercial miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen) ou com o kit isolamento exosoma total e proteína (Thermo Fisher), seguindo as recomendações do fabricante. Esse material será utilizado para traçar o perfil de RNAs não codificantes circulantes utilizando-se a plataforma NanoString e os dados serão analisados com o programa nSolver v.3. **Microdissecção de células tumorais de linfonodo comprometido (n = 20 - análise de expressão gênica – NanoString).** Fragmentos de linfonodo comprometido congelados frescos serão cortados em fatias de 10 µm. As células tumorais presentes no linfonodo serão microdissecadas, utilizando-se o sistema CapSure HS LCM (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) em uma microdissecção Pix Cell II Arcturus Laser Capture (Thermo Fisher Scientific) (LCM). Após adição de uma solução de lise, o RNA total será recuperado da coluna de purificação de RNA (isolamento de RNA do Arcturus PicoPure, Thermo Fisher Scientific). **Análise de mRNA alvos.** Será analisada a expressão gênica de alvos identificados como regulados por RNAs não codificantes presentes em vesículas extracelulares da fração plasmática. Esta determinação será realizada através de painel customizado contendo sondas de captura para mRNA e miRNA em plataforma NanoString. Os dados serão analisados com o programa nSolver v.3.

Estudos confirmatórios de pequena/média escala

Análise de expressão proteica utilizando TMA: Alguns candidatos também poderão ser avaliados por imunohistoquímica (IHQ) em *tissue microarray* (TMA). Os blocos serão separados do arquivo para a confecção do TMA, pelo tissue microarrayer (Beencher Instruments®, Silver Spring, EUA).

Workpackage 2.4- MicroRNAs e o remodelamento da matriz extracelular

Casuística

Estudo retrospectivo com material proveniente do bloco de parafina de pacientes tratados por carcinoma epidermóide da cavidade oral, orofaringe e laringe. Estimamos a inclusão de 50 amostras de pacientes jovens e de não tabagistas/etilistas e 50 pacientes não-jovens etilistas e tabagistas, para efeito comparativo.

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

Análise de miRNAs

Será realizada extração do RNA dos blocos parafinados, seguida de amplificação do material através de DNA complementar para microRNAs relacionados à adesão, migração, proliferação celular, apoptose, além de constituintes e modificadores da matriz extracelular. Serão empregadas técnicas de extração de microRNAs de material parafinado e obtenção do cDNA através da plataformas MagMAX® FFPE RNA, amplificação de microRNAs pelo método específico miR-AMP Reaction, seguido da Transcrição Reversa - Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo (RT-qPCR) com o sistema TaqMan MicroRNA Assay-Array em uma plataforma customizada com os alvos de microRNAs previamente selecionados (TaqMan® Low Density Array - TLDA). Para análises de expressão do perfil de microRNAs, os valores de Ct (*cycle threshold*) serão determinados com a plataforma Cloud (Thermo Fisher Scientific®, Waltham, Ma, EUA). miRNAs com valores de Ct > 38 serão considerados como indeterminados e descartados. Apenas os miRNAs detectados em pelo menos 68% das amostras serão considerados para as análises estatísticas.

Análise de alvos de miRNAs

Serão também realizadas reações de imunoistoquímica pelo sistema de detecção Envision FLEX, com recuperação antigênica, bloqueio de peroxidases endógenas, incubação dos anticorpos primários envolvidos nos mesmos processos biológicos relacionados aos microRNAs selecionados (metaloproteinases, heparanases, syndecans, decorin, laminina, Bcl2, Ki67, CD34, VEGFR3, p16, p53, EGFR e colágenos), incubação do anticorpo secundário adequado (anti-goat IgG Vector ou polímero Novolink), revelação com diaminobenzidina e contra-coloração com hematoxilina de Meyer.

SUBPROJETO 3 – PAPEL DO MICROAMBIENTE TUMORAL NO CECIP.

Pesquisadores envolvidos: Adriana Franco Paes Leme (LnBio-Proteômica), Ana Paula Lepique (ICB-USP-Imunologia), Evandro Sobroza de Mello (ICESP-Patologia), Ana Maria da Cunha Mercante (ICESP-Patologia), Luiz Paulo Kowalski (FMUSP-Cirurgia), Alexandre Bezerra (FMUSP/ICESP-Cirurgia), Raquel Ajub Moyses (FMUSP-Cirurgia).

Essa etapa do estudo foi dividida em três *workpackages*, conforme descrito a seguir:

Workpackage 3.1- Análise do perfil de resposta imune de pacientes com câncer de boca

Casística

Serão necessárias 40 amostras de pacientes com CE oral para a análise por espectrometria de massas, 40 amostras para análise por citometria de fluxo e 40 amostras para análise por ELISA. Esse número amostral foi calculado considerando as limitações de amostras, bem como na experiência do grupo no que se refere à definição de modelo preditivo¹²⁶. Todas as análises serão realizadas na fração leucocitária do sangue dos pacientes.

Coleta e preparação das amostras

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

A fração leucocitária do sangue, objeto de estudo deste projeto, é a porção sanguínea onde se encontram as células do sistema imune, assim como as plaquetas. Para a obtenção dessa fração, o sangue venoso dos pacientes será coletado de acordo com os protocolos padrões de coleta de sangue e serão processados posteriormente.

Análise por LC-MS/MS

Para quantificação relativa das proteínas-alvos que caracterizam cada população do sistema imune, as amostras serão analisadas por LC-MS/MS no triplo quadrupolo Xevo TQ-XS, controlado pelo programa MassLynx (v.4.2) e conectado ao sistema de cromatografia líquida Acquity UPLC-Class M por meio de fonte de electrospray (Waters, Milford, MA, USA). Os peptídeos serão separados por um gradiente de acetonitrila de 2-40% em ácido fórmico a 0,1% em uma coluna analítica Acquity UPLC BEH Shield C18 IonKey durante 80 minutos, a um fluxo de 1,2 µL/min. O instrumento será operado no modo SRM segmentado, no modo positivo, utilizando ESI. O *dwell time* para todos os peptídeos será ajustado automaticamente pelo programa Masslynx, não sendo menor que 10ms durante todo o gradiente. Os peptídeos sintéticos escolhidos de acordo com as populações de células do sistema imune - neutrófilos, monócitos, células NK e linfócitos T CD8+, células T CD4+ serão marcados internamente com isótopos pesados no C-terminal de lisina, arginina, valina e leucina (+8, +10, +6, +7 ou +4Da respectivamente) serão utilizados para validar a identidade dos peptídeos endógenos.

Análise de dados

Os dados serão analisados no programa Skyline considerando os controles de qualidade descritos previamente¹²⁶.

Análise das subpopulações do sistema imune por citometria de fluxo

Para validação dos anticorpos referentes às proteínas-alvos que caracterizam cada população do sistema imune será realizada citometria de fluxo. Para cada subpopulação será utilizado um painel de marcação e serão utilizados controles de isotipos em cada experimento. Após incubação por 30 minutos a 4°C, as suspensões celulares serão tratadas com PBS paraformaldeído 0,4%; azida sódica 0,1% por 15 minutos a 4°C. Depois de centrifugadas a 5000 g por 5 minutos, 100µL de Perm Wash (Perma/Wash™ Buffer 10x stock) será adicionado na placa de cultura celular e incubado por 5 minutos a 4°C. Após centrifugação a 5000 g por 5 minutos a 4°C, serão adicionados 10µl de cada anticorpo monoclonal para marcação intracelular, conforme descrito anteriormente. As células serão incubadas por 30 minutos a 4°C, em seguida será acrescentado Perm wash 1X, centrifugando em 5000 g por 5 minutos a 4°C. As células serão ressuspensas em PBS, azida sódica 0.1%. As amostras serão analisadas em Citômetro de fluxo FACsCanto II (BD Biosciences) e analisados com programa FlowJo (Tree Star). Os resultados serão expressos em porcentagem de células positivas para a molécula avaliada.

Ensaio de ELISA quantitativo baseado nos alvos selecionados

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

O ensaio de ELISA quantitativo está sendo proposto com o objetivo de transferir o conhecimento básico para a clínica. Dessa forma, a partir dos resultados obtidos de SRM indicando as proteínas que apresentam diferenças entre variadas condições, como status de HPV, e validação dos respectivos anticorpos por citometria de fluxo, serão selecionados os anticorpos para o ensaio de ELISA.

O ensaio de ELISA será otimizado para cada anticorpo e para cada proteína e será feita com kits de ELISA disponíveis comercialmente, de acordo com o protocolo do fabricante, e que usam como sistema de detecção a atividade dada por peroxidase (HRP) conjugada ao anticorpo secundário. Inicialmente, será feita uma curva de calibração com a proteína recombinante titulada em diferentes concentrações para a determinação da dose-resposta e da faixa de detecção e quantificação do ensaio. Serão feitas triplicatas técnicas e a média dos valores obtidos será reportada em ng/mL. A correlação linear das curvas de calibração obtida no ELISA será calculada usando coeficiente de correlação de Pearson¹²⁷.

Workpackage 3.2- Metabolismo e modulação de respostas imunes: marcadores e oportunidades terapêuticas

Estudo do papel da proteína SET por imunistoquímica

Estudo retrospectivo onde serão necessárias amostras de tumores de orofaringe de pacientes que tenham histórico documentado (tratamento, sobrevida, comorbidades, idade, sexo, resposta ao tratamento, infecção por HPV, consumo de tabaco e/ou álcool). Além disso, se possível, as amostras conterão bordas com tecido não tumoral para comparação com o tecido tumoral. Após diafanização, por tratamento com xilol, os tecidos serão incubados em gradiente de etanol com concentrações decrescentes de etanol até a hidratação dos tecidos. Os tecidos serão então tratados para recuperação antigênica (o protocolo vai variar dependendo do anticorpo a ser utilizado), bloqueados e incubados com anticorpos primários contra SET, PP2A, anti-c-Myc, anti-c-Myc fosfo Ser62, anti-Akt, anti-Akt fosfo Ser473, anti-Erk, anti-Erk fosfo (Thr202/Tyr204) (Cell Signaling Technologies; AbCAM). A revelação será feita utilizando polímeros conjugados anticorpos secundários (Vector Technologies) e diaminobenzidina (Vector Technologies). Após contra-coloração com hematoxilina e eosina e montagem das lâminas, imagens serão adquiridas utilizando-se um microscópio Olympus BX61 e câmera acoplada. As imagens serão quantificadas utilizando-se o software ImageJ, após aquisição de várias imagens do mesmo tecido.

Determinação da frequência de populações mielóides e linfóides circulantes em sangue periférico

Estudo prospectivo, onde amostras de sangue e biópsia serão coletadas dos mesmos pacientes. Não serão incluídos pacientes com tratamento prévio para câncer de orofaringe, imunossupressão por infecção ou tratamento, imunodeficiência, anorexia, diabetes. Serão obtidos cerca de 3×10^6 leucócitos do sangue desses pacientes, correspondente a células obtidas de buffy coat de 3 ml de sangue, onde uma alíquota será utilizada para imunofenotipagem com os anticorpos listados abaixo (Tabela 1) e aquisição de dados em citômetro de fluxo Fortessa (BD Biosciences).

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

Tabela 1. Marcadores para imunofenotipagem de leucócitos de sangue periférico de pacientes e voluntários clinicamente saudáveis

(continua)

Marcador	Fenótipo
CD4	Linfócitos T
CD8	Linfócitos T
CD14	Monócitos clássicos
CD16	Neutrófilos, células NK, monócitos alternativos
CD11b	Células mielóides
CD33	Células mieloderivadas supressoras
HLA-DR	Apresentadoras de antígeno profissionais
CD44	Marcador de memória
CD56	Células NK
PD-1 e PD-L1	exaustão
CTLA-4	Células T reguladoras
CCR7	Marcador para memória e APCs ativadas
CD62L	Marcador para memória
CD66b	Neutrófilos
CD19	Linfócitos B

Fonte: O autor (2020).

O restante do material prosseguirá para a extração de RNA. RNA total extraído das amostras será utilizado para confecção de biblioteca com reagentes Illumina, segundo instruções do fabricante, seguido de sequenciamento que será feito pela equipe de genômica do CEFAP, ICB, USP. Os dados de citometria serão analisados usando o software FlowJo (BD Biosciences).

Também serão coletadas amostras de cerca de 10 pacientes com CE de orofaringe e 20 voluntários clinicamente saudáveis. Novamente células mononucleares serão isoladas, porém nesse caso, células com fenótipo sugestivo de fenótipo supressor serão selecionadas por “cell sorting” em FACS Aria II, disponível no Departamento de Imunologia do ICB. Células com perfil CD11b+CD16+CD66b+PD-L1+ ou CD11+CD33+PD-L1+ ou CD11b+CD33+PD-L1- de pacientes e voluntários clinicamente saudáveis serão incubadas na proporção 10:1 ou 5:1 com linfócitos T alogênicos (dos 10 voluntários saudáveis restantes) isolados por seleção negativa com esferas magnéticas conjugadas a anticorpos (Miltenyi Biotec) e previamente marcados com proliferação CellDye (BD Biosciences) e ativados com 10 ng/ml TPA (Cell Signaling Biotechnologies) e 1 mg/ml inonomicina por 5 horas apenas (estímulo subótimo). Dessa forma cada par de células de pacientes e controles serão incubados com a mesma amostra de linfócitos T. As células serão incubadas por 4 dias. Os sobrenadantes serão coletados para medida de citocinas para determinação do perfil de resposta de linfócitos T e os linfócitos serão marcados com anticorpos anti-CD4, anti-CD8, anti-CD137, anti-CD25, anti-CD69, anti-Foxp3, anti-CTLA4 e anti-PD1. As células serão

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

avaliadas por citometria de fluxo, e dados analisados utilizando o software FlowJo (BD Biosciences). Com isso, seremos capazes de definir se as células mielóides em pacientes com câncer apresentam diferença de frequência e atividade supressora em relação a células de voluntários clinicamente saudáveis.

Workpackage 3.3 - Avaliação “in situ” de biomarcadores relacionados ao estroma no microambiente tumoral, com ênfase na via Hippo

Casuística

Será reavaliada a casuística de pacientes operados com CE de cavidade oral e orofaringe, presente nos arquivos do Laboratório de Anatomia Patológica do ICESP. Os dados anatomopatológicos serão coletados dos laudos e os seguintes aspectos serão revisados: Subtipo histológico; Aspectos locais (pT) e linfonodais (pN) do estadiamento anatomopatológico. Outros parâmetros anatomopatológicos serão avaliados por 2 patologistas: Padrão (“front”) de invasão; Fibrose (desmoplasia); Resposta inflamatória ao tumor e espessura do filete nervoso quando esse encontra-se infiltrado pela neoplasia. Na avaliação dos cortes histológicos do tecido tumoral 6 áreas serão selecionadas e marcadas na região de transição tumor hospedeiro.

Confecção do TMA

Os blocos serão levantados do arquivo e as áreas dos mesmos serão demarcadas tendo como base as áreas demarcadas nas lâminas com os cortes histológicos do tecido. A construção do TMA se dará a partir da técnica preconizada por Kononen et al. (1998)¹²⁸, utilizando o aparelho (Beencher Instruments®, Silver Spring, EUA). A partir de 1 ou mais blocos doadores de cada caso serão extraídas 6 amostras de 2,0 mm e transferidas para a construção do bloco receptor (TMA). Os blocos de TMA serão submetidos à microtomia para a confecção de lâminas com cortes de histológicos de tecido com espessura em de 3µ a 4µ para as avaliações das expressões de proteína pela técnica de imuno-histoquímica.

Imuno-histoquímica

As lâminas produzidas a partir do bloco de TMA serão diafanizadas utilizando o xilol e hidratadas com álcool etílico em concentrações decrescentes. Posteriormente as etapas de recuperação antigênica e bloqueio de enzimas endógenas, seguirão os protocolos estabelecidos para cada anticorpo. Cada lâmina será incubada com um dos anticorpo primário: YAP1; TAZ; Actina de músculo liso; integrina alfa 6; CXCL2; TGF-beta; Wnt/e-caderina; n-caderina; FAT-1; p53; p16; TEF1/TEAD1, seguidas das etapas de amplificação e revelação (EnV FLEX+ Mo Anglient-Dako®).

Avaliação imuno-histoquímica

Para a avaliação da expressão das proteínas nos tecidos as lâminas microscópicas serão digitalizadas em alta resolução. (Scan- Aperio AT2 Digital – Leika Biosystems®). As imagens geradas serão avaliadas de acordo com os parâmetros utilizados na literatura, dependendo de cada anticorpo o método

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

poderá ser quantitativo ou semi-quantitativo. Para a avaliação dos anticorpos por métodos quantitativos será utilizado o programa de computador de domínio público ImageJ.

Identificação de mutação em PIK3CA

O status de mutação no gene *PIK3CA* será verificado pela análise do sequenciamento de DNA descrito no subprojeto 2.

SUBPROJETO 4 – ESTUDOS FUNCIONAIS COM CECF.

Pesquisadores envolvidos: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira (FMUSP-Biologia molecular), Fátima Solange Pasini (FMUSP-Modelos *in vivo*), Rosimeire Aparecida Roela (FMUSP/ICESP-Modelos *in vivo*), Isabela Cristina de Souza (FMUSP/ICESP-Modelos *in vivo*), Alan Roger dos Santos Silva (FMUSP-Modelos *in vivo*), Gilberto de Castro Junior (ICESP-Oncologia Clínica), Luiz Paulo Kowalski (FMUSP-Cirurgia), Alexandre Bezerra (FMUSP/ICESP-Cirurgia), Raquel Ajub Moyses (FMUSP-Cirurgia), Maria Lucia Hirata Katayama (FMUSP/Modelos *in vivo*), Simone Maistro (ICESP - Modelos *in vivo*).

Nesta etapa, pretendemos estabelecer modelos de sensibilidade a drogas que possam ter aplicação em câncer de cabeça e pescoço para a personalização do tratamento.

Pacientes

Serão incluídos cerca de 10 pacientes portadores de lesão em língua com diagnóstico histológico de CE cujo planejamento terapêutico envolva cirurgia, priorizando indivíduos jovens e/ou não-tabagistas e não etilistas. Não serão incluídos casos de lesões iniciais ou que tenham sido submetidos a radioterapia ou quimioterapia. Os tumores serão testados para HPV pelo método supramencionado e apenas tumores negativos serão incluídos.

Modelos em culturas primárias

Processamento do tecido tumoral fresco para estabelecimento de cultura primária: Fragmentos de tecido tumoral de 5 mm serão fragmentados e digeridos em solução de collagenase para desagregação celular. A remoção de eritrócitos se dará por tampão de lise eritrocitária. Parte dessa mistura celular passará por um filtro celular de 100 µm (Fisher Scientific) e o filtrado contendo as células isoladas será submetido a centrifugação. As células serão ressuspensas em DMEM/F12 na concentração de 5×10^5 células/µL. Outra parte do material obtido após a lise eritrocitária será processada para estabelecimento de uma cultura primária *in vitro*. A suspensão será lavada com PBS e a mistura de células será cultivada em meio de cultura suplementado DMEM (Capricorn Scientific) com 10% de soro fetal bovino (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 1% de L-glutamina 200mM, antibióticos e fungicida).

Manutenção da cultura primária: A cultura primária de células mantidas em meio DMEM suplementado (como exposto acima) será monitorada até formar uma camada celular aderente confluenta. Accutase (Capricorn Scientific, Ebsdorfergrund, Alemanha) será utilizada para destacar as células aderentes

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

e eliminar agregados celulares e fragmentos em passagens sucessivas. A mistura de células será cultivada para enriquecimento das células epiteliais em meio PneumaCult-Ex Plus (STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canadá), suplementado com 1% de L-glutamina 200 mM, 1% de penicilina 100x / estreptomicina, 1% de 250 g/mL de anfotericina B solução e 0,5 mL de uma solução de hidrocortisona de 96 g / mL (0,2 mM). A pureza da cultura primária será assegurada por sua caracterização por imunofluorescência utilizando os seguintes marcadores: EpCAM como marcador epitelial geral, citoqueratina 14 e 19 (CK14 e CK19) como marcadores epiteliais e Thy-1, actina do músculo α -liso (α -SMA) e Vimentina como marcadores de estromais. Serão utilizando anticorpos proveniente da Santa Cruz Biotechnology Inc., Sigma-Aldrich Dianova, Thermo Fisher Scientific e Abcam¹²⁹.

Modelos em Zebrafish

Estabelecimento do xenoenxerto em Zebrafish: Os experimentos em Zebrafish serão conduzidos após aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina da USP. O processamento do tecido tumoral será realizado da mesma forma dos modelos de cultura primária. As larvas serão mantidas a 28,5°C em meio contendo 5 mM NaCl, 0,17 mM KCl, 0,33 mM CaCl₂ e 0,33 mM MgSO₄ por dois dias. Em seguida os animais serão anestesiados e 2 nL da suspensão de células tumorais (1000 células) serão injetados em cada um.

Tratamento com fármacos: As larvas serão transferidas para meio fresco em placas de 24 poços (5 animais por poço com 1mL de meio) e mantidas a 37°C por 72 horas para o início do tratamento com diferentes drogas (conforme a tabela abaixo). Ao final do tratamento, 10 animais de cada tratamento/controle serão testados por ddPCR (droplet digital PCR) e qPCR para avaliação da resposta tumoral considerando a expressão de GAPDH humano, e citoqueratina 17 humano, conforme descrito por Al-Samadi et al. em 2019¹³⁰. A expressão do GAPDH zebrafish será usada para normalização e a expressão relativa será apresentada como 2- Δ Ct.

Tabela 2. Tratamento farmacológico no modelo em zebrafish

Fármaco	Concentração	Fornecedor
Cisplatina	3 μ g/ml	Accord Healthcare Ltd.
Docetaxel	5 μ M	Meryer
Erlotinib	10 nM	Medchem Express
Gefitinib	10 nM	LC Laboratories
Metformina	50 μ M	Enzo Life Sciences

Fonte: O autor, 2020.

Modelos em xenoenxerto derivado de paciente (PDX)

Estabelecimento de modelos PDX: Serão utilizados camundongos Nude (BALB/c nude) machos, com 5-7 semanas de idade, pesando entre 20-25g. Os tumores coletados serão fragmentados em 3 peças cada, totalizando 6 pedaços de tumor, que serão implantados em 6 animais, a fim de se estabelecer a primeira passagem (PDX-passagem 0). Os tumores serão expandidos e posteriormente coletados e implantados nos

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

demais animais que constituirão os grupos experimentais (PDX-passagem 1). Os animais serão anestesiados com anestésico geral injetável a base de Ketamina (Dopalen) e de Xilazina (Anasedan), será realizada a antisepsia da área a ser operada no dorso do animal, confeccionada incisão única até o plano subcutâneo (~1,5cm de comprimento) seguida da implantação do fragmento tumoral (medindo aproximadamente 6.0 x 6.0mm/fragmento), e fechamento da ferida com cola cirúrgica. Após o implante do tumor, os animais serão observados periodicamente (3 vezes/ semana). Os tumores serão medidos nos seus maiores diâmetros de comprimento e largura com o auxílio de paquímetro. Quando os tumores atingirem volume de aproximadamente 1.000 mm³, os tumores serão coletados, fragmentados (~6 x 6 mm/fragmento), e reimplantados em outros camundongos Nude (BALB/c nude) machos originando, assim, o PDX-passagem 1. Pretende-se que a partir de cada um dos 6 PDX0 originar 10 novos PDX (PDX1) e alocar 6 tumores provenientes de cada paciente em cada grupo experimental. Os fragmentos remanescentes serão fixados em formalina 10% para processamento histológico e o congelado para análises moleculares. Os animais de PDX-0 serão eutanasiados utilizando overdose anestésica.

Tratamento com fármacos: Os animais PDX-passagem 1 (n=60) serão divididos randomicamente em grupos experimentais para teste com fármacos. Os animais serão pesados e avaliados quanto ao crescimento tumoral 3x por semana, como previamente descrito. Quando os tumores atingirem 200mm³, os camundongos serão submetidos a diferentes protocolos terapêuticos. Ao final do período experimental os animais serão anestesiados, os tumores removidos e posteriormente os animais serão mortos através de anestésico inalatório isoflurano. Após medidos e pesados, parte dos tumores será fixada em solução de formalina a 10% tamponada, parte será submetida para análise por FACS e o restante será congelado para posterior análise molecular. Todos os processos de eutanásia serão supervisionados por médico veterinário.

Análise da presença de CTT e da proliferação celular dos PDX por citometria de fluxo: Fragmentos tumorais serão cortados em pedaços pequenos (para que passem pelo interior de uma pipeta de 2mL) e submetidos à digestão com um mix de enzimas (1x collagenase-hyaluronidase (Stem Cell Technologies, Vancouver, BC, Canada). A seguir, serão submetidas ao protocolo de FACS para a atividade de ALDH e CD44, utilizando ALDEFLUOR® Kit (STEMCELL Technologies, Vancouver, BC, Canada) seguindo as orientações do fabricante em paralelo e o anticorpo APC Mouse Anti-Human CD44 (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA). As amostras serão analisadas usando-se FACSCalibur (BD Biosciences, Mountain View, CA, USA) e o software Weasel v.3.0.1 (The Walter and Eliza Hall Institute of Medical Research, Parkville, Victoria, Australia). Os anticorpos anti-human HLA e anti-human pan CK serão adicionados para a identificação das CTT apenas das células epiteliais tumorais humanas. Para a análise de ciclo celular por FACS, será realizado o protocolo de marcação com iodeto de propídio, identificando a porcentagem de células nas seguintes fases do ciclo celular: (i) Sub G0/G1 – apoptose (ii) G1/S/G2/M.

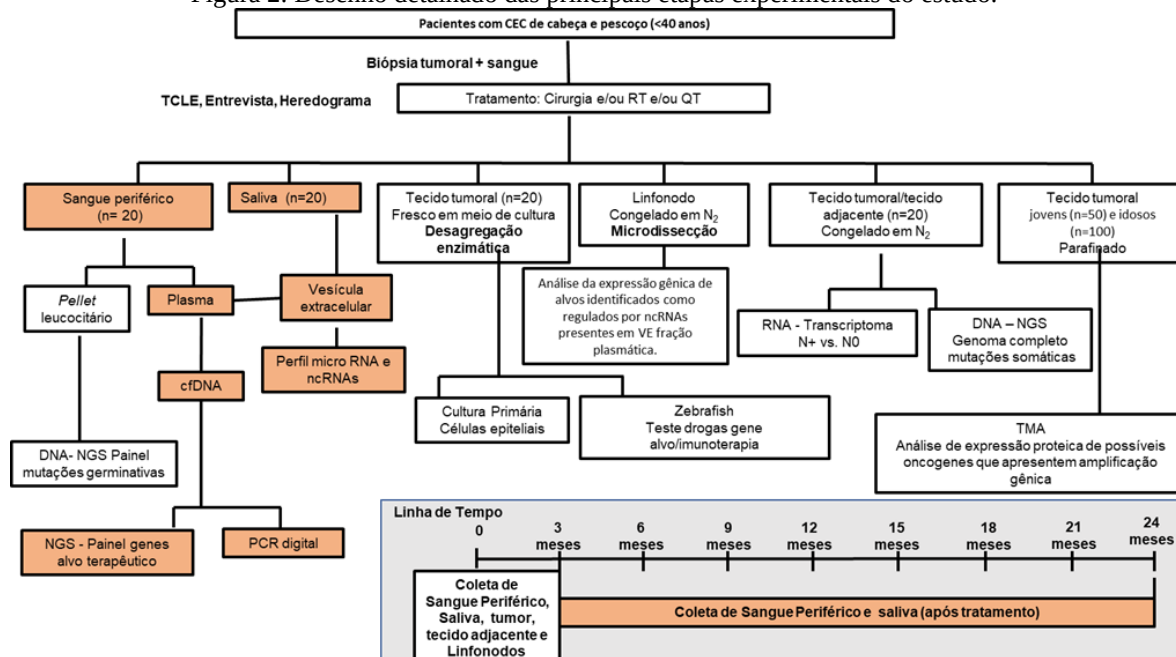
SUBPROJETO 5 - PAPEL DA BIÓPSIA LÍQUIDA NO CECAP

Pesquisadores envolvidos: Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira (FMUSP-Oncologia-Biologia molecular), Simone Maistro (FMUSP/ICESP- Biologia molecular), Fátima Solange Pasini

	Descrição do Projeto - PRONON Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	
---	--	---

(FMUSP-Biologia molecular), Isabela Cristina de Souza (FMUSP/ICESP-Biologia molecular), Fabio Albuquerque Marchi (ACCCC-Bioinformática), Luiz Paulo Kowalski (FMUSP-Cirurgia), Alexandre Bezerra (FMUSP/ICESP-Cirurgia), Raquel Ajub Moyses (FMUSP-Cirurgia).

Figura 2. Desenho detalhado das principais etapas experimentais do estudo.



Fonte: O autor (2020).

A figura acima ilustra o ataque experimental empregado neste módulo e sua associação com o subprojeto 2 e 4 (figura 2).

Coleta e processamento das amostras

Sangue Periférico (n=20 pacientes). Serão coletados 15 mL de sangue periférico e o plasma será separado por centrifugação 2500 xg por 10 min; o sobrenadante será coletado e centrifugado a 16.000xg por 10 minutos a -4°C e o sobrenadante será armazenado a -80°C. Será realizada coleta ao diagnóstico, a cada 3 meses no primeiro ano de seguimento; a cada 6 meses no segundo ano de seguimento. A amostra final será coletada ao final de 2 anos ou recidiva da doença (o que ocorrer antes).

Saliva (n=20 pacientes). A saliva não estimulada de pacientes e voluntários saudáveis será coletada em tubos graduados de 50 mL e mantida em gelo. A saliva será diluída 1: 1 com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e a saliva livre de células obtida por centrifugação a 1.500 xg e 3.000 xg para cinco min cada, a 4°C.

Análise de ctDNA

Obtenção de ctDNA (n=40 amostras de 20 pacientes, ao diagnóstico e durante o seguimento). A intenção é identificar mutações somáticas em ctDNA coletado ao diagnóstico e na recidiva da doença ou ao

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

final de 2 anos (o que ocorrer antes), para avaliar a capacidade de detecção precoce de recidiva. Se for detectada nova mutação na segunda avaliação, será realizada uma busca pregressa desta mutação específica, através de sequenciamento de ctDNA de amostras coletadas durante o seguimento clínico do paciente. O ctDNA no plasma será extraído com o *QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit* (Qiagen) no sistema a vácuo *QIAvac 24 Plus* (Qiagen).

Preparo das bibliotecas ($n=40$ amostras, sendo 2 por paciente, uma ao diagnóstico e uma durante o seguimento). Utilizaremos o *TruSight Oncology 500 ctDNA Kit* (48 amostras) (Illumina) que permite detectar variantes de nucleotídeo único (SNVs), pequenas inserções e deleções em 523 genes relacionados ao câncer, variação no número de cópias de 59 genes, fusões em 23 genes, detectar biomarcadores para determinar carga mutacional tumoral (TMB) e instabilidade de microsatélite (MSI). Serão necessários 30ng de ctDNA de cada amostra de plasma. A biblioteca será quantificada com *Qubit* e com o *High Sensitivity D1000 ScreenTape* (Agilent) utilizando o *TapeStation*. A normalização das bibliotecas será realizada com *beads* para garantir uma representação uniforme de cada biblioteca no pool final.

Sequenciamento de ctDNA. O sequenciamento de nova geração (NGS) será realizado na plataforma Illumina utilizando-se o equipamento *NovaSeq6000* com cobertura de 35.000 vezes. O algoritmo de chamada de variantes será o *Illumina® TruSight™ Oncology 500 ctDNA* utilizando-se o *DRAGEN Server v3*.

As alterações encontradas na amostra inicial serão seguidas ao longo do tempo utilizando a metodologia Digital Droplet PCR (ddPCR). Ao final de dois anos ou por ocasião de recidiva será realizada pesquisa de novas mutações utilizando-se o sequenciamento do painel de genes. Caso sejam identificadas novas mutações gênicas, essas serão pesquisadas retrospectivamente analisadas nas amostras coletadas durante seguimento.

Materiais e equipamentos

O Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) da ICESP/FMUSP dispõe da infraestrutura completa para a condução de todos os experimentos necessários.

O espaço físico está dividido em:

Laboratório de computação e escritórios (com 60 computadores pessoais para pesquisadores e estudantes), Wet Lab – BSL-1, Tissue Culture – BSL-1, Culture of Microorganisms – BSL-1, Tissue Culture – BSL-2, Researchers Study Room, Functional Genomics Laboratory, FLUIDIGM C1 June and Biomark HD, Refrigerated Cryostat Carl Zeiss Hyrax C25, Nanosight Malvern Panalytical, GeneChip Microarray and Illumina MiSeq, Inverted fluorescent microscope EVOS and hypoxia chamber, Applied Biosystems Attune Cytometer, Study Room, Laser Microdissection System LMD6500, Sequence platform Qiagen PyroMark Q24 e Sequence platform Capilar 3730 DNA, Animal Experimental Laboratory, Animal Imaging Laboratory, IVIS Spectrum In Vivo Imaging System, Small animal research PET/SPECT/CT.

Os laboratórios incluem os seguintes equipamentos:

Affymetrix GeneChip Microarray (1), Autoclave BSL-1 (1), Autoclave BSL-2 (1), Balança Analítica (2), Balança Micronal B-6000 (2), Banho-Maria(15), C1 (FLUIDIGM) (1), Capela de laboratório -

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

Fume Hood (4), Centrífuga (33), Citômetro Applied Biosystems Attune (1), Computador Biomark HD e computador dedicado (FLUIDIGM) (1), Computador High capacity (1), Concentrador de amostras (1), Congelador -20°C (29), Countess automated cell counter (2), Cryostat, Carl Zeiss, Hyrax C25 (1), DNA Workstation (3), Electroporator Eppendorf 4309 (1), Equipamento de eletroforese (1), Espectrofotômetro (4), Espectrofotômetro NanoDrop Technologies NanoDrop ND-1000 (1), Fornos de secagem de laboratório (3), Gabinete de biossegurança (12), Gel documentation system (DNA and RNA) e computador dedicado (2), Gel documentation system (protein) e computador dedicado (1), Genechip Hybridization Oven (1), Illumina MiSeq Next-Generation Sequencing System (1), Incubador (1), Incubador, CO₂, water jacketed (14), Juno (FLUIDIGM) (1), Luminex (1), Magnetic stirrer (4), Máquina de gelo (1), Medidor de pH (2), Microondas (1), Microscópio fluorescente invertido EVOS and hypoxia chamber (1), Microscópio fluorescente invertido EVOS FL Cell Imaging System (1), Microscópio fluorescente Nikon Eclipse E600 (1), Microscópio invertido (9), Nanosight (Malvern Panalytical) (1), Orbital Shaker (6), PCR e Real Time PCR Workstation (1), QiaCube Qiagen (1), Real time PCR (7500, HT 7900, StepOne) (3), Refrigerador (16), Sequence platform Capilar, 3730 DNA Analyzer (1), Sequence platform, Qiagen PyroMark Q24 (1), Sistema de microdissecção a laser LMD6500 (1), Sistema de purificação de água Millipore (1), TapeStation (1), Thermocyclers (3 Veritiss) (11), Thermomixer (8), Ultracentrífuga (1), Ultracongelador -80°C (9), Vortex (8) e Workstation PyroMark Q24 (1), Ventilated racks and cages (4), Small animal research PET/SPECT/CT (2), Biosafety cabinet BSL-1 (3), Biosafety cabinet BSL-2 (1), Ultrafreezer -80°C (1), IVIS Spectrum In Vivo Imaging System (1), Incubator CO₂ water jacketed (1), Small animal research Irradiator (1) e Inverted Microscope (1).

Também dispomos de uma central multiusuário (FMUSP Core Facility - Rede PREMium), contendo os seguintes equipamentos:

ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer (4), ABL800 FLEX (1), BD LSRFortessa (1), Bioanalyzer 2100 – ML (2), Biobank (1), Biorepository (1), CHEMIDOC – BIORAD (1), COBAS C111/pocH (1), Confocal microscope LSM 510 (1), EliSpot reader (1), FACS Fortessa LSR II (1), FilterMax F5 (1), Illumina HiSeq (1), Illumina MiSeq (3), Illumina NextSeq (1), Ion Torrent (1), iScan System (1), LC MS/MS (1), L-Pix Chemi Express (1), MAGPIX (Luminex), Manual Tissue Microarrayer 1 MTA-1 (1), Mouse, Rat, rabbit and zebrafish Vivarium (1), Muse Cell Analyzer (1), QIA Symphony SP (1), QuantStudio 12K Flex (1), QuantStudio 6 Flex (2), RM7Tesla (1), RS Autosampler (1), RS Column Compartment (1), RS Pump (1), UTI de animais (1), VEVO 2100 (1) e XtremeCT (1).

Análise dos dados

Anotação das sequências obtidas a partir do sequenciamento shotgun

A anotação das sequências obtidas será iniciada pela remoção de sequências de baixa qualidade (FASTX toolkit- http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) buscando garantir uma acurácia de pelo menos 99% (base-level - Q20). Posteriormente as sequências remanescentes serão alinhadas usando MegaBLAST¹³¹, onde buscaremos alinhamentos com dados genômicos de todos os organismos presentes em todo o banco NCBI NT/NR. Quando houver hits múltiplos, selecionaremos o mais significativo com base no

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

organismo com match usando o algoritmo LCA estabelecido pelo pacote MEGAN¹³². Para aprofundar nas análises de sequências virais e bacterianas, analisaremos todos os dados com os pacotes MetaPhlAn 2.0¹³³, SURPI¹³⁴ e BWA¹³⁵. Sequências derivadas do genoma humano servirão para alimentar os demais módulos do projeto, ajudando a identificar alterações moleculares presentes nestas amostras.

Anotação das sequências obtidas a partir do sequenciamento 16S rDNA

Todos os passos de filtragem e análise dos dados serão feitos usando o pipeline QIIME¹³⁶. Adicionalmente, usaremos o pacote Usearch¹³⁷ para buscar e remover sequências químéricas e para agrupar sequências com uma similaridade mínima de 97%. Taxonomia dos clusters será determinada usando o banco SILVA¹³⁸. As unidades taxonômicas operacionais (OTUs) assim obtidas serão usadas para análises posteriores de rarefação, riqueza e diversidade.

Análise de sequenciamento do painel de genes e identificação de mutações germinativas

Os arquivos FASTA serão depositados no BaseSpace (Illumina) e análise das alterações pontuais, deleções, inserções e alterações de número de cópias será realizado pelo software SOPHiA DDM® Analytical Platform (Sophia Genetics). As variantes serão nomeadas com a nomenclatura proposta pela Human Genome Variation Society, HGVS. As variantes serão pesquisadas em bancos de dados públicos de livre acesso, como ClinVar e ClinGen. Variantes, cujo efeito é desconhecido, serão analisadas in silico por meio dos modelos de predição de efeito, Polymorphism Phenotyping v2 (PolyPhen-2), Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT), Align-GVGD, para variantes missense; Protein Variation Effect Analyzer (Provean) para deleções in-frame, e Human Splicing Finder (HSF) para averiguar o potencial de variantes intrônicas e exônicas em induzir defeitos em sítios de splicing. Menor frequência alélica (Minor allele frequency-MAF) será checada nos bancos de dados 1000 Genomes Project database, The Genome Aggregation Database (gnomAD), the Exome Aggregation Consortium (ExAC), the Global MAF dbSNP, the Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Abrahom. A menor frequência alélica (MAF) também será avaliada nos probandos. As variantes serão classificadas de acordo com as recomendações do American College of Medical Genetics and Genomics (ACGM) em: patogênica, aparentemente patogênica, benigna, aparentemente benigna e variante de significado incerto (VSI).

Análise de sequenciamento do genoma e identificação de mutações somáticas

Os dados de genoma serão alinhados no BWA v0.5.7, usando o hg19 como referência do genoma humano. Todas as amostras serão processadas em conjunto usando o GATK v2.4.9 (realinhamento local e recalibração da base de qualidade). SAMtools v0.1.9 e Picard v1.107 serão usados para processar o bam headers e os index das amostras, respectivamente. Para detecção de variantes de um único nucleotídeo (do inglês Single Nucleotide Variants - SNVs), utilizaremos o software SomaticSniper (v1.0.2). Parâmetros padrão serão utilizados para a chamada das SNVs, exceto opção -q (limite de qualidade de mapeamento), no qual foi definido como 1. Para filtrar as variantes candidatas, um arquivo pileup indel será gerado para ambas as amostras (normal e tumoral) usando SAMtools (v0.1.6). O SomaticSniper fornece uma série de

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

Perl scripts para filtrar possíveis falsos positivos. Primeiramente, a filtragem padrão e perda de heterozigose (LOH) serão realizadas utilizando os arquivos pipleup InDel e, em seguida, filtro bam-readcount também será utilizado (bam-readcount), utilizando o filtro de qualidade mapeamento -q 1. Além disso, utilizaremos o filtro de falso positivo. Por fim, o filtro de alta confiança será utilizado com os parâmetros padrão. Será gerado arquivo VCF final.

Análise de sequenciamento do exoma e identificação de mutações somáticas.

Os dados brutos serão limpos pelo Seqclean (<https://bitbucket.org/izhbannikov/seqclean>) e leituras (reads) com QScore menores que 26 e/ou 24 e menos que 60 pb serão descartados. Para remover sequências de moléculas contaminantes de DNA, como adaptadores e vetores, será utilizado o banco de dados UniVec (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/univec/>).

Os reads serão alinhados ao genoma humano referência hg38 pelo SAMtools (<http://samtools.sourceforge.net/>) e GATK (<https://www.broadinstitute.org/gatk/>). Variantes serão anotadas com o ANNOVAR (www.openbioinformatics.org/annovar) e as sequências alteradas serão classificadas como patogênicas por programas, como SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant <http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) e POLYPHEN (Polymorphism Phenotyping-<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>). As alterações *drivers* serão selecionadas quando identificadas em pelo menos 20% dos pacientes da casuística avaliadas.

Análise transcriptômica e identificação de alterações em mRNA e ncRNAs

Os dados resultantes extraídos e chamada de bases será realizado pelo programa Analysis Viewer (SAV) and CASAVA (Illumina). A análise de pré-processamento, incluindo limpeza e mapeamento de sequências será efetuado para permitir a anotação. A normalização dos dados e a análise de expressão diferencial serão realizadas através do pacote edgeR¹³⁹.

Integração de dados

Pipelines de bioinformática serão desenvolvidos para a análise e integração de dados de todas as plataformas moleculares utilizadas, objetivando a descoberta de alterações *drivers*. Para todos os grupos de amostras, consideraremos as informações clínicas, como status de infecção por HPV, idade, tabagismo, desfecho clínico, para compararmos os perfis de mutações e transcriptômicos (RNAs codificadores e não codificadores). Todas as comparações serão realizadas com métodos estatísticos e considerando parâmetros criteriosos de significância ($P < 0.05$ e $FDR < 0.05$). Para a predição de drogas mais apropriadas para cada indivíduo, as alterações definidas como *drivers* serão mapeadas em base de dados de vias biológicas, como KEGG (www.genome.jp/kegg/) e REACTOME (www.reactome.org) e banco de dados de drogas (DRUGBANK at www.drugbank.ca), sugerindo o tratamento mais apropriado de forma individualizada para cada paciente. Para a integração multidimensional de dados será desenvolvido um algoritmo que (1) identificará genes com alta pontuação após combinação dos diferentes níveis de alterações moleculares, (2) identificará módulos de genes co-expressos a partir do perfil transcriptômicos obtido e (3) fará a associação

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

entre os genes selecionados e os módulos formados através de um método de árvores de decisão binária. Com os resultados obtidos é esperada a identificação de diferentes rotas de sinalização da doença ativadas por alvos específicos, permitindo a identificação de uma assinatura de genes que possa ser utilizada para a escolha da melhor terapia para os pacientes.

Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas serão feitas pelos programas Stata (Stata Corporation, College Station, TX, USA), SPSS (StatisticsPacket for Social Sciences) versão 21.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) e GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). O teste de Qui-Quadrado ou Exato de Fisher será utilizado para estudar associações entre as variáveis qualitativas, de acordo com frequências. Para a análise de variáveis expressas de forma numérica contínua, serão utilizados testes paramétricos (teste t pareado, teste t não pareado, ANOVA com pós-teste de Tukey e teste de correlação de Pearson). O teste F de Levene será utilizado para assumir ou não variâncias iguais entre os grupos comparados (teste t não pareado).

Análises de sobrevida serão feitas pelo teste univariável de log *rank* com método de Kaplan-Meier e multivariável de Regressão de Cox. A regressão logística multivariada será utilizada para estimar as *odds ratios* (OR) e os intervalos de confiança de 95%. Todas as ORs serão ajustadas por idade, sexo, nível de educação, consumo de álcool e cigarro. A intensidade dos peptídeos-alvos que caracteriza cada população imune será comparada na papa leucocitária entre pacientes jovens com CE de orofaringe HPV+ e HPV- utilizando o teste não paramétrico Mann-Whitney U. Além disso, serão realizadas as correlações da intensidade dos peptídeos-alvos com as características clínicas dos pacientes.

Para modelos contendo dados longitudinais, como de culturas celulares primárias, modelos em *zebrafish* e PDX serão monitorados, e utilizaremos o teste de ANOVA e teste t de Student para medidas contínuas para as comparações. A hipótese nula de todos os testes será rejeitada quando o valor de P bicaudado for $\leq 0,05$.

10. Resultados esperados

Com o estudo epidemiológico do tipo caso-controle esperamos uma caracterização atual do perfil de pacientes com CECP em nossa população. Programas de prevenção baseados na realidade epidemiológica atual poderão ser atualizados. A análise metagenômica da mucosa bucal desses pacientes poderá elucidar as alterações no microbioma relacionadas a fatores de risco de CECP e poderá revelar novos agentes etiológicos. Esse conhecimento poderá indicar mudanças que predisponham ao desenvolvimento da malignidade, passíveis de serem modificadas e de impactar o desenvolvimento das lesões. Pela identificação de mutações germinativas patogênicas e/ou combinações de polimorfismos relacionadas ao aumento de risco de CECP, poderemos estabelecer novos protocolos de rastreamento, prevenção e aconselhamento genético. A utilização de múltiplas abordagens moleculares nos tumores primários e microambiente tumoral contribuirá na identificação de alterações *drivers* e possíveis alvos terapêuticos, e podem indicar a melhor estratégia

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

terapêutica para cada paciente, assim como ajudar a melhor estratificar os pacientes de acordo com o prognóstico. Em conjunto com modelos funcionais e de uso de biópsias líquidas, que poderá ser utilizado no diagnóstico, seguimento e prognóstico, poderemos aperfeiçoar o tratamento de indivíduos com CE. Espera-se que ao final do projeto possamos estabelecer essas plataformas na rotina clínica para o manejo personalizado desses pacientes.

Os resultados finais poderão promover recomendações e protocolos de acompanhamento para os indivíduos de risco a ser implantado em unidades de atenção básica de saúde, serviços de prevenção e centros de tratamento de câncer em colaboração com o INCA e Ministério da Saúde.

11. Aspectos éticos

Este projeto será submetido à análise do sistema CEP-CONEP e somente será iniciado após aprovação. Serão observados todos os preceitos da Resolução CNS-MS 466, 2012. Todas as amostras coletadas dos pacientes serão realizadas sob consentimento informado com os projetos aprovados no CEP institucional. Todas as amostras coletadas seguirão o fluxo já bastante estabelecido em consonância com o Banco de Tumores do ICESP (reconhecido como Biobanco Institucional na CONEP). Está autorizado, portanto, a coletar, armazenar, processar e distribuir amostras biológicas humanas destinadas à pesquisa do câncer e pesquisas relacionadas. Seu funcionamento está, portanto, de acordo com o disposto na Portaria MS 2201/11 e Resolução CNS 441/11. Os protocolos de pesquisa que fazem uso da estrutura do BioBanco somente podem solicitar amostras após serem analisados e aprovados no Sistema CEP-CONEP, devendo estar em concordância com as diretrizes para ética em pesquisa em seres humanos explicitadas pela Resolução CNS 466/12 e demais Resoluções complementares.

Este projeto será submetido ao CEP das instituições envolvidas e sua aprovação será apresentada caso esta proposta seja aprovada.

12. Cronograma das atividades

O cronograma de atividades se encontra descrito na planilha Excel “Planilha-Modelo PRONON Carcinoma Epidermoide.xlsx”, na aba “Cronograma”.

13. Referências

1. Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J. & Pisani, P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int. J. cancer* **94**, 153–156 (2001).
2. Estatísticas de câncer | INCA - Instituto Nacional de Câncer. <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>.
3. Llewellyn, C. D., Johnson, N. W. & Warnakulasuriya, K. A. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people--a comprehensive literature review. *Oral Oncol.* **37**, 401–418 (2001).

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

4. Curado, M. P. & Hashibe, M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. *Curr. Opin. Oncol.* **21**, 194–200 (2009).
5. Kaminagakura, E. *et al.* High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Int. J. cancer* **130**, 1726–1732 (2012).
6. Anderson, K. S. *et al.* HPV16 antibodies as risk factors for oropharyngeal cancer and their association with tumor HPV and smoking status. *Oral Oncol.* **51**, 662–667 (2015).
7. Goodman, M. T. *et al.* Human papillomavirus genotype and oropharynx cancer survival in the United States of America. *Eur. J. Cancer* **51**, 2759–2767 (2015).
8. Llewellyn, C. D., Linklater, K., Bell, J., Johnson, N. W. & Warnakulasuriya, S. An analysis of risk factors for oral cancer in young people: a case-control study. *Oral Oncol.* **40**, 304–313 (2004).
9. Toporcov, T. N. *et al.* Risk factors for head and neck cancer in young adults: a pooled analysis in the INHANCE consortium. *Int. J. Epidemiol.* **44**, 169–185 (2015).
10. Martin-Granizo, R., Rodriguez-Campo, F., Naval, L. & Diaz Gonzalez, F. J. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients younger than 40 years. *Otolaryngol. neck Surg. Off. J. Am. Acad. Otolaryngol. Neck Surg.* **117**, 268–275 (1997).
11. Llewellyn, C. D., Linklater, K., Bell, J., Johnson, N. W. & Warnakulasuriya, K. A. A. S. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients aged 45 years and under: a descriptive analysis of 116 cases diagnosed in the South East of England from 1990 to 1997. *Oral Oncol.* **39**, 106–114 (2003).
12. Popovtzer, A. *et al.* Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young patients. *Laryngoscope* **114**, 915–917 (2004).
13. Chitapanarux, I. *et al.* Oral cavity cancers at a young age: analysis of patient, tumor and treatment characteristics in Chiang Mai University Hospital. *Oral Oncol.* **42**, 83–88 (2006).
14. Hashibe, M. *et al.* Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol. biomarkers Prev. a Publ. Am. Assoc. Cancer Res. cosponsored by Am. Soc. Prev. Oncol.* **18**, 541–550 (2009).
15. Hayes, D. N., Van Waes, C. & Seiwert, T. Y. Genetic Landscape of Human Papillomavirus-Associated Head and Neck Cancer and Comparison to Tobacco-Related Tumors. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 3227–3234 (2015).
16. Menezes, F. D. S. *et al.* The emerging risk of oropharyngeal and oral cavity cancer in HPV-related subsites in young people in Brazil. *PLoS One* **15**, e0232871 (2020).
17. Curado, M. P. & Boyle, P. Epidemiology of head and neck squamous cell carcinoma not related to tobacco or alcohol. *Curr. Opin. Oncol.* **25**, 229–234 (2013).
18. Huber, M. A. & Tantiwongkosi, B. Oral and oropharyngeal cancer. *Med. Clin. North Am.* **98**, 1299–1321 (2014).
19. López, R. V. M. *et al.* Human papillomavirus (HPV) 16 and the prognosis of head and neck cancer in a geographical region with a low prevalence of HPV infection. *Cancer Causes Control* **25**, 461–471 (2014).
20. Schutte, H. W. *et al.* Impact of Time to Diagnosis and Treatment in Head and Neck Cancer: A Systematic Review. *Otolaryngol. neck Surg. Off. J. Am. Acad. Otolaryngol. Neck Surg.* **162**, 446–457 (2020).
21. Ramsey, S. D. *et al.* Financial Insolvency as a Risk Factor for Early Mortality Among Patients With Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **34**, 980–986 (2016).
22. Yabroff, K. R., Bradley, C. & Shih, Y.-C. T. Understanding Financial Hardship Among Cancer Survivors in the United States: Strategies for Prevention and Mitigation. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am.*

	Descrição do Projeto - PRONON Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	
---	--	---

Soc. Clin. Oncol. **38**, 292–301 (2020).

23. Syse, A., Tretli, S. & Kravdal, Ø. Cancer's impact on employment and earnings--a population-based study from Norway. *J. Cancer Surviv.* **2**, 149–158 (2008).
24. Giuliani, M. *et al.* The prevalence and determinants of return to work in head and neck cancer survivors. *Support. care cancer Off. J. Multinat. Assoc. Support. Care Cancer* **27**, 539–546 (2019).
25. Isaksson, J., Wilms, T., Laurell, G., Fransson, P. & Ehrsson, Y. T. Meaning of work and the process of returning after head and neck cancer. *Support. care cancer Off. J. Multinat. Assoc. Support. Care Cancer* **24**, 205–213 (2016).
26. Ciconelli, R. M., de Soárez, P. C., Kowalski, C. C. G. & Ferraz, M. B. The Brazilian Portuguese version of the Work Productivity and Activity Impairment - General Health (WPAI-GH) Questionnaire. *Sao Paulo Med. J.* **124**, 325–332 (2006).
27. No Title خلاصه مقالات رسانه تلویزیون و سکولاریسم (1387).
28. Davies, A. *et al.* Assessing the validity of EQ-5D-5L in people with head & neck cancer: Does a generic quality of life measure perform as well as a disease-specific measure in a patient population? *Oral Oncol.* **101**, 104504 (2020).
29. Viegas Andrade, M. *et al.* Societal Preferences for EQ-5D Health States from a Brazilian Population Survey. *Value Heal. Reg. issues* **2**, 405–412 (2013).
30. Paster, B. J., Olsen, I., Aas, J. A. & Dewhirst, F. E. The breadth of bacterial diversity in the human periodontal pocket and other oral sites. *Periodontol.* **2000** **42**, 80–87 (2006).
31. Aas, J. A., Paster, B. J., Stokes, L. N., Olsen, I. & Dewhirst, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 5721–5732 (2005).
32. Meurman, J. H. Oral microbiota and cancer. *J. Oral Microbiol.* **2**, (2010).
33. Flemmig, T. F. & Beikler, T. Control of oral biofilms. *Periodontology* **2000** vol. 55 9–15 (2011).
34. Lazarevic, V., Whiteson, K., Hernandez, D., François, P. & Schrenzel, J. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics* **11**, 523 (2010).
35. Lacko, M. *et al.* Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **89**, 38–48 (2014).
36. Sabir, M., Baig, R. M., Mahjabeen, I. & Kayani, M. A. Novel germline CDK4 mutations in patients with head and neck cancer. *Hered. Cancer Clin. Pract.* **10**, 11 (2012).
37. Scheckenbach, K. *et al.* RAD51C--a new human cancer susceptibility gene for sporadic squamous cell carcinoma of the head and neck (HNSCC). *Oral Oncol.* **50**, 196–199 (2014).
38. Pfeiffer, J. *et al.* Head and neck cancer in young adults and nonsmokers: study of cancer susceptibility by genome-wide high-density SNP microarray mapping. *Acta Otolaryngol.* **131**, 1091–1098 (2011).
39. Wei, Q. *et al.* Genome-wide association study identifies three susceptibility loci for laryngeal squamous cell carcinoma in the Chinese population. *Nat. Genet.* **46**, 1110–1114 (2014).
40. Lesueur, C. *et al.* Genome-wide association analyses identify new susceptibility loci for oral cavity and pharyngeal cancer. *Nat. Genet.* **48**, 1544–1550 (2016).
41. Shete, S. *et al.* A genome-wide association study identifies two novel susceptible regions for squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* (2020) doi:10.1158/0008-5472.CAN-19-2360.
42. Tomczak, K., Czerwińska, P. & Wiznerowicz, M. The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge. *Contemp. Oncol. (Poznan, Poland)* **19**, A68-77 (2015).
43. Pickering, C. R. *et al.* Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young non-smokers is

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

genomically similar to tumors in older smokers. *Clin. Cancer Res.* **20**, 3842–3848 (2014).

44. Vettore, A. L. *et al.* Mutational landscapes of tongue carcinoma reveal recurrent mutations in genes of therapeutic and prognostic relevance. *Genome Med.* **7**, 98 (2015).
45. Knopf, A. *et al.* Oncogenes and tumor suppressor genes in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients. *Oncotarget* **6**, 3443–3451 (2015).
46. Pan-cancer analysis of whole genomes. *Nature* **578**, 82–93 (2020).
47. Calin, G. A. & Croce, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 857–866 (2006).
48. Wu, B., Xiong, X., Jia, J. & Zhang, W. MicroRNAs: new actors in the oral cancer scene. *Oral Oncol.* **47**, 314–319 (2011).
49. Kolenda, T. *et al.* Biological role of long non-coding RNA in head and neck cancers. *Reports Pract. Oncol. Radiother. J. Gt. Cancer Cent. Pozn. Polish Soc. Radiat. Oncol.* **22**, 378–388 (2017).
50. Kolenda, T. *et al.* Oncogenic Role of ZFAS1 lncRNA in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *Cells* **8**, (2019).
51. Hilly, O. *et al.* Distinctive pattern of let-7 family microRNAs in aggressive carcinoma of the oral tongue in young patients. *Oncol. Lett.* **12**, 1729–1736 (2016).
52. Zhang, S. *et al.* miR-30e-5p represses angiogenesis and metastasis by directly targeting AEG-1 in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Sci.* **111**, 356–368 (2020).
53. Tandon, D., Dewangan, J., Srivastava, S., Garg, V. K. & Rath, S. K. miRNA genetic variants: As potential diagnostic biomarkers for oral cancer. *Pathol. Res. Pract.* **214**, 281–289 (2018).
54. de Oliveira, S. I. *et al.* Platelet-activating factor receptor (PAF-R)-dependent pathways control tumour growth and tumour response to chemotherapy. *BMC Cancer* **10**, 200 (2010).
55. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
56. Maley, C. C. *et al.* Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 605–619 (2017).
57. Rosenblum, M. D., Remedios, K. A. & Abbas, A. K. Mechanisms of human autoimmunity. *J. Clin. Invest.* **125**, 2228–2233 (2015).
58. Knutson, K. L. & Disis, M. L. Tumor antigen-specific T helper cells in cancer immunity and immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* **54**, 721–728 (2005).
59. Safronetz, D. *et al.* Pathogenesis and host response in Syrian hamsters following intranasal infection with Andes virus. *PLoS Pathog.* **7**, e1002426 (2011).
60. Lørvik, K. B. *et al.* Adoptive Transfer of Tumor-Specific Th2 Cells Eradicates Tumors by Triggering an In Situ Inflammatory Immune Response. *Cancer Res.* **76**, 6864–6876 (2016).
61. DeNardo, D. G. *et al.* CD4(+) T cells regulate pulmonary metastasis of mammary carcinomas by enhancing protumor properties of macrophages. *Cancer Cell* **16**, 91–102 (2009).
62. Lechien, J. R. *et al.* Impact of HPV Infection on the Immune System in Oropharyngeal and Non-Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma: A Systematic Review. *Cells* **8**, (2019).
63. Tchieu, J. H. *et al.* The PlantsP and PlantsT Functional Genomics Databases. *Nucleic Acids Res.* **31**, 342–344 (2003).
64. Ostroumov, D., Fekete-Drimusz, N., Saborowski, M., Kühnel, F. & Woller, N. CD4 and CD8 T lymphocyte interplay in controlling tumor growth. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 689–713 (2018).
65. Strauss, L., Bergmann, C., Gooding, W., Johnson, J. T. & Whiteside, T. L. The frequency and suppressor function of CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ T cells in the circulation of patients with squamous

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

- cell carcinoma of the head and neck. *Clin. cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13**, 6301–6311 (2007).
66. Grønhøj, C. *et al.* Pattern of and survival following loco-regional and distant recurrence in patients with HPV+ and HPV- oropharyngeal squamous cell carcinoma: A population-based study. *Oral Oncol.* **83**, 127–133 (2018).
 67. O’Rorke, M. A. *et al.* Human papillomavirus related head and neck cancer survival: a systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* **48**, 1191–1201 (2012).
 68. Miranda Galvis, M. *et al.* Different patterns of expression of cell cycle control and local invasion-related proteins in oral squamous cell carcinoma affecting young patients. *J. oral Pathol. Med. Off. Publ. Int. Assoc. Oral Pathol. Am. Acad. Oral Pathol.* **47**, 32–39 (2018).
 69. Bello, I. O. *et al.* Histological characteristics of early-stage oral tongue cancer in young versus older patients: A multicenter matched-pair analysis. *Oral Dis.* **26**, 1081–1085 (2020).
 70. Lotem, J. & Sachs, L. Regulation of leukaemic cells by interleukin 6 and leukaemia inhibitory factor. *Ciba Found. Symp.* **167**, 80–99 (1992).
 71. Ferris, R. L. Immunology and Immunotherapy of Head and Neck Cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **33**, 3293–3304 (2015).
 72. Panciera, T., Azzolin, L., Cordenonsi, M. & Piccolo, S. Mechanobiology of YAP and TAZ in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 758–770 (2017).
 73. Park, H. W. *et al.* Alternative Wnt Signaling Activates YAP/TAZ. *Cell* **162**, 780–794 (2015).
 74. Wang, Y. *et al.* Comprehensive Molecular Characterization of the Hippo Signaling Pathway in Cancer. *Cell Rep.* **25**, 1304-1317.e5 (2018).
 75. Dong, X. *et al.* YAP/TAZ: a promising target for squamous cell carcinoma treatment. *Cancer Manag. Res.* **11**, 6245–6252 (2019).
 76. Piersma, B., Bank, R. A. & Boersema, M. Signaling in Fibrosis: TGF-beta, WNT, and YAP/TAZ Converge. *Front. Med.* **2**, 59 (2015).
 77. Noguchi, S., Saito, A. & Nagase, T. YAP/TAZ Signaling as a Molecular Link between Fibrosis and Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
 78. Curry, J. M. *et al.* Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. *Semin. Oncol.* **41**, 217–234 (2014).
 79. Feig, C. *et al.* Targeting CXCL12 from FAP-expressing carcinoma-associated fibroblasts synergizes with anti-PD-L1 immunotherapy in pancreatic cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 20212–20217 (2013).
 80. Santos-de-Frutos, K., Segrelles, C. & Lorz, C. Hippo Pathway and YAP Signaling Alterations in Squamous Cancer of the Head and Neck. *J. Clin. Med.* **8**, (2019).
 81. Taha, Z., Janse van Rensburg, H. J. & Yang, X. The Hippo Pathway: Immunity and Cancer. *Cancers (Basel)*. **10**, (2018).
 82. Nguyen, C. D. K. & Yi, C. YAP/TAZ Signaling and Resistance to Cancer Therapy. *Trends in cancer* **5**, 283–296 (2019).
 83. Kaskas, N. M. *et al.* Serum biomarkers in head and neck squamous cell cancer. *JAMA Otolaryngol. Head Neck Surg.* **140**, 5–11 (2014).
 84. Sepiashvili, L. *et al.* Novel insights into head and neck cancer using next-generation ‘omic’ technologies. *Cancer Res.* **75**, 480–486 (2015).
 85. Heitzer, E., Haque, I. S., Roberts, C. E. S. & Speicher, M. R. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat. Rev. Genet.* **20**, 71–88 (2019).

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

86. Otandault, A. *et al.* Recent advances in circulating nucleic acids in oncology. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **30**, 374–384 (2019).
87. Thierry, A. R. *et al.* Clinical utility of circulating DNA analysis for rapid detection of actionable mutations to select metastatic colorectal patients for anti-EGFR treatment. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* **28**, 2149–2159 (2017).
88. Guibert, N. *et al.* Targeted sequencing of plasma cell-free DNA to predict response to PD1 inhibitors in advanced non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* **137**, 1–6 (2019).
89. Li, R. *et al.* Clinical, genomic, and metagenomic characterization of oral tongue squamous cell carcinoma in patients who do not smoke. *Head Neck* **37**, 1642–1649 (2015).
90. Phallen, J. *et al.* Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Sci. Transl. Med.* **9**, (2017).
91. Hosni, A. *et al.* Predictors of Early Recurrence Prior to Planned Postoperative Radiation Therapy for Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma and Outcomes Following Salvage Intensified Radiation Therapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **103**, 363–373 (2019).
92. Bettgowda, C. *et al.* Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci. Transl. Med.* **6**, 224ra24 (2014).
93. Forshew, T. *et al.* Noninvasive identification and monitoring of cancer mutations by targeted deep sequencing of plasma DNA. *Sci. Transl. Med.* **4**, 136ra68 (2012).
94. Jones, S. *et al.* Comparative lesion sequencing provides insights into tumor evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 4283–4288 (2008).
95. Diaz, L. A. J. & Bardelli, A. Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **32**, 579–586 (2014).
96. Delgado, P. O. *et al.* Characterization of cell-free circulating DNA in plasma in patients with prostate cancer. *Tumour Biol.* **34**, 983–986 (2013).
97. Wong, A. L. A. *et al.* Tumour pharmacodynamics and circulating cell free DNA in patients with refractory colorectal carcinoma treated with regorafenib. *J. Transl. Med.* **13**, 57 (2015).
98. Braig, F. *et al.* Liquid biopsy monitoring uncovers acquired RAS-mediated resistance to cetuximab in a substantial proportion of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Oncotarget* **7**, 42988–42995 (2016).
99. Cao, H. *et al.* Quantitation of human papillomavirus DNA in plasma of oropharyngeal carcinoma patients. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* **82**, e351-8 (2012).
100. Chera, B. S. *et al.* Rapid Clearance Profile of Plasma Circulating Tumor HPV Type 16 DNA during Chemoradiotherapy Correlates with Disease Control in HPV-Associated Oropharyngeal Cancer. *Clin. Cancer Res.* **25**, 4682–4690 (2019).
101. Schrock, A. *et al.* Free-Circulating Methylated DNA in Blood for Diagnosis, Staging, Prognosis, and Monitoring of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Patients: An Observational Prospective Cohort Study. *Clin. Chem.* **63**, 1288–1296 (2017).
102. Nawroz-Danish, H. *et al.* Microsatellite analysis of serum DNA in patients with head and neck cancer. *Int. J. cancer* **111**, 96–100 (2004).
103. Baumeister, P. *et al.* High Expression of EpCAM and Sox2 is a Positive Prognosticator of Clinical Outcome for Head and Neck Carcinoma. *Sci. Rep.* **8**, 14582 (2018).
104. Yáñez-Mó, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J. Extracell. vesicles* **4**, 27066 (2015).
105. Antonyak, M. A. & Cerione, R. A. Microvesicles as mediators of intercellular communication in cancer. *Methods Mol. Biol.* **1165**, 147–173 (2014).

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

106. Vlasov, A. V, Magdaleno, S., Setterquist, R. & Conrad, R. Exosomes: current knowledge of their composition, biological functions, and diagnostic and therapeutic potentials. *Biochim. Biophys. Acta* **1820**, 940–948 (2012).
107. Le, N.-A., Tomassini, J. E., Tershakovec, A. M., Neff, D. R. & Wilson, P. W. F. Effect of Switching From Statin Monotherapy to Ezetimibe/Simvastatin Combination Therapy Compared With Other Intensified Lipid-Lowering Strategies on Lipoprotein Subclasses in Diabetic Patients With Symptomatic Cardiovascular Disease. *J. Am. Heart Assoc.* **4**, e001675 (2015).
108. Dias, F. *et al.* Plasma Extracellular Vesicle-Derived TIMP-1 mRNA as a Prognostic Biomarker in Clear Cell Renal Cell Carcinoma: A Pilot Study. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, (2020).
109. Donnarumma, E. *et al.* Cancer-associated fibroblasts release exosomal microRNAs that dictate an aggressive phenotype in breast cancer. *Oncotarget* **8**, 19592–19608 (2017).
110. Cinpolat, O., Unal, Z. N., Ismi, O., Gorur, A. & Unal, M. Comparison of microRNA profiles between benign and malignant salivary gland tumors in tissue, blood and saliva samples: a prospective, case-control study. *Braz. J. Otorhinolaryngol.* **83**, 276–284 (2017).
111. Pritchard, C. C. *et al.* Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev. Res. (Phila.)* **5**, 492–497 (2012).
112. Kawakubo-Yasukochi, T. *et al.* miR-200c-3p spreads invasive capacity in human oral squamous cell carcinoma microenvironment. *Mol. Carcinog.* **57**, 295–302 (2018).
113. Fukumoto, I. *et al.* Tumor-suppressive microRNAs (miR-26a/b, miR-29a/b/c and miR-218) concertedly suppressed metastasis-promoting LOXL2 in head and neck squamous cell carcinoma. *J. Hum. Genet.* **61**, 109–118 (2016).
114. Li, L. *et al.* Exosomes Derived from Hypoxic Oral Squamous Cell Carcinoma Cells Deliver miR-21 to Normoxic Cells to Elicit a Prometastatic Phenotype. *Cancer Res.* **76**, 1770–1780 (2016).
115. Weber, J. A. *et al.* The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin. Chem.* **56**, 1733–1741 (2010).
116. Pfaffe, T., Cooper-White, J., Beyerlein, P., Kostner, K. & Punyadeera, C. Diagnostic potential of saliva: current state and future applications. *Clin. Chem.* **57**, 675–687 (2011).
117. Ogawa, Y., Taketomi, Y., Murakami, M., Tsujimoto, M. & Yanoshita, R. Small RNA transcriptomes of two types of exosomes in human whole saliva determined by next generation sequencing. *Biol. Pharm. Bull.* **36**, 66–75 (2013).
118. Kowalski, L. P. *et al.* Lateness of diagnosis of oral and oropharyngeal carcinoma: factors related to the tumour, the patient and health professionals. *Eur. J. Cancer. B. Oral Oncol.* **30B**, 167–173 (1994).
119. Kolnick, L. *et al.* Associations of oral health items of the Vanderbilt Head and Neck Symptom Survey with a dental health assessment. *Oral Oncol.* **50**, 135–140 (2014).
120. Jackson, L. K. *et al.* Development of tools for the oral health and panoramic radiograph evaluation of head and neck cancer patients: a methodological study. *Spec. Care Dentist.* **35**, 243–252 (2015).
121. Morais-Faria, K. *et al.* Young head and neck cancer patients are at increased risk of developing oral mucositis and trismus. *Support. care cancer Off. J. Multinat. Assoc. Support. Care Cancer* (2020) doi:10.1007/s00520-019-05241-x.
122. Eisbruch, A. *et al.* How should we measure and report radiotherapy-induced xerostomia? *Semin. Radiat. Oncol.* **13**, 226–234 (2003).
123. Dijkstra, P. U., Huisman, P. M. & Roodenburg, J. L. N. Criteria for trismus in head and neck oncology. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* **35**, 337–342 (2006).
124. Louise Kent, M. *et al.* Radiation-induced trismus in head and neck cancer patients. *Support. care cancer Off. J. Multinat. Assoc. Support. Care Cancer* **16**, 305–309 (2008).
125. Thomas, A. M. *et al.* Alcohol and tobacco consumption affects bacterial richness in oral cavity mucosa

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

- biofilms. *BMC Microbiol.* **14**, 250 (2014).
126. Carnielli, C. M. *et al.* Combining discovery and targeted proteomics reveals a prognostic signature in oral cancer. *Nat. Commun.* **9**, 3598 (2018).
 127. Martín-Sánchez, F. *et al.* Lytic cell death induced by melittin bypasses pyroptosis but induces NLRP3 inflammasome activation and IL-1 β release. *Cell Death Dis.* **8**, e2984 (2017).
 128. Kononen, J. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* **4**, 844–847 (1998).
 129. Oppel, F. *et al.* An Effective Primary Head and Neck Squamous Cell Carcinoma In Vitro Model. *Cells* **8**, (2019).
 130. Al-Samadi, A. *et al.* PCR-based zebrafish model for personalised medicine in head and neck cancer. *J. Transl. Med.* **17**, 235 (2019).
 131. Wolfsberg, T. G. & Madden, T. L. Sequence similarity searching using the BLAST family of programs. *Curr. Protoc. protein Sci.* **Chapter 2**, Unit2.5 (2001).
 132. Huson, D. H., Auch, A. F., Qi, J. & Schuster, S. C. MEGAN analysis of metagenomic data. *Genome Res.* **17**, 377–386 (2007).
 133. Segata, N. *et al.* Metagenomic microbial community profiling using unique clade-specific marker genes. *Nat. Methods* **9**, 811–814 (2012).
 134. Naccache, S. N. *et al.* A cloud-compatible bioinformatics pipeline for ultrarapid pathogen identification from next-generation sequencing of clinical samples. *Genome Res.* **24**, 1180–1192 (2014).
 135. Li, H. & Durbin, R. Fast and accurate long-read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics* **26**, 589–595 (2010).
 136. Caporaso, J. G. *et al.* QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods* vol. 7 335–336 (2010).
 137. Edgar, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* **26**, 2460–2461 (2010).
 138. Quast, C. *et al.* The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res.* **41**, D590–6 (2013).
 139. Robinson, M. D., McCarthy, D. J. & Smyth, G. K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**, 139–140 (2010).

Referências

BRAY, F. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 68, n. 6, p. 394–424, nov. 2018.

DUPONT, W. D.; PLUMMER, W. D. Power and sample size calculations: A review and computer program. **Controlled Clinical Trials**, v. 11, n. 2, p. 116–128, 1 abr. 1990.

Referências

Lesseur, C., et al. (2016). Genome-wide association analyses identify new susceptibility loci for oral cavity and pharyngeal cancer. **Nature genetics**, 48(12), 1544-1550.

Shete, et al (2020). A genome-wide association study identifies two novel susceptible regions for squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer research**, 80(12), 2451-2460).

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

--

14. Resultados anuais esperados

RESULTADOS ESPERADOS		SUBPROJETO	INDICADOR	META QUANTITATIVA
Ano 01	Coleta e processamento de material (ano 1). Obtenção do TCLE e dados epidemiológicos dos indivíduos. Serão obtidas amostras de biópsia e peça cirúrgica dos pacientes e seleção de amostras já armazenadas em biobancos e arquivos de blocos de parafina. Além disso, será colhida uma amostra de swab bucal, saliva e sangue de pacientes e controles para análise. O material será processado e avaliado pelas metodologias propostas no estudo.	subprojetos: todos	Percentual da casuística incluída.	Recrutamento, coleta de material de estudo e assinatura de TCLE de 50% pacientes jovens/ou não tabagistas/etilistas (n=25) e controles (n=50). amostras biológicas coletadas de participantes jovens ou não tabagistas/etilistas (n=10)
Ano 02	Coleta e processamento de material (ano 2). Obtenção de TCLE, dados e material biológico do restante da casuística, para as análises epidemiológicas e de pesquisa básica e translacional	subprojetos: todos	Percentual da casuística incluída.	Conclusão do recrutamento, coleta de material de estudo e assinatura de TCLE (total totalizando 50 pacientes jovens, e/ou não tabagistas/etilistas e 100 controles sem câncer ou portadores de CEC e idade >40 anos. amostras biológicas coletadas de participantes jovens e/ou não tabagistas/etilistas (n=10)
	Coleta de material durante o acompanhamento. Serão colhidas amostras de saliva e sangue dos pacientes com CEC após a cirurgia. O material será processado para posterior análise pelos painéis moleculares gerados.	subprojeto 5	Número de coletas de material de todos os pacientes com lesões malignas após o tratamento inicial.	Coleta de saliva e sangue periférico de casos com câncer em diferentes momentos do tratamento (20 coletas)
	Caracterização da microbiota oral dos pacientes estudados. Identificação da população bacteriana e viral presentes em swab bucal de pacientes e controles saudáveis, assim como buscar possíveis associações entre estes microrganismos e o desenvolvimento dos tumores.	subprojeto 2	Número de casos avaliados por Shotgun seq e 16 rDNA seq, e conclusão de análises de metagenômica.	Análise metagenômica na cavidade oral de pacientes jovens/não tabagistas e não etilistas (n=50) e indivíduos sem câncer (n=50) .
	Identificação de fatores genéticos de risco ao CEC Revelar mutações germinativas patogênicas e/ou combinações de polimorfismos relacionadas ao aumento de risco de CEC em pacientes jovens e/ou com histórico familiar de câncer e/ou ausência de histórico de tabagismo e infecção por HPV.	subprojeto 2	Número de casos avaliados pelo sequenciamento do genoma e microarray para análise de polimorfismos, e conclusão de análises relacionadas.	Identificação de alterações genéticas germinativas por sequenciamento de pacientes jovens/não tabagistas e não etilistas (n=20 prospectivos) e por microarray de GWAS, incluindo casos não jovens e tabagistas/etilistas (n=300 prospectivos e retrospectivos).
	Caracterização do perfil molecular dos CEC. Identificação de alterações em nível genômico e transcriptômico associadas com as lesões estudadas.	subprojeto 2	Número de casos avaliados pelo sequenciamento do genoma, RNA-seq e PCR para miRNA, e conclusão de análises relacionadas.	Caracterização de alterações genômicas e transcriptômicas (mRNA e miRNA) de 20 casos jovens e/ou não tabagistas e etilistas e comparação com banco de dados públicos.
	Estudo do microambiente tumoral. Obtenção do perfil proteico e de cada população do sistema imune “in situ” e no sangue periférico	subprojeto 3	Número de casos avaliados por LC-MS/MS, citometria	Caracterização do microambiente tumoral do CEC de 20 casos prospectivos (LC-MS/MS, citometria de fluxo e scRNA-seq)

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

	de pacientes com CECP.		de fluxo, scRNA-seq e imunistoquímica e conclusão de análises relacionadas.	e 50 casos e 50 controles retrospectivos e prospectivos (imunohistoquímica)
	Análise de bioinformática dos dados gerados. Utilização de ferramentas de bioinformática para a análise dos dados obtidos pelas técnicas de sequenciamento de nova geração, além da comparação entre grupos de pacientes de acordo com características clínico-patológicas. Os dados serão integrados para a identificação de marcadores que serão posteriormente avaliados em biópsias líquidas.	subprojetos 2 e 3	Número de scripts desenvolvidos de bioinformática para a identificação de alterações em sequências de DNA e/ou RNA e número de metodologias de integração de dados e predição de sensibilidade a fármacos.	Conclusão de análise em larga escala de genômica e transcriptômica para os 20 casos jovens/não tabagistas e etilistas, e identificação de ~20 marcadores obtidos pela integração de dados e elaboração de painéis de rastreamento.
Ano 03	Caracterização clínica e epidemiológica de pacientes com CECP. Conhecimento do perfil atual de pacientes com CECP em nossa população, conhecer o impacto social e de qualidade de vida.	subprojeto 1	Conclusão de análises descritivas, inferenciais e interpretação de resultados.	Término de estudos epidemiológicos envolvendo 150 indivíduos.
	Estudo com modelos <i>in vivo</i>. Corroborar as hipóteses originadas de análises genômicas e de bioinformática dos subprojetos anteriores com modelos de estudos funcionais.	subprojeto 4	Número de modelos de PDX (zebrafish e murinos) estabelecidos e tratamentos com fármacos	Teste de sensibilidade a fármacos para cerca de 10 modelos <i>in vivo</i> , para encontrar melhores combinações terapêuticas para a personalização do tratamento.
	Avaliação dos marcadores identificados em biópsias líquidas. Utilização dos marcadores identificados para a construção de painéis para uso em biópsias líquidas, incluindo análise de DNA tumoral circulante (ctDNA) e vesículas extracelulares séricas e de saliva.	subprojeto 5	Número de ensaios de biópsia líquida concluídos em amostras de sangue e saliva de pacientes.	Aplicação de painéis de miRNA em exossomos de saliva e sangue, e de painéis mutacionais em ctDNA em sangue para os 20 pacientes incluídos em todas as coletas obtidas.
	Divulgação de resultados. Publicações científicas em revistas da área e apresentações em eventos científicos nacionais e internacionais.	subprojetos: todos	Número de publicações de artigos e resumos em congressos.	Cerca de 5 artigos publicados e 15 resumos publicados em congressos importantes.

15. Produtos

	PRODUTO	SUBPROJETO	INDICADOR	META QUANTITATIVA	META POR SUBPROJETO
1	Programas de prevenção do CECP baseado na realidade epidemiológica atual.	subprojeto 1	Quantidade de programas de prevenção elaborados	1 programa de prevenção elaborado	
2	Protocolos de prevenção, detecção e combate de possíveis novos agentes infecciosos relacionados ao CECP.	subprojeto 2	Quantidade de protocolos de prevenção, detecção e combate ao agente etiológico elaborados	1 protocolo de prevenção, 1 kit de detecção e 1 método de tratamento	Identificar agentes biológicos que estejam associados às lesões que estão sendo investigadas neste estudo.
3	Ferramentas de rastreamento de susceptibilidade genética ao CECP	subprojeto 2	Quantidade de dados que possam auxiliar a elaboração de um quadro de fatores de risco para pacientes jovens e/ou sem fatores predisponentes	1 relatório do perfil de mutações germinativas candidatas a um painel de sequenciamento	Descrever todas as mutações patogênicas encontradas (não há como prever o número) e depositar em banco de dados públicos (BIPmed - Brasil; Clinvar -

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

			clássicos (etilismo e tabagismo)		internacional)
4	Atlas de alterações moleculares do CECP de pacientes jovens e/ou não-tabagistas.	subprojeto 2	Quantidade de banco de dados de alta qualidade gerados	1 base de dados	Descrever todas as alterações somáticas encontradas (não há como prever o número) e depositar em banco de dados públicos (cBioPortal)
5	Descoberta de interações entre células tumorais e o microambiente tumoral que possam ser manipuladas farmacologicamente ou serem utilizadas como biomarcadores.	subprojeto 3	biomarcadores prognósticos ou preditivos de resposta	1 base de dados de biomarcadores do microambiente tumoral	1 base de dados de biomarcadores do microambiente tumoral
6	Elaboração de algoritmos e <i>pipelines</i> para identificação de alterações <i>drivers</i> que possam guiar terapias em CECP	subprojetos 1-5	Quantidade de algoritmos e <i>pipelines</i> desenvolvidos	1 algoritmo / <i>pipeline</i>	1 algoritmo pela integração de dados de todos os subprojetos para a identificação de drivers
7	Metodologia de integração de dados clínico-patológicos e moleculares para a predição de prognóstico.	subprojetos 1-5	Quantidade de métodos desenvolvidos	1 método	1 algoritmo pela integração de dados clínico-patológicos e moleculares para a predição de prognóstico
8	Painéis de análise de ctDNA e conteúdo transcriptômico de vesículas extracelulares para uso em biópsias líquidas.	subprojeto 5	Quantidade de métodos baseados em biópsia líquida gerados	2 métodos	1 painel para análise de ctDNA; 1 painel para análise do transcriptoma de vesículas
9	Dissertações de mestrado e teses de doutorado defendidas.	subprojetos 1-5	Quantidade de dissertações/teses defendidas	5 dissertações/teses defendidas	1/subprojeto (1-5)
10	Publicações de resumos em eventos científicos nacionais e internacionais.	subprojetos 1-5	Quantidade de resumos publicados	15 resumos publicados	3/subprojeto (1-5)
11	Submissão de artigos científicos em revistas respeitadas na área.	subprojetos 1-5	Quantidade de artigos submetidos	5 artigos submetidos	1/subprojeto

16. Monitoramento e Avaliação

- Reuniões semanais com a equipe de enfermeiras de pesquisa para avaliação do fluxo de coleta e assinatura dos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido pelos pacientes (Valor não aplicável).
- Reuniões mensais com as equipes de execução das diversas etapas do projeto (Valor não aplicável).
- Análise bimestral do cumprimento de metas segundo o Plano de Atividades do projeto (Valor não aplicável).

17. Abrangência do projeto

População e/ou instituições beneficiadas

Uma vez que se trata de projeto de pesquisa não intervencionista a população que doará amostras para o projeto não se beneficiará diretamente dos resultados. Indiretamente, os resultados obtidos no projeto apoiarão o desenvolvimento de abordagens que permitirão oferecer aos pacientes portadores e câncer na comunidade Brasileira, e mais especificamente aqueles atendidos pelo SUS, um tratamento personalizado e

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

mais adequado com seguimento de resposta terapêutica que permitirão intervenções menos invasivas e mais assertivas no tratamento e abordagem destes pacientes.

O Ministério da Saúde, o Estado e Município de São Paulo, por meio de secretarias municipais e estaduais de Saúde, podem apoiar esta proposta uma vez que ela segue a Política Nacional de Promoção da Saúde (portaria GM/MS número 687 de 30/3/2006), que tem por objetivo promover a qualidade de vida e reduzir a vulnerabilidade e os riscos à saúde relacionados a seus determinantes e condicionantes.

Dimensão geográfica

O projeto contará com amostras tumorais, tecido histologicamente normal adjacente ao tumor, de sangue periférico, de saliva, mucosa oral e dados clínicos de pacientes atendidos no ICESP/HC-FMUSP. Serão ainda coletadas amostras de sangue de indivíduos controles saudáveis. Estes pacientes e controles são provenientes majoritariamente de distritos do município de São Paulo e Grande São Paulo. Indiretamente, os resultados obtidos a partir deste projeto devem beneficiar os portadores de câncer em toda a comunidade Brasileira.

Vagas ofertadas

Cumprindo-se as diretrizes éticas constantes na Portaria MS 2201/11 e Resolução CNS 441/11, espera-se que após a autorização fornecida por meio de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido sejam coletadas amostras. Serão incluídos cerca de 240 pacientes diagnosticados com CECP e 240 indivíduos saudáveis no braço prospectivo do projeto.

18. Disseminação dos Resultados

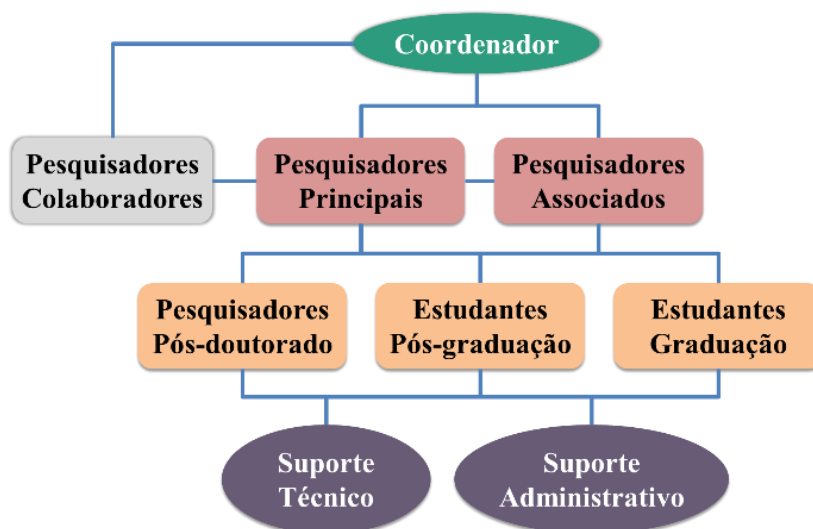
Os resultados deste projeto serão divulgados em conferências científicas anuais internacionais especializadas, como American Association for Cancer Research (AACR), American Society for Clinical Oncology (ASCO), European Society for Medical Oncology (ESMO), American Head And Neck Society (AHNS), International Academy of Oral Oncology (IAOO), Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica, Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas, Sociedade Brasileira de Estomatologia (SOBE), além de eventos locais, encontros nacionais e latino-americanos.

Os dados obtidos nessa proposta serão publicados em periódicos de alto impacto nas áreas relacionadas. As informações e resultados deste estudo serão divulgadas nos websites das instituições envolvidas e por veículos de imprensa de todo o Brasil, atingindo diferentes segmentos da sociedade, como pacientes, acompanhantes, médicos, profissionais de saúde, gestores de recursos humanos, pesquisadores e alunos.

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

19. Organograma

Organograma da proposta



COORDENAÇÃO

Luiz Paulo Kowalski

Professor Titular de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMUSP. Possui graduação em Medicina pela Universidade Federal do Paraná (1979), residência médica em cancerologia cirúrgica pela Fundação Antonio Prudente (1980-1983), especialização em cirurgia de cabeça e pescoço pelo Hospital Heliópolis (1984), mestrado em Medicina (Otorrinolaringologia) pela Universidade Federal de São Paulo (1986) e doutorado em Medicina (Otorrinolaringologia) pela Universidade Federal de São Paulo (1989). Durante o doutorado, estagiou como bolsista CNPq no Head and Neck Service do Memorial Sloan Kettering Cancer Center. Professor Livre-Docente em Oncologia pela FMUSP (1996). De 1990 a 2020 foi Diretor do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia A. C. Camargo Cancer Center. Desde 2019 Coordena o Centro de Referência em Oncologia de Cabeça e Pescoço do A.C. Camargo Cancer Center. Orientador dos Cursos de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração em Oncologia da Fundação Antônio Prudente e da Faculdade de Medicina Universidade de São Paulo, onde já orientou 41 alunos de mestrado e 43 de doutorado. Professor Titular de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da FMUSP desde 2019. Atualmente é PI do INCT INCITO-INOTE. Coordenou o INCT em Oncogenômica e foi PI do CEPID Antonio Prudente Cancer Research Center. Recebeu 33 auxílios de pesquisa até o presente. É membro do Corpo Editorial dos periódicos Surgical Oncology (Oxford), Head & Neck, Acta Otorhinolaryngologica Italica, Oral Oncology, Revista Brasileira de Cirurgia da Cabeça e Pescoço, Revista Brasileira de Cancerologia e Revista da AMB. Ex-Presidente da Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (2006-2007), Ex-Presidente da International Academy of Oral Oncology (IAOO) (2014-2015). Publicou 690 trabalhos científicos, sendo 550

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

em periódicos referenciados no PubMed. Estes artigos foram citados 13805 vezes de acordo com o Web of Science e o índice H alcançou 56 em 2020. Tem experiência na área de Medicina, com ênfase no ensino, pesquisa e assistência em Cirurgia de Cabeça e Pescoço, atuando principalmente nos seguintes temas: cabeça e pescoço, câncer, boca, tireóide, laringe, esvaziamentos cervicais, tratamento. Atualmente é vice-chairman do Grupo de Cirurgia de cabeça e pescoço do Latin American Cooperative Oncology Group (LACOG) e Diretor Científico do Grupo Brasileiro de Câncer de Cabeça e Pescoço.

EPIDEMIOLOGIA

Tatiana Natasha Toporcov

Cirurgiã-dentista com doutorado direto em Ciências odontológicas (concentração em odontologia social) pela Faculdade de Odontologia da USP, pós-doutorado em Epidemiologia realizado na Faculdade de Saúde Pública da USP. Atualmente é Professora Doutora do Departamento de Epidemiologia da Faculdade de Saúde Pública da USP. Tem experiência na área de Epidemiologia das Doenças e Agravos Não Transmissíveis, com ênfase em Epidemiologia do Câncer, atuando principalmente em estudos descritivos e pesquisas sobre fatores de risco e fatores prognósticos.

<http://lattes.cnpq.br/5345064895953228>

Alessandro Gonçalves Campolina

Possui graduação em medicina pela Universidade Federal de São Paulo (2000), Residência Médica em Clínica Médica e Geriatria (2004), Mestrado em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo (2007), Título de Especialista em Geriatria pela Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia (2009), Doutorado em Ciências pela Universidade de São Paulo (2012), Título de Especialista em Nutrologia pela Associação Brasileira de Nutrologia (2013), Pós-Doutorado em Medicina Preventiva pela Universidade de São Paulo (2020). Atua como médico, professor e pesquisador. Atualmente é coordenador do Laboratório de Avaliação de Tecnologias em Saúde no Centro de Investigação Translacional em Oncologia do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo / Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Desenvolve projetos e pesquisas nas áreas de avaliação de tecnologias em saúde, qualidade de vida, longevidade, doenças crônicas e câncer.

<http://lattes.cnpq.br/0176903783847881>

Toshio Chiba

Possui graduação em Faculdade de Medicina pela Universidade de São Paulo (1988), doutorado em Patologia pela Universidade de São Paulo (2001) e residência-médica pela Sociedade Brasileira de Geriatria e Gerontologia (1992). Atualmente é Médico do Instituto de Câncer do Estado de São Paulo - "Octávio Frias de Oliveira". Tem experiência na área de Medicina, com ênfase em Clínica Médica. Atuando principalmente nos seguintes temas: Qualidade de vida, Avaliação, Serviços de assistência domiciliar, Oxigenoterapia, Cuidados domiciliares de Saúde.

<http://lattes.cnpq.br/2480450737899686>

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

ONCOLOGIA CLÍNICA

Gilberto de Castro Junior

Médico do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) - Faculdade de Medicina da USP, atuando no Serviço de Oncologia Clínica, onde chefia a área de Oncologia Torácica e Câncer de Cabeça e Pescoço. Título de Livre-Docente (2015) pela Disciplina de Oncologia, área de Oncologia Clínica - Departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da USP. Professor da Disciplina de Oncologia - Departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da USP. Ex-fellow da Clinique d'Oncologie Médicale - Institut Jules Bordet - Centre des Tumeurs de Université Libre de Bruxelles, Bruxelas - Bélgica. Especialista em Cancerologia Clínica e em Clínica Médica pela AMB. Áreas de interesse: Câncer de Cabeça e Pescoço, Câncer do Pulmão, Terapias de Alvo Molecular, Ensaios Clínicos, Fatores Preditivos de Resposta à Quimioterapia, Qualidade de Vida.

<http://lattes.cnpq.br/9380674942905578>

CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO

Alexandre Bezerra dos Santos

Graduado em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (1996). Atualmente é membro do serviço de cabeça e pescoço do ICESSP - Instituto de Cancer do Estado de São Paulo. Doutorado em Ciências pela Faculdade de Medicina da USP

<http://lattes.cnpq.br/2103393224220645>

Raquel Ajub Moyses

Possui graduação em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (2001). Especialista em Cirurgia de Cabeça e Pescoço pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pela Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Doutorado pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (2011). Master in Public Health - Clinical Effectiveness - Harvard School of Public Health (2017). Experiência em Cirurgia de Cabeça e Pescoço, nas áreas de câncer de tireoide, câncer de cabeça e pescoço, tumores de glândulas salivares, hiperparatireoidismo e doenças congênitas da cabeça e pescoço.

<http://lattes.cnpq.br/5511357084047275>

Leandro Luongo de Matos

É médico Cirurgião de Cabeça e Pescoço e Professor Livre Docente pelo Departamento de Cirurgia (Disciplina de Cirurgia de Cabeça e Pescoço) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. É também mestre em Ciências pela Faculdade de Medicina do ABC, pelo pioneiro programa MD-MSc, aprovado pela CAPES, que permite a estudantes de Medicina cursarem as disciplinas do programa de pós-graduação durante os dois últimos anos de faculdade e defenderem suas dissertações de mestrado assim que formados, e Doutor em Ciência pelo Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

Federal de São Paulo (UNIFESP - Nota 7 CAPES). Possui ainda Pós-Doutorado pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e atua como Médico Assistente no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Professor Colaborador nas áreas de Ensino de Graduação, Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo ministrando aulas de Cirurgia de Cabeça e Pescoço aos estudantes do terceiro e quarto anos, Docente no Programa de Pós-Graduação em Anestesiologia, Ciências Cirúrgicas e Medicina Perioperatória e Pesquisador do Laboratório de Investigação Médica (LIM) 28. É também Professor Associado (Disciplina de Clínica Cirúrgica) da Faculdade Israelita de Ciências da Saúde Albert Einstein. Atua ainda como Cirurgião de Cabeça e Pescoço em hospitais da região do ABC e em São Paulo. Está envolvido em três linhas de pesquisa principais: Biologia Molecular, Cirurgia e Epidemiologia/Bioestatística, com ênfase em neoplasias malignas e doenças da cabeça e pescoço, tendo 128 trabalhos publicados na íntegra em periódicos científicos nacionais e internacionais, 119 resumos em anais de eventos e 235 comunicações em eventos científicos.

<http://lattes.cnpq.br/6671537492263094>

BIOLOGIA MOLECULAR

Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira

Graduou-se em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP); realizou mestrado e doutorado em Oncologia pela FMUSP e obteve a livre docência pela FMUSP. É Professora Associada do Departamento de Radiologia e Oncologia da FMUSP e no momento exerce a chefia do Departamento de Radiologia e Oncologia. Tem experiência na área de Medicina, com ênfase em Cancerologia, atuando principalmente nos temas: câncer de mama, câncer em adultos jovens, ação hormonal, quimioterapia, vitamina D, expressão gênica, mutações germinativas e oncogênica.

<http://lattes.cnpq.br/0149726906206800>

Fátima Solange Pasini

Possui graduação em Bacharel em Ciências Farmacêuticas pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas Oswaldo Cruz (1989), mestrado em Biotecnologia pela Universidade de São Paulo (1998) e doutorado em Biotecnologia pela Universidade de São Paulo (2005). Atualmente é especialista em laboratório da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Bioquímica, com ênfase em Biologia Molecular, atuando principalmente nos seguintes temas: biologia molecular aplicada a busca de marcadores moleculares de valor prognóstico e preditivo de resposta ao tratamento com radioterapia/quimioterapia; lymph node metastasis, oral squamous cell carcinoma, tgff β 1 e expressão gênica (RNA mensageiro e microRNA).

<http://lattes.cnpq.br/4374229394793781>

Maria Lucia Hirata Katayama

Possui doutorado em Ciências Biológicas (Biologia Molecular) pela Universidade Federal de São Paulo (2002). Atualmente é biólogo da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Medicina,

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

com ênfase em Cancerologia, atuando principalmente no seguinte tema: aplicação de métodos de biologia molecular para detecção da doença e definição de melhor tratamento em câncer de mama. Os principais métodos empregados são: reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR), cDNA microarray e análise de bioinformática, sequenciamento gênico, cultura de linhagens celulares e cultura organotípica.

<http://lattes.cnpq.br/3840003734401045>

Mateus Camargo Barros-Filho

Possui graduação (Licenciatura e Bacharelado) em Ciências Biológicas pela Universidade Presbiteriana Mackenzie (2004 e 2005, respectivamente), mestrado em Ciências na área de Oncologia pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (2009) e doutorado em Ciências na área de Oncologia pela Fundação Antonio Prudente /AC Camargo Cancer Center (2014). Realizou pós-doutorado pela Fundação Antonio Prudente /AC Camargo Cancer Center (2015-2019) e estágio de 1 ano (2018-2019) na University of British Columbia/British Columbia Cancer Research Agency (bolsa FAPESP - BEPE) supervisionado pelo Dr. Wam L. Lam. Tem experiência na área de Genética e Biologia Molecular, com ênfase em Oncologia. Atualmente é pesquisador do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (LIM-28).

<http://lattes.cnpq.br/6975946089084616>

Fernanda de Toledo Gonçalves

Doutora em Ciências pelo programa de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) e atualmente é pesquisadora científica do Laboratório de Imunohematologia e Hematologia Forense (LIM40) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Tem experiência na área de Genética, com ênfase em Genética Humana e Médica e Ciências Forenses, atuando principalmente nos seguintes temas: Melanoma Maligno Cutâneo, Polimorfismos de genes de Metabolização de Xenobióticos, Polimorfismos de Genes de Reparo do DNA, Receptor de Vitamina D, STRs, Teste de Paternidade, Sequenciamento e Epidemiologia Molecular.

<http://lattes.cnpq.br/2634213771704885>

Pedro Adolpho de Menezes Pacheco Serio

Possui graduação em Biomedicina pela Universidade Paulista (2016) e capacitação técnica em Química pelo SENAI-SP. Possui experiência nas áreas de Biologia do Desenvolvimento, Celular e Molecular e Oncogenômica. Realizou aprimoramento em Biologia Molecular em Câncer no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo - HC / FMUSP e atualmente, realiza pós-graduação na área de Oncogenômica, no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo - HC / FMUSP.

<http://lattes.cnpq.br/3350609091893053>

ESTOMATOLOGIA

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

Thaís Bianca Brandão

Graduada na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (USP), Mestre em Prótese Buco-Maxilo-Facial pela Faculdade de Odontologia da USP e Doutora em Estomatopatologia pela Universidade Estadual de Campinas. Coordenadora do Serviço de Odontologia Oncológica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo e Professora Colaboradora da Disciplina de Oncologia Clínica da Faculdade de Medicina da USP. Tem experiência na área de Odontologia, com ênfase em Oncologia, atuando principalmente nos seguintes temas: neoplasias na região de cabeça e pescoço, odontologia oncológica e reabilitação buco-maxilo-facial.

<http://lattes.cnpq.br/0044015217952435>

Ana Carolina Prado-Ribeiro

Cirurgiã-dentista, Estomatologista e Pesquisadora do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP) Octavio Frias de Oliveira;. Realizou o curso de Graduação (2005) e Mestrado em Estomatologia (2008) pela Faculdade de Odontologia de Araçatuba (UNESP). Doutorado em Estomatopatologia, área de concentração em Patologia (2011) pela Faculdade de Odontologia de Piracicaba - (UNICAMP) com período de estágio no exterior no Centro Clínico de Cabeça e Pescoço da Guatemala, Guatemala e no Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Universidade de Sheffield, Inglaterra. Seus interesses científicos se concentram em temas relacionados ao câncer de cabeça e pescoço, às complicações odontológicas do tratamento oncológico, ao suporte odontológico à pacientes com câncer e ao estudo das lesões ósseas do complexo maxilo-mandibular.

<http://lattes.cnpq.br/9493624333917492>

ANATOMIA PATOLÓGICA

Evandro Sobroza de Mello

Médico Patologista. Professor Doutor do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP (disciplinas de patologia gastrointestinal e patologia das moléstias infecciosas). Vice-responsável pelo Laboratório de Investigação Médica 14 (LIM-14). Coordenador do Laboratório de Patologia do Instituto do Câncer do Estado Pesquisador associado de São Paulo (ICESP/FMUSP). Sócio-Diretor e Diretor Médico Executivo do Laboratório CICAP. Tem experiência em patologia cirúrgica, com ênfase em patologia hepática e gastrointestinal, patologia de cabeça e pescoço e patologia pulmonar.

<http://lattes.cnpq.br/6381142231005110>

Ana Maria da Cunha Mercante

Possui graduação em Medicina pela Universidade Federal de Uberlândia (1993), residência médica em patologia pelo Hospital das Clínicas da FMUSP-RP (1997), mestrado em Ciências da saúde pela Fundação Antônio Prudente (2006) e título de especialista em patologia conferido pela Associação Médica Brasileira (2008). Atualmente é médica patologista do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Heliópolis, onde participa como pesquisadora do grupo de pesquisa do genoma de câncer de cabeça e pescoço

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

(GENCAPO) desde de 2006. Concomitante é médica assistente do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo Octavio Frias de Oliveira (ICESP) onde participa do "Tumour Board" da Oncologia na especialidade de Cirurgia de Cabeça e Pescoço desde 2016. Médica do núcleo de patologia de São Paulo da Rede D'OR São Luiz desde fevereiro de 2019. Tem experiência em Medicina na área de Anatomia Patológica geral, com ênfase em Patologias de Cabeça e Pescoço e do Sistema Endócrino (tireoide). Atuando no ensino de médicos residentes na área de Anatomia Patológica durante toda sua carreira. Atuando no desenvolvimento de pesquisas nos seguintes temas: Anatomia patológica, imuno-histoquímica e expressão de proteínas associadas ao carcinoma epidermóide de vias aerodigestivas.

<http://lattes.cnpq.br/3282558304355836>

IMUNOLOGIA

Ana Paula Lepique

Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade de São Paulo (1992), mestrado em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade de São Paulo (1996) e doutorado em Ciências Biológicas (Bioquímica) pela Universidade de São Paulo (2000). Atualmente é Professora Associada no Departamento de Imunologia, no Instituto de Ciências Biomédicas, USP. Tem experiência na área de Imunologia tumoral, buscando compreender como sinais disparados por tumores influenciam a apresentação de antígenos e consequente a resposta adaptativa anti-tumoral.

<http://lattes.cnpq.br/0808439926941946>

PROTEÔMICA

Adriana Franco Paes Leme

Pesquisadora do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), no Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) desde 2009. Atua na área de Proteômica e Espectrometria de Massas aplicadas ao estudo de sistemas biológicos, com ênfase em câncer oral e metaloproteinases de membrana (ADAMs). Possui graduação (1999), mestrado (2002) e doutorado (2005) na UNICAMP. Pós-doutorado no Instituto Butantan (2006-2009) e na Universidade de Virginia (2007 e 2009).

<http://lattes.cnpq.br/5061330474201297>

BIOINFORMÁTICA

Fabio Albuquerque Marchi

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista UNESP - Botucatu, doutorado em Bioinformática pelo Instituto de Matemática e Estatística (IME) - USP e pós-doutorado pelo A.C.Camargo Cancer Center. Atualmente é pesquisador no Centro Internacional de Pesquisa (CIPE), A.C.Camargo Cancer Center, membro do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e docente no programa de Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente (FAP), A.C.Camargo Cancer Center. Atua em pesquisas nas áreas de biologia de sistemas e bioinformática com a investigação de mecanismos de integração multidimensional de dados, inferência de redes complexas e modelagem computacional da sinalização celular no câncer.

	Descrição do Projeto - PRONON Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	
---	--	---

<http://lattes.cnpq.br/2731097839921559>

METAGENÔMICA

Emmanuel Dias-Neto

Possui graduação em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais (1989), Mestrado em Biologia Celular e Molecular pela Fundação Oswaldo Cruz (1994), Doutorado em Bioquímica e Imunologia pela Universidade Federal de Minas Gerais (1997) e Pós-Doutorado em Genômica do Câncer pelo Ludwig Institute for Cancer Research (1999). Foi pesquisador sênior do Instituto Ludwig de Pesquisas sobre o Câncer (até 2002), vice-diretor do Laboratório de Neurociências (LIM-27) no Instituto de Psiquiatria da Faculdade de Medicina da USP (até 2006) e Professor Visitante na University of Texas, MD Anderson Cancer Center (até 2009). Atualmente é cientista adjunto no Centro Internacional de Pesquisas do AC Camargo Cancer Center, onde coordena o Laboratório de Genômica Médica. Tem experiência na área de Biologia Molecular e Genômica.

<http://lattes.cnpq.br/0278717765065500>

BIÓPSIA LÍQUIDA

Simone Maistro

Possui graduação em Biologia pela Universidade Presbiteriana Mackenzie (1993), mestrado em Farmacologia pela Universidade Estadual de Campinas (1999) e doutorado em Biotecnologia pela Universidade de São Paulo (2005). Tem experiência na área de Bioquímica, com ênfase em Biologia Molecular. Atuando principalmente nos seguintes temas: câncer hereditário (determinação de alterações nos genes BRCA1 e BRCA2), marcadores gênicos de diferenciação, proliferação e prognóstico de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

<http://lattes.cnpq.br/2688563538360351>

Amanda Cristina Sisti

Cursando odontologia na Universidade de São Paulo. Membro da diretoria da Liga Acadêmica de Emergências Médicas em Odontologia da Universidade de São Paulo. Atualmente aluna de iniciação científica na área de células-tronco e representante discente Comissão de Cooperação Acadêmica Nacional e Internacional FOUSP.

<http://lattes.cnpq.br/3765380454791565>

MODELOS FUNCIONAIS

Rosimeire Aparecida Roela

Bacharel em Química pela Universidade Mackenzie, Mestre em Biotecnologia pela Universidade de São Paulo e Doutora em Ciências (área de concentração: Oncologia) pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Apresenta experiência em biologia molecular e celular, com foco em Oncologia.

<http://lattes.cnpq.br/9037588705718569>

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

Isabela Cristina de Souza

Bacharel em Biomedicina pela Universidade Nove de Julho (2016) com habilitação em Toxicologia. Especialização em Marcadores Moleculares em Tumores Sólidos pelo Programa de Aprimoramento Profissional do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, realizado no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (2018). Atualmente cursando Doutorado Direto em Oncologia pela Faculdade de Medicina da USP, no Instituto do Câncer do Estado de São Paulo.

<http://lattes.cnpq.br/5895162014236396>

Alan Roger dos Santos Silva

Graduação em Odontologia (UNESP); Especialista em Estomatologia (CFO); Especialista em Patologia Oral (CFO); Mestrado em Estomatologia (UNICAMP); Doutorado em Patologia (UNICAMP/University of Sheffield, Inglaterra) e Livre-Docente (UNICAMP). Interesse em pesquisa no campo do tratamento odontológico para pacientes oncológicos. Cirurgião-Dentista do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo-FMUSP (2010-2011); Professor do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba [UNICAMP (Área de Semiologia), 2011-atual]; Membro eleito da Congregação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (2013-2014); Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba [CAPES 6 (2012-2016)]; Membro eleito do Conselho Universitário da UNICAMP (2017-2019) e Membro do Conselho Superior do Hospital das Clínicas da UNICAMP (2017-2019). Assessor ad hoc FAPESP, CAPES e CNPq. Membro do Corpo Editorial do periódico norte-americano Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology e membro do Latin American Cooperative Oncology Group (LACOG, Head and Neck Group). Diretor Secretário da Sociedade Brasileira de Estomatologia e Patologia Oral (SOBEP) no triênio 2018-2021 e Conselheiro da América Latina e Caribe junto à International Association of Oral Pathologists (IAOP).

<http://lattes.cnpq.br/1317718068735423>

ESTATÍSTICA

Rossana Verónica Mendoza López

Possui Graduação em Estatística e Informática pela Universidad Nacional Agraria La Molina de Peru (1995), Mestrado (2007) e Doutorado (2011) em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo. Atuando principalmente nos seguintes temas: epidemiologia do câncer, métodos epidemiológicos, tumores de cabeça e pescoço, papilomavírus humano (HPV) e bioestatística. Atualmente Pesquisadora Plena no Centro de Investigação Translacional em Oncologia (CTO) do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), e Professora Convidada da Ludwig Maximilians Universitat de Munique (Alemanha) no Programa de Pós-graduação em Saúde Ocupacional.

<http://lattes.cnpq.br/4081991859950994>

EQUIPE DE APOIO

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

incluindo na presente proposta ampliação ou construção de imóveis. Cabe notar ainda que não solicitamos recursos para nenhum tipo de reforma.

ANEXO IV - Modelo de Declaração de Responsabilidade

ATESTADO DE RESPONSABILIDADE TÉCNICA
Eu, Luiz Paulo Kowalski, CPF Nº 320.208.809-20, sob Portaria nº 571 ATESTO, para fins de apresentação de projetos no âmbito do PRONON OU PRONAS/PCD do Ministério da Saúde, que a Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – Fundação Faculdade de Medicina, inscrito(a) no CNPJ sob o nº 56.577.059/0006-06, situado(a) à Avenida Dr. Arnaldo 251, Cerqueira César, São Paulo, com CEP 1246-000, apresenta capacidade técnica e operacional para o desenvolvimento do Projeto "Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento", em atendimento ao disposto no Art. XX, da Portaria GM/MS nº XXX de XX de XXX de 2014, considerando as experiências na execução de projeto(s)/ação(es) na(s) área(s) XXXXXX, conforme DOCUMENTO ANEXO.

ANEXO V - Modelo de Declaração de Capacidade Técnico-operativa

DECLARAÇÃO DE CAPACIDADE OPERACIONAL
Declaramos, para os devidos fins que a instituição Instituto do Câncer do Estado de São Paulo – Fundação Faculdade de Medicina, credenciada pela Portaria XXX de xx de xxxxx de 201x, inscrita no CNPJ sob o Nº 56.577.059/0006-06 estabelecida na Avenida Dr. Arnaldo 251, Cerqueira César, São Paulo, com CEP 1246-000, possui capacidade técnica e operacional necessárias para a realização do projeto intitulado "Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento" apresentado para execução no âmbito do PRONON ou PRONAS/PCD.
Local e Data.
[Nome do Representante Legal] Instituição XXXXXX
* Enviar em papel timbrado da instituição

ANEXO –

Declaração de comprometimento a submeter o projeto à apreciação dos Comitês de Ética, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), quando for o caso, e de somente iniciar a execução do projeto após enviar ao Ministério da Saúde comprovante(s) de ter obtido as necessárias autorizações éticas e sanitárias para realizar o estudo.

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

ANEXO VI – Planilha Orçamentária

CUSTOS DIRETOS DO PROJETO			
NATUREZA	DESCRIÇÃO	PREVISÃO DE DESPESAS (R\$)	% SOBRE O VALOR TOTAL DO PROJETO
CUSTEIO	Recursos Humanos de apoio	R\$ 763.588,79	14%
	Bolsista	R\$ 346.594,80	7%
	Diárias	R\$ 4.800,00	0%
	Serviço de terceiros - Pessoa Jurídica	R\$ 88.064,00	2%
	Material de Consumo	R\$ 3.237.655,54	61%
CUSTOS INDIRETOS DO PROJETO			
NATUREZA	DESCRIÇÃO	PREVISÃO DE DESPESAS (R\$)	% SOBRE O VALOR TOTAL DO PROJETO
CAPITAL	Equipamentos e Material Permanente	R\$ 603.494,58	11%
	Equipamentos de Informática	R\$ 280.869,50	5%
TOTAL		R\$ 5.325.067,21	100%

EQUIPAMENTOS

SCIGENE TRUTEMP	R\$	14.328,00
INFINIUM MIDI HEATBLOCK INSERT		
HEATBLOCK INSERT FOR THE SCIGENE HYBEX	R\$	1.140,00
QX200™ DROPLET GENERATOR	R\$	60.575,36
QX200™ DROPLET READER	R\$	426.385,86
THE C1000 TOUCH THERMAL CYCLER CHASSIS	R\$	25.334,00
THE 96-DEEP WELL REACTION MODULE	R\$	17.202,52
THE PX1 PCR PLATE SEALER	R\$	22.023,39
LAPTOP COMPUTER FOR DDPCR SYSTEM	R\$	18.551,45
NOBREAK	R\$	17.954,00

	Descrição do Projeto - PRONON	
	Estudo epidemiológico, molecular e translacional em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: aplicações no diagnóstico e tratamento	

COMPUTADOR (DESKTOP-AVANÇADO) - CÓDIGO DO ITEM/SIGEM: 10894	R\$	40.430,00
MICROSOFT OFFICE HOME AND BUSINESS 2019	R\$	1.927,50
STORAGE 40TB	R\$	238.512,00

ANEXO VI

DEMONSTRATIVO DA PROJEÇÃO DAS DESPESAS - PRONON	
Título do Projeto:	ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, MOLECULAR E TRANSLACIONAL EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO: APLICAÇÕES NO DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO
Valor total do projeto:	R\$ 5.325.067,21

CUSTOS DIRETOS DO PROJETO			
NATUREZA	DESCRIÇÃO	PREVISÃO DE DESPESAS (R\$)	% SOBRE O VALOR TOTAL DO PROJETO
CUSTEIO	Recursos Humanos de apoio	R\$ 763.588,79	14%
	Bolsista	R\$ 346.594,80	7%
	Diárias	R\$ 4.800,00	0%
	Serviço de terceiros - Pessoa Jurídica	R\$ 88.064,00	2%
	Material de Consumo	R\$ 3.237.655,54	61%

CUSTOS INDIRETOS DO PROJETO			
NATUREZA	DESCRIÇÃO	PREVISÃO DE DESPESAS (R\$)	% SOBRE O VALOR TOTAL DO PROJETO
CAPITAL	Equipamentos e Material Permanente	R\$ 603.494,58	11%
	Equipamentos de Informática	R\$ 280.869,50	5%

TOTAL		R\$ 5.325.067,21	100%
-------	--	------------------	------

EQUIPAMENTOS

SCIGENE TRUTEMP	R\$ 14.328,00
INFINIUM MIDI HEATBLOCK INSERT HEATBLOCK	R\$ 1.140,00
INSERT FOR THE SCIGENE HYBEX	
QX200™ DROPLET GENERATOR	R\$ 60.575,36
QX200™ DROPLET READER	R\$ 426.385,86
THE C1000 TOUCH THERMAL CYCLER CHASSIS	R\$ 25.334,00
THE 96-DEEP WELL REACTION MODULE	R\$ 17.202,52
THE PX1 PCR PLATE SEALER	R\$ 22.023,39
LAPTOP COMPUTER FOR DDPCR SYSTEM	R\$ 18.551,45
NOBREAK	R\$ 17.954,00
COMPUTADOR (DESKTOP-AVANÇADO) - CÓDIGO DO ITEM/SIGEM: 10894	R\$ 40.430,00
MICROSOFT OFFICE HOME AND BUSINESS 2019	R\$ 1.927,50
STORAGE 40TB	R\$ 238.512,00