



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

GABRIELA SOUZA RODRIGUES DE QUEIROZ

INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS EM MODULADORES DA
SEROTONINA NO RISCO, AGRESSIVIDADE E PROGNÓSTICO DE PACIENTES
COM CÂNCER DE OROFARINGE

CAMPINAS

2023

GABRIELA SOUZA RODRIGUES DE QUEIROZ

INFLUÊNCIA DE VARIANTES GENÉTICAS EM MODULADORES DA
SEROTONINA NO RISCO, AGRESSIVIDADE E PROGNÓSTICO DE PACIENTES
COM CÂNCER DE OROFARINGE

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos
exigidos para a obtenção do título de Mestra em Ciências, na área de
Clínica Médica.

ORIENTADOR: GUSTAVO JACOB LOURENÇO
COORIENTADORA: CARMEN SILVIA PASSOS LIMA

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA
GABRIELA SOUZA RODRIGUES DE QUEIROZ, E
ORIENTADA PELO PROF. DR. GUSTAVO JACOB LOURENÇO.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Q32i Queiroz, Gabriela Souza Rodrigues, 1996-
Influência de variantes genéticas em moduladores da serotonina no risco, agressividade e prognóstico de pacientes com câncer de orofaringe / Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Gustavo Jacob Lourenço.
Coorientador: Carmen Silvia Passos Lima.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias orofaríngeas. 2. Serotonina. 3. Variação genética. 4. Risco. 5. Agressividade. I. Lourenço, Gustavo Jacob, 1978-. II. Lima, Carmen Silvia Passos, 1957-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Influence of genetic variants in serotonin modulators on the risk, aggressivity and prognosis of patients with oropharynxal cancer

Palavras-chave em inglês:

Oropharyngeal neoplasms

Serotonin

Genetic variation

Risk

Aggressiveness

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Gustavo Jacob Lorenço

Claúdia Vianna Maurer Morelli

Manoela Marques Ortega

Data de defesa: 23-06-2023

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

GABRIELA SOUZA RODRIGUES DE QUEIROZ

ORIENTADOR: GUSTAVO JACOB LOURENÇO

COORIENTADORA: CARMEN SILVIA PASSOS LIMA

MEMBROS TITULARES:

1. PROF. DR. GUSTAVO JACOB LOURENÇO

2. PROFA. DRA. CLÁUDIA VIANNA MAURER MORELLI

3. PROFA. DRA. MANOELA MARQUES ORTEGA

Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da FCM.

Data de Defesa: 23/06/2023

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares por todo amor e apoio.
Aos pacientes e doadores de sangue que acreditaram e tornaram
possível essa pesquisa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo J. Lourenço por toda paciência, empenho e ensinamentos que me fizeram amadurecer como pesquisadora. Por ser exemplo de honestidade, competência e a sempre me motivar a produzir uma pesquisa com qualidade. Obrigada por me guiar nesse trabalho, por apoiar minhas decisões e me encorajar a continuar acreditando em nossos objetivos.

À minha coorientadora, Prof. Dra. Carmen Silvia Passos Lima por me acolher de forma prestativa e generosa, estando sempre disposta a compartilhar seus conhecimentos e experiências que me enriqueceram grandemente.

Aos pacientes que enfrentam dia a dia a luta contra o câncer e que, de forma tão humilde, compartilharam comigo sua caminhada. Aos doadores de sangue que acreditam na importância da pesquisa científica e tornaram tudo isso possível.

Ao Laboratório de Genética do Câncer que ao longo desses anos foi o local onde busquei suporte e apoio de pessoas queridas. Em especial, gostaria de agradecer à Juliana Carron que desde o início do meu estágio esteve disposta a me ajudar, com muita paciência, talento e dedicação. E aos demais parceiros de trabalho que direta ou indiretamente me auxiliaram nesse trabalho e na vida acadêmica.

Aos meus professores de graduação, Prof. Fernando R. C. Bomfim e Profa. Dra. Camila Andrea de Oliveira por me apresentarem a vida acadêmica e auxiliaram nos meus primeiros passos com a iniciação científica e a biologia molecular. Aos meus amigos, que compartilharam essa trajetória comigo.

Aos meus amigos, em especial Bianca, Marina e Tuanne, que estiveram comigo durante praticamente toda vida, e mesmo distantes vibraram minhas conquistas e me deram o suporte necessário para enfrentar todos os desafios. Ao meu namorado Alexandre, que esteve ao meu lado ao longo de todos esses anos, me dando suporte e me fazendo acreditar que era possível chegar até aqui.

À minha família, meus pais, irmãos e avós que jamais mediram esforços para que eu chegasse até aqui. Agradeço constantemente por sempre incentivarem meus sonhos, pela paciência e força nos momentos difíceis. Vocês foram essenciais para que eu pudesse me tornar quem eu sou hoje.

Agradeço à Deus por me guiar em toda minha trajetória.

EPÍGRAFE

“Mas na profissão, além de amar, tem de saber.

E o saber leva tempo para crescer.”

Rubem Alves

RESUMO

Além do seu papel na regulação das emoções, a serotonina (5-HT) foi associada com a proliferação de células tumorais. A 5-HT é sintetizada pelas enzimas da família triptofano-hidroxilase (TPH), encontrada em duas isoformas: *TPH1* e *TPH2*. Após a sua produção, a 5-HT é captada por receptores específicos, incluindo o *HTR1D*. Variações genéticas de nucleotídeo único (SNVs) na região flanqueadora dos genes *TPH1* (rs623580, T>A), *TPH2* (rs4570625, G>T) e *HTR1D* (rs674386, G>A) podem modular a síntese da 5-HT e influenciar o desenvolvimento de tumores. No entanto, não foram descritos os efeitos dessas SNVs no câncer de orofaringe (COF). Assim, o objetivo desse estudo foi verificar a influência dos genótipos das referidas SNVs no risco de ocorrência do COF, nas características do tumor e na sobrevida livre de evento (SLE) e sobrevida global (SG) dos pacientes com COF. O DNA de 251 pacientes com COF e 254 controles foi analisado por PCR em tempo real com ensaios TaqMan®. A atividade de transcrição do *TPH1* rs623580 e do *HTR1D* rs674386 foi estudada em linhagem celular de carcinoma de faringe humano (FaDu) por ensaio da luciferase. As diferenças entre os grupos foram calculadas por meio dos testes de Fisher ou X^2 , teste *t* e pela regressão logística múltipla. As análises de SLE e SG foram obtidas pelos métodos de Kaplan-Meier e regressão de Cox. As frequências do genótipo TT (44,8% vs. 34,6%; $p= 0,03$) e do alelo T (66,3% vs. 59,8%; $p= 0,02$) do *TPH1* foram maiores em pacientes do que em controles. Indivíduos com genótipo TT e com o alelo T estiveram sob risco cerca de 2,0 (intervalo de confiança (IC) 95%: 1,05-4,07) e 1,5 (IC 95%: 1,05-1,91) vezes maior de desenvolver o COF do que os outros. A frequência dos genótipos *HTR1D* GG ou GA foi mais comum em pacientes com tumores invasivos (91,5% vs. 80,6%, $p= 0,01$), ainda, pacientes com os referidos genótipos apresentaram pior SLE (taxa de risco (HR): 1,66, IC: 1,01-2,77, $p= 0,04$). As atividades de transcrição da luciferase foram 25,5% ($p= 0,03$) e 57,4% ($p= 0,008$) menores em células FaDu transfectadas com os plasmídeos com os alelos *TPH1* T e *HTR1D* G, quando comparados aos outros, respectivamente. Nossos dados sugerem que SNVs em genes moduladores da 5-HT podem influenciar o surgimento e a progressão do COF.

Palavras-chave: câncer de orofaringe, serotonina, variante genética, risco, agressividade, sobrevida

ABSTRACT

In addition to its role in regulating emotions, serotonin (5-HT) has been associated with the proliferation of tumor cells. 5-HT is synthesized by enzymes of the tryptophan hydroxylase (TPH) family, which are found in two isoforms: TPH1 and TPH2. After production, 5-HT is taken up by specific receptors, including HTR1D. Single nucleotide variations (SNVs) in the flanking region of the *TPH1* (rs623580, T>A), *TPH2* (rs4570625, G>T), and *HTR1D* (rs674386, G>A) genes can modulate 5-HT synthesis and influence tumor development. However, the effects of these SNVs on oropharyngeal cancer (OPC) have not been described. Therefore, the aim of this study was to investigate the influence of the genotypes of these SNVs on the risk of OPC, tumor characteristics, and event-free survival (EFS) and overall survival (OS) of patients with the disease. The DNA of 251 OPC patients and 254 controls was analyzed by real time PCR, using TaqMan[®] assays. The transcriptional activity of *TPH1* rs623580 and *HTR1D* rs674386 was studied in the human pharyngeal carcinoma cell line (FaDu) using luciferase assays. Differences between groups were calculated using Fisher's or chi-square tests, *t*-tests, and multiple logistic regression. EFS and OS analyses were obtained using the Kaplan-Meier and Cox regression methods. The frequencies of the TT genotype (44.8% vs. 34.6%, $p= 0.03$) and T allele (66.3% vs. 59.8%, $p= 0.02$) of *TPH1* were higher in patients than in controls. Individuals with the TT genotype and the T allele were at about 2.0 (95% confidence interval (CI): 1.05-4.07) and 1.5 (95% CI: 1.05-1.91) times higher risk of developing OPC than others. Among patients, the frequency of HTR1D GG or GA genotypes was more common in those with invasive tumors (91.5% vs. 80.6%, $p= 0.01$), and patients with these genotypes had worse EFS (hazard ratio (HR): 1.66, CI: 1.01-2.77, $p= 0.04$). Luciferase transcriptional activities were 25.5% ($p= 0.03$) and 57.4% ($p= 0.008$) lower in FaDu cells transfected with *TPH1* T and *HTR1D* G alleles-containing plasmids, respectively, compared to others. Our data suggest that SNVs in modulatory genes of 5-HT may influence the onset and progression of OPC.

Keywords: oropharyngeal cancer, serotonin, single nucleotide variant, risk, aggressiveness, survival

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Representação esquemática da localização de variantes de base única (SNVs) em diferentes locais de um gene	19
Figura 2	Síntese da serotonina (5-HT)	21
Figura 3	Receptor de serotonina (5-HT)	22
Figura 4	Seleção das SNVs	29
Figura 5	Representação esquemática das etapas da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real	32
Figura 6	Representação esquemática de um gráfico de pontos com as distribuições dos genótipos das SNVs de pacientes e controles	32
Figura 7	Representação esquemática do ensaio do gene repórter da luciferase	34
Figura 8	Representação esquemática do processo de transformação dos plasmídeos em em bactérias <i>E. coli</i> DH5 α	37

LISTA DE TABELAS

		Página
Tabela 1	Receptores de serotonina e mecanismos de ação	23
Tabela 2	Porcentam de expressão do receptor HTR1D em tumores	24
Tabela 3	Reagentes utilizados no ensaio de ligação dos insertos aos vetores	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μg	Micrograma
μL	Microlitros
μM	Micromolar
3'UTR	Região 3' não traduzida
5-HT	Serotonina
5-HTP	5-Hidroxitriptofano
5'UTR	Região 5' não traduzida
AC	Adenilato ciclase
AADC	Aminoácido aromático descarboxilase
AMPc	AMP cíclico
AVC	Acidente vascular cerebral
Ca^{2+}	Cálcio
CCE	Câncer de células escamosas
CP	Cabeça e pescoço
CT	<i>Cycle threshold</i>
CCP	Câncer de cabeça e pescoço
CCECP	Câncer de células escamosas de cabeça e pescoço
CCEOF	Câncer de células escamosas de orofaringe
CCPC	Câncer de pulmão de pequenas células
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
DAG	Diacilglicerol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Meio de cultura <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> DNA
GDP	Guanina de difosfato
GPCR	Proteína G
HPV	Papiloma vírus humano
HW	Hardy-weinberg
HTR	Receptor de serotonina
IC	Intervalo de confiança
IMC	Índice de massa corporal
IP_3	Inositol trifosfato 3
K^+	Potássio

KM	Kaplan-meier
MMP	Metaloproteínases
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
NaCl+	Cloreto de sódio
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
ng	Nanograma
nM	Nanomolar
OF	Orofaringe
P16	Proteína 16
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
QT	Quimioterapia
rpm	Rotação por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
RT	Radioterapia
rs	Número de referência da SNV
SERT	Transportador de serotonina
SFB	Soro fetal bovino
SG	Sobrevida global
SNC	Sistema nervoso central
SNV	Variantes de nucleotídeo único
SLE	Sobrevida livre de evento
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TPH	Triptofano hidroxilase
Trp	Triptofano
χ^2	Qui-quadrado

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	15
OBJETIVOS	27
MATERIAL E MÉTODOS	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS	41
ANEXOS	50
APÊNDICE	65

INTRODUÇÃO

Considerações iniciais

O câncer de cabeça e pescoço (CP) é definido por tumores que acometem o lábio, a cavidade oral, a cavidade nasal, os seios paranasais, a faringe e a laringe.¹ Em 2020 o câncer de CP foi o oitavo câncer mais incidente no mundo, permanecendo entre as principais causas de mortalidade e morbidade.² De acordo com a sua classificação histopatológica, a maioria desses tumores se caracterizam como carcinomas de células escamosas (CCE).³

O CCECP apresenta comportamento altamente agressivo podendo se disseminar facilmente para tecidos circundantes e causar metástase em órgãos distantes.⁴ Cerca de 550.000 novos casos do tumor são diagnosticados todo ano, sendo responsável por 450.000 mortes.⁵ No Brasil, estimou-se para o ano de 2020, 11,20 casos de CCE de cavidade oral e 6,47 casos de CCE de laringe por 100 mil homens.⁶ Já as taxas brutas de 4,21 e 0,94 casos dos respectivos tumores por 100 mil mulheres foram estimadas para o mesmo período.⁶

Dentre os tumores de CP, o CCE de faringe merece destaque devido ao seu comportamento agressivo e altas taxas de mortalidade.² A faringe é constituída anatomicamente pela orofaringe (OF), nasofaringe e hipofaringe, sendo que o CCEOF é considerado o mais agressivo entre eles.⁷ Em 2020 foi registrado 98.914 novos casos de CCEOF no mundo e cerca de 48.143 mortes (39.590 homens e 8.553 mulheres) representando quase 50% dos casos.² A OF é revestida por epitélio escamoso estratificado não queratinizado e subdividida em base da língua, palato mole, amígdalas e a parede posterior da faringe.⁸

Aspectos clínicos e tumorais

Os sintomas referidos pelos pacientes com CCEOF são geralmente relacionados ao trato aerodigestivo, incluindo o aumento de volume na região, a dificuldade na ingestão de alimentos, a dor e o sangramento local.⁸ A taxa de incidência aumenta com a idade, sendo que homens com idade entre 64 anos são mais propensos ao desenvolvimento do câncer do que mulheres.⁸ O CCECP é o quarto câncer mais comum entre os homens, sua incidência é duas a cinco vezes maior do que em mulheres devido às altas taxas de consumo de álcool e tabaco entre eles.⁸

O CCEOF pode ser classificado de acordo com o seu grau de diferenciação celular.⁹ As células tumorais bem diferenciadas (grau I) se assemelham mais com as células normais e tendem a crescer e se espalhar mais lentamente do que as células moderadamente diferenciadas (grau II), pouco diferenciadas (grau III) ou indiferenciadas.^{10,11}

O estabelecimento do planejamento terapêutico e do prognóstico do CCEOF baseiam-se em parâmetros clínicos, radiológicos e histopatológicos.^{12,13} A escolha do tratamento para pacientes com CCECP, incluindo CCEOF, depende do estágio da doença, tendo como objetivo a preservação das estruturas anatômicas e suas funções.¹⁴ Cerca de 40% dos pacientes apresentam tumor em estágios iniciais (I ou II) e geralmente são tratados apenas com cirurgia e/ou radioterapia (RT).^{15,16} No entanto, a maioria dos pacientes apresenta tumor em estágios avançados da doença (III ou IV), sendo preconizada a terapêutica multimodal com cirurgia, RT e quimioterapia (QT).¹⁶

A QT se baseia principalmente em fármacos à base de platina, os mais utilizados para o tratamento de CCECP são a cisplatina (CDDP) e a carboplatina.^{17,18} A CDDP se liga ao DNA da célula interrompendo seu ciclo celular e promovendo a apoptose.¹⁷ No entanto, a CDDP pode causar efeitos adversos como nefrotoxicidade, ototoxicidade, náuseas e vômitos.¹⁸ A fim de minimizar os efeitos colaterais causados pela CDDP, foi desenvolvido a carboplatina, um composto de segunda geração amplamente usado no tratamento de tumores sólidos.^{17,19}

Apesar dos avanços no tratamento, em muitos casos, os tumores são identificados tardiamente o que acaba comprometendo o tratamento e diminuindo o tempo de sobrevida após o diagnóstico.¹¹ A taxa de sobrevida global em cinco anos é de aproximadamente 30% para pacientes com CCEOF.¹⁷

Fatores predisponentes

Aspectos ambientais

Os principais fatores de risco já estabelecidos para o CCEOF são o etilismo, o tabagismo e a infecção pelo papiloma vírus humano (HPV).^{1,18}

A Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer estabeleceu que o consumo de álcool aumenta o risco para o desenvolvimento do CCECP em decorrência dos efeitos cancerígenos do etanol e do acetaldeído.¹⁹ O etanol é

oxidado em acetaldeído por micróbios da cavidade oral, aumentando gradativamente seu nível na mucosa oral.²⁰ O acetaldeído causa alterações estruturais e funcionais por interromper a síntese e reparo de DNA, resultando no aumento de espécies reativas de oxigênio e danos ao DNA de células epiteliais.^{20,21}

Indivíduos tabagistas têm aproximadamente dez vezes mais chance de desenvolver o CCECP.²² O tabaco contém cerca de 70 substâncias cancerígenas que são inaladas com outros 70 mil produtos químicos, incluindo a nicotina.²³ Esses produtos quando catalisados por enzimas como as do citocromo P-450 e glutational-S-transferase podem sofrer alterações e se tornar adutos de DNA capazes de alterar a sequência de DNA de genes supressores tumorais.²³

O HPV é um vírus de DNA fita dupla associado a cerca de 25% dos casos de CCECP e 70% dos casos de CCEOF, estabelecendo um fator prognóstico favorável para seus portadores.^{24,25} O HPV-16 é o tipo mais comum de HPV e pode ser usado como biomarcador para determinar o perfil clínico dos pacientes.²⁶ O genoma viral insere as oncoproteínas E6 e E7 nas células tumorais promovendo a degradação das proteínas supressoras tumorais como a p53 e o retinoblastoma, responsáveis por regular positivamente a homeostase de células normais, resultando, possivelmente, no surgimento do tumor.^{24,27}

Pacientes com o HPV possuem 18% menos risco de morte do que pacientes sem o HPV, isso ocorre, em parte, pois eles são geralmente mais jovens e com estilo de vida mais saudável.^{28,29,30} Além disso, a resposta ao tratamento do CCEOF em pacientes com HPV são mais favoráveis quando tratados isoladamente com radiação ou com quimioterapia concomitante, favorecendo em 80% de chance de atingir o índice de sobrevida global de cinco anos.^{31,32,33,34} No entanto, a prevalência do HPV em diversas regiões do Brasil, incluindo a região de Campinas, é baixa.³⁵

Aspectos genéticos

O CCECP é uma doença altamente agressiva e heterogênea causada por múltiplos eventos genéticos, incluindo mutações, deleções e inativação de genes supressores tumorais, além de mutações em oncogenes.³⁶

As mutações mais recorrentes no CCECP, incluindo o CCEOF, envolvem os genes supressores tumorais, que são genes com a capacidade de retardar a

divisão celular e reparar erros no DNA, como a proteína de tumor p53 (TP53) e o gene inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (CDKN2A).³⁶ Alterações no gene *TP53* são altamente prevalentes e associadas a progressão e mau prognóstico do câncer, inclusive no CCEOF.^{37,38} Da mesma forma, o *CDKN2A*, responsável pela regulação do ciclo celular, pode ter suas funções interrompidas por mutações ou deleções.³⁶

Uma mutação em um protooncogene pode levar ao surgimento de um oncogene, que são genes ligados ao surgimento do tumor, mutações no fosfoinosítideo-3-quinase (*PI3K*) são frequentemente observadas em casos de CCECP.³⁷ Oncogenes como o fator de crescimento de fibroblastos (*FGF*), o fator de crescimento epidérmico (*EGF*) e o fator de transcrição epitélio mesênquima (*MET*) são frequentemente alterados no CCEOF.^{36,38}

A predisposição genética individual para o CCECP pode ser caracterizada pela presença de variantes de base única (SNVs) no DNA.³⁷ As SNVs são caracterizadas pela substituição de uma única base nitrogenada em uma determinada região do genoma, ocorrendo com frequência superior a 1% da população.^{39,40} Essa variação é encontrada em uma média de aproximadamente um a cada trezentos pares de base, sendo um dos tipos mais comuns de variações genéticas no genoma humano.⁴⁰

As SNVs podem alterar mecanismos fisiológicos, como a proliferação e a progressão do ciclo celular, o reparo do DNA, a apoptose e podem predispor indivíduos saudáveis ao CCEOF.^{41,42} Seus efeitos na susceptibilidade e progressão do câncer estão relacionados à sua localização gênica.⁴¹ As SNVs podem ser encontradas na região promotora e codificadora de um gene, além de introns e regiões regulatórias, como regiões aceleradoras e silenciadoras.⁴¹

SNVs localizadas na região promotora e na região 5'- não traduzida (UTR) podem afetar a transcrição do gene e a estabilidade do RNAm, impactando a síntese de proteínas.⁴³ SNVs nos exons podem levar a mudanças nas sequências de aminoácidos e afetar a função da proteína. As SNVs nas regiões intrônicas podem influenciar o *splicing* alternativo do RNAm, resultando em diferentes variantes de proteínas. SNVs localizadas na região 3'- UTR podem afetar a regulação da expressão gênica e a estabilidade do RNAm, podendo levar a variações na quantidade de proteína produzida (**Figura 1**).^{43,44}

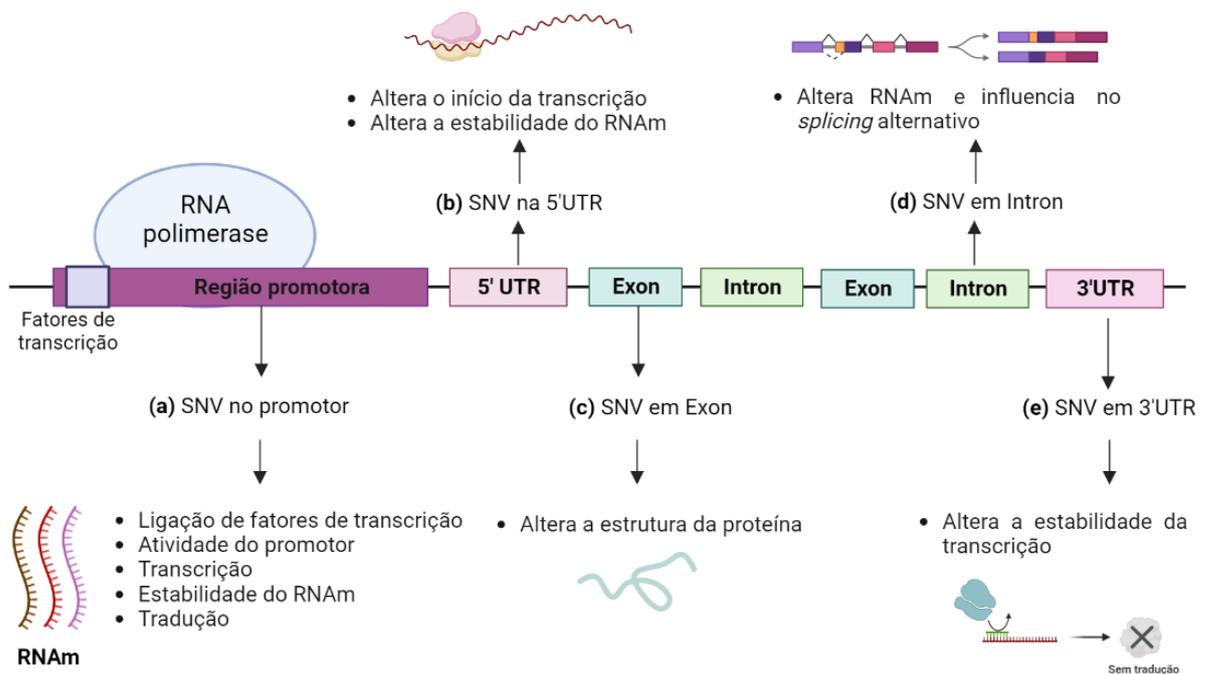


Figura 1. Representação esquemática da localização de variantes de base única (SNVs) em diferentes locais de um gene. (a) SNV na região promotora pode alterar a ligação de fatores de transcrição e influenciar a atividade do promotor, a transcrição, a estabilidade do RNA mensageiro (RNAm) e a tradução. (b) SNV na região 5'- não traduzida (UTR) pode alterar o início da transcrição e a estabilidade do RNAm. (c) SNV em exon pode alterar a estrutura da proteína. (d) SNV em intron pode alterar o RNAm e o mecanismo de splicing. (e) SNV na região 3'- UTR pode alterar a estabilidade do RNAm. Adaptado de Ruiz-Ballesteros et al. 2020⁴³

Dentre as regiões regulatórias de um gene, a região 5'- flanqueadora inclui uma região denominada aceleradora (*enhancer*), que é responsável por potencializar a transcrição de um gene por meio da ligação de *pioneer factors*, que formam um complexo capaz de estimular a ligação de fatores de transcrição.⁴⁴ A *enhancer* pode regular a transcrição gênica através da potencialização da atividade do promotor do gene.^{44,45}

As SNVs localizadas em regiões regulatórias podem afetar a ligação de fatores de transcrição, alterando a atividade do promotor e modulando a transcrição do gene, bem como a estabilidade do mRNA transcrito e sua tradução em proteína.^{46,47} Dessa forma, as SNVs podem modular a produção de proteínas, incluindo enzimas e hormônios, como a serotonina.^{41,48}

Serotonina

A serotonina, também conhecida como 5-hidroxitriptamina (5-HT), é um neurotransmissor que regula o sono, o humor e o apetite no sistema nervoso central (SNC).^{48,49} Sua síntese é mediada pela enzima triptofano hidroxilase (TPH), que existe em duas isoformas altamente semelhantes: TPH1, localizada nas células enterocromafins do intestino, e TPH2, encontrada nos neurônios do núcleo da rafe do SNC.⁴⁹⁻⁵¹ As células enterocromafins são responsáveis pela produção de 90-95% da 5-HT periférica,⁴⁸ enquanto o restante é sintetizado nas células do SNC, e em pequenas quantidades por ilhotas pancreáticas, glândulas mamárias e tecido adiposo.⁵⁰

O primeiro passo para a síntese da 5-HT é a captação do aminoácido L-triptofano por meio de alimentos ricos em proteínas, como frango, soja, cereais, atum, nozes e bananas.^{51,52} O triptofano pode circular de forma livre ou ligado à uma fração de albumina, podendo cruzar a barreira hematoencefálica para participar da síntese de 5-HT no SNC.⁵³ A produção de 5-HT se inicia quando o triptofano é convertido em 5-hidroxitriptofano (5-HTP) pela enzima triptofano hidroxilase (TPH1 ou TPH2). O 5-HTP é então metabolizado em 5-HT pela ação da enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC) (**Figura 2**).⁵³

Após sua síntese, a 5-HT vai para a corrente sanguínea e é captada pelas plaquetas através do transportador de 5-HT (SERT ou 5-HTT).^{53,54} O SERT é um transportador dependente de cloreto de sódio (NaCl), o processo de captação da 5-HT se inicia quando o NaCl se liga ao transportador SERT, seguido pela 5-HT, assim, devido ao potencial de ação da membrana, a 5-HT entra na célula enquanto um íon de potássio (K⁺) sai da célula.^{54,55} A exposição das plaquetas na superfície de tecidos vasculares e a sua interação com a matriz endotelial leva a sua ativação e degranulação, liberando a 5-HT.⁵⁶

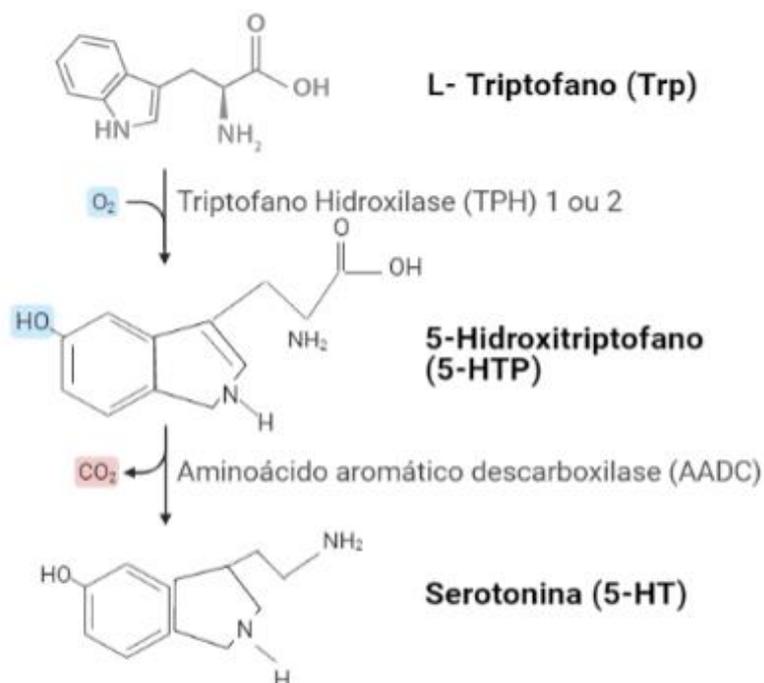


Figura 2. Síntese da serotonina (5-HT). O L-triptofano (Trp) é hidroxilado pela enzima triptofano hidroxilase (TPH) em 5-hidroxitriptofano (5-HTP). Em seguida, ocorre a descarboxilação do 5-HTP em 5-HT pela ação da enzima aminoácido aromático descarboxilase (AADC). Figura adaptada de Yabut et al. 2019⁵⁷

Receptores acoplados à membrana de células epiteliais captam a 5-HT que ativam o seu papel na regulação de processos fisiológicos.⁵⁸ Até o momento, foram descritas sete classes de receptores (5-HTR1 até 5-HTR7) e sete subclasses, totalizando 14 diferentes tipos de receptores.⁵⁹ Todos esses receptores pertencem à superfamília do receptor acoplado à proteína G, com exceção do 5-HTR3 que é acoplado a um canal de cátions (sódio, potássio e cálcio).^{59,60} A proteína G é formada pelas subunidades $G\alpha$, $G\beta$ e $G\gamma$.⁶⁰ As subunidades β e γ formam o complexo $\beta\gamma$ e, na ausência de estimulação dos receptores, a subunidade α se liga a guanina de difosfato (GDP) e ao complexo $\beta\gamma$, permanecendo inativada.⁶¹ Após a ligação da 5-HT no receptor, a subunidade α da proteína G promove a troca do GDP por trifosfato de guanosina.⁶¹ Nesse momento, a proteína G está ativada e a subunidade α se desassocia do complexo $\beta\gamma$, podendo exercer suas funções de sinalização celular (**Figura 3**).^{61,62}

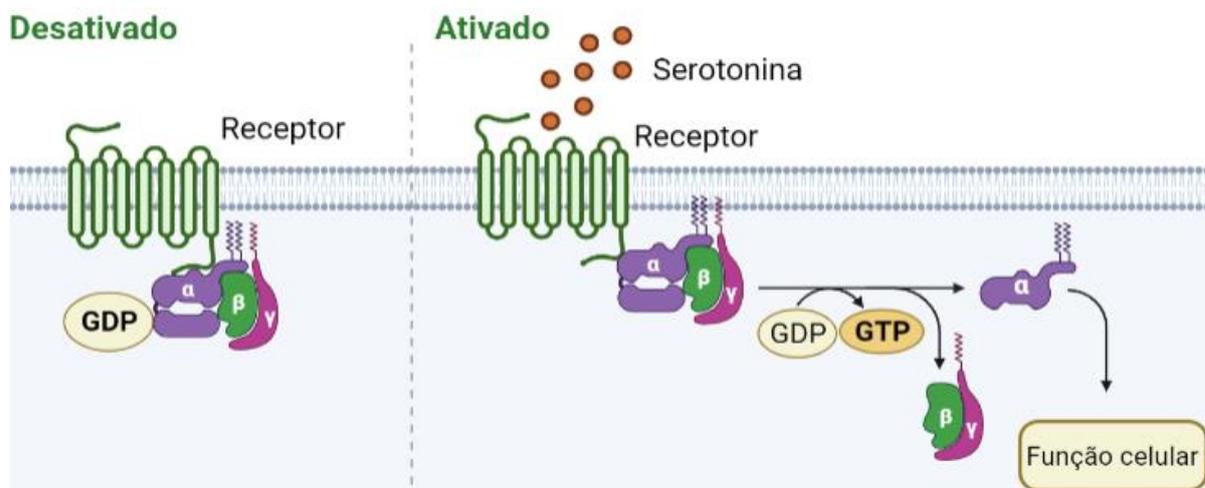


Figura 3. Receptor de serotonina (5-HT). O receptor de 5-HT é acoplado à proteína G na membrana celular. Na ausência de estímulo, a subunidade α se liga a guanina de difosfato (GDP) e ao complexo $\beta\gamma$ sinalizando que o receptor está desativado. Quando estimulado pela 5-HT, a subunidade α promove a troca de GDP por trifosfato de guanosina (GTP) dissociando a subunidade α do complexo $\beta\gamma$, ativando a função celular

A proteína G é classificada em três principais isoformas: Gs, Gq e Gi, de acordo com a sua estrutura (**Tabela 1**), podendo exercer diferentes funções celulares.⁶⁰ Os receptores 5-HTR1 e 5-HTR5 são acoplados à proteína G α_i e inibem a enzima adenilato ciclase (AC), enzima que catalisa a produção do segundo mensageiro, resultando na diminuição do monofosfato cíclico de adenosina (AMPC) e consequentemente da proteína quinase A (PKA).⁶³ Os receptores 5-HTR4, 5-HTR6 e 5-HTR7 acoplados às proteínas G α_s , ativam a AC catalisando a produção do AMPC.⁶³ O aumento de AMPC resulta na ativação da PKA. A PKA está envolvida em diversos processos como diferenciação, crescimento e desenvolvimento celular.⁶⁴

O receptor 5-HTR2 ligado a G α_q ativa a fosfolipase C (PLC).⁶⁵ A PLC modula o diacilglicerol (DAG) e o inositol trifosfato 3 (IP3).⁶⁵ O IP3 atua aumentando os íons de cálcio intracelular que por sua vez desencadeia respostas celulares como contração muscular e rearranjo de citoesqueleto.^{65,66} O DAG ativa a proteína quinase C (PKC) que atua na proliferação celular, permeabilidade vascular e transdução de sinais.^{65,66}

Tabela 1. Receptores de serotonina e mecanismos de ação

Receptor	Subtipo	Isoforma	Mecanismo	Ação
5-HTR1	1A, 1B,1D, 1E,1F	Gai/o	Adenilato ciclase	↓ AMPc
5-HTR2	2A, 2B, 2C	Gαq	Fosfolipase C	↑ IP ₃ /DAG
5-HTR3			Canais de cátion	Despolarização
5-HTR4		Gαs	Adenilato ciclase	↑ AMPc
5-HTR5	5A, 5B	Gai/o	Adenilato ciclase	↓ AMPc
5-HTR6		Gαs	Adenilato ciclase	↑ AMPc
5-HTR7		Gαs	Adenilato ciclase	↑ AMPc

AMPc: monofosfato de adenosina cíclico. IP₃: trifosfato de inositol. DAG: diacilglicerol

Os receptores de 5-HT são expressos de maneira específica em diversos tecidos através de uma variedade de células normais e tumorais.⁶⁷ Dessa forma, compreende-se que as múltiplas ações da 5-HT são determinadas pela característica do receptor a ela acoplada e pelas vias de sinalização intracelular de cada receptor.^{63,67}

Um estudo avaliou a expressão proteica do gene 5-HTR, responsável por codificar os receptores de 5-HT, através de uma meta-análise de dados do *The Human Protein Atlas* em diferentes tipos de cânceres.⁶⁸ Este repositório contém 216 amostras de tecidos tumorais com dados de imunistoquímica para diversas proteínas.⁶⁸ Os pesquisadores observaram que o receptor HTR1D foi superexpresso em tumores de CP e em outros nove tipos de câncer,⁶⁸ como apresentado na **Tabela 2.**

A característica proliferativa da 5-HT é mediada mais frequentemente pela família de receptores HTR1, principalmente pelo receptor HTR1D.⁶⁸

Tabela 2. Porcentagem de expressão do receptor HTR1D em tumores

Tumor	Porcentagem de expressão do HTR1D
Cabeça e pescoço	100
Mama	100
Cervical	73
Colorretal	100
Glioma	100
Fígado	100
Pulmão	100
Linfoma	70
Melanoma	100
Pancreático	100
Próstata	100

5-HT e câncer

A 5-HT é uma importante molécula sinalizadora que pode atuar como mensageiro parácrino, endócrino ou exócrino para uma variedade de tipos de células e tecidos.⁶⁹ Nos últimos anos, seu papel foi controverso: além de atuar na homeostasia corporal, a 5-HT foi relacionada com o crescimento, migração e metástase de diversos tumores tanto *in vivo* como *in vitro*, entre eles, destacam-se os tumores de próstata^{72,73}, bexiga⁷², pulmão⁷⁴, colorretal⁷⁵, mama⁷⁶ e fígado.^{77,78}

A 5-HT é produzida em muitos tecidos do corpo humano e seus efeitos são controversos.⁷⁷ Alguns estudos mostraram que a 5-HT pode promover proliferação celular através das vias PI3K/Akt e MAPK⁷⁹ enquanto outros mostram que a 5-HT pode inibir o crescimento do tumor por meio da vasoconstrição.⁸⁰

A 5-HT atua nas células musculares lisas das paredes dos vasos sanguíneos e faz com que elas se contraíam, o que reduz o diâmetro do vaso e aumenta sua resistência ao fluxo sanguíneo.^{81,82} Isso pode ajudar a regular a pressão sanguínea e o fluxo sanguíneo para diferentes órgãos e tecidos do corpo.⁸² No entanto, a vasoconstrição causada pela 5-HT também pode ter efeitos no desenvolvimento do câncer, a redução do fluxo sanguíneo pode inibir o crescimento tumoral em decorrência da falta de suprimento às células cancerígenas.⁸³

Além disso, o envolvimento da 5-HT ao desenvolvimento tumoral parece estar relacionado a seus receptores.⁷⁷ Até o momento, vias de crescimento e proliferação como Src/ERK e PI3K/Akt e invasão celular como as metaloproteinases (MMPs), se mostraram ativadas por receptores de 5-HT.^{77,79}

A ativação do HTR1D promoveu a metástase pulmonar de câncer colorretal através da via axina1/ β -catenina/MMP7⁸¹ e aumentou a proliferação tumoral em células pancreáticas^{85,86} e gástricas.⁸⁷ Ainda, a ativação desse receptor inibiu a apoptose de linhagens celulares de câncer pancreático via PI3K-Akt.⁸⁶ Além disso, a hiperexpressão do *HTR1D* foi associada com a pior sobrevida de pacientes com carcinoma hepatocelular⁸⁸ e daqueles com CCE de cavidade oral.⁸⁹ Em contraste, a hipoexpressão foi associada ao pior prognóstico do câncer colorretal.⁹⁰

Frente ao exposto, é notável que a 5-HT atue em diversas funções no corpo humano, no entanto, ainda não está claro a associação da 5-HT, dos seus receptores e o desenvolvimento do câncer, incluindo o CCEOF. É necessário entender essa relação e ajudar a identificar novos alvos terapêuticos para o tratamento do câncer, bem como ajudar a desenvolver novas estratégias de prevenção, para isso, foram selecionados SNVs na região 5'-flanqueadora de genes que modulam a 5-HT.

5-HT e SNVs

***TPH1* rs623580 (T>A)**

O TPH1 está localizado no cromossomo 11 e codifica a enzima TPH1.⁸⁶ A TPH1 é responsável pela produção da 5-HT nas células da enterocromafins do intestino e pode ser expresso no cérebro, tecidos endócrinos, fígado, pâncreas e músculos.^{91,92}

A SNV rs623580 é caracterizada pela troca das bases nitrogenadas timina (T) por adenina (A) na região 5'-flanqueadora da cadeia de DNA do alelo ancestral e do alelo variante, respectivamente.⁹¹ As frequências dos distintos genótipos foram identificadas em indivíduos saudáveis de diferentes populações étnicas, homocigoto ancestral (TT): 18-52%, heterocigoto (TA): 36-54% e homocigoto variante (AA): 7-29%.⁹³

O alelo variante A da referida SNV foi relacionado a um maior risco de desenvolver depressão.⁹²

***TPH2* rs4570625 (G>T)**

O gene *TPH2* está localizado no cromossomo 12 e codifica a enzima TPH2.⁹² A enzima TPH2 é responsável pela produção da 5-HT por neurônios do núcleo da rafe e neurônios sistema entérico.⁹⁴

A SNV rs4570625 é caracterizada pela troca das bases nitrogenadas guanina (G) e timina (T) na região 5'-flanqueadora da cadeia de DNA do alelo ancestral e do alelo variante, respectivamente.⁹⁵ As frequências dos distintos genótipos foram identificadas em indivíduos saudáveis de diferentes populações étnicas, homocigoto ancestral (GG): 20-79%, heterocigoto (GT): 20-37% e homocigoto variante (TT): 1-41%.⁹³

O alelo variante T da referida SNV foi associado ao maior risco de desenvolver depressão, além disso, em uma análise funcional, o alelo variante foi associado com menor expressão do gene *TPH2*.^{92,96}

***HTR1D* rs674386 (G>A)**

O gene *HTR1D* está localizado no cromossomo 1 e codifica o receptor 1D da 5-HT.⁹⁷

A SNV rs674386 localizada no gene *HTR1D* é caracterizada pela troca das bases nitrogenadas guanina (G) e adenina (A) na região 5'-flanqueadora da cadeia do DNA do alelo ancestral e do alelo variante, respectivamente.⁹⁷

As frequências dos distintos genótipos foram identificadas em indivíduos saudáveis de diferentes populações étnicas, homocigoto ancestral (GG): 17-66%, heterocigoto (GA): 23-64% e homocigoto variante (AA): 4-24%.⁹³

O alelo variante A da referida SNV foi associado com a predisposição à anorexia nervosa.⁸⁸

Até onde atinge nosso conhecimento, não há estudos que relacionem as referidas SNVs ao câncer, incluindo ao CCEOF. Sendo a 5-HT relacionada com o desenvolvimento tumoral, nos pareceu interessante avaliar o papel das SNVs com o surgimento e progressão de tumores de CCEOF.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Verificar a influência das SNVs *TPH1* rs623580 (T>A), *TPH2* rs4570625 (G>T) e *HTR1D* rs674386 (G>A) no surgimento e evolução do CCEOF.

Objetivos específicos

Verificar se as referidas SNVs influenciam: 1) o risco de ocorrência do CCEOF, 2) as características do tumor (localização, grau de diferenciação e estágio do tumor), 3) a sobrevida livre de evento (SLE) e a sobrevida global (SG) dos pacientes com CCEOF, e 4) verificar se as SNVs de interesse alteram a atividade transcricional do gene.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos éticos

Nosso estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pró-Reitoria de Pesquisa da UNICAMP (CAAE: 15054219.8.0000.5404) (**Anexo 1**). As amostras de DNA dos participantes e controles estavam armazenadas no Biorrepositório do Laboratório de Genética do Câncer da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Todos os pacientes (**Anexo 2**) e os indivíduos controles (**Anexo 3**) incluídos no estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

População do estudo

Com o objetivo de investigar o efeito das SNVs *TPH1* rs623580, *TPH2* rs4570625 e *HTR1D* rs674386 no risco de ocorrência do CCEOF, nos aspectos do tumor e na sobrevida dos pacientes, analisamos 251 pacientes com CCEOF atendidos no Ambulatório de Oncologia Clínica do Hospital de Clínicas da UNICAMP entre março de 2002 e agosto de 2016. Foram excluídos do estudo pacientes com tumor primário de localização indefinida. Além disso, avaliamos um grupo controle composto por 254 doadores de sangue do Centro de Hematologia e Hemoterapia da UNICAMP. O tamanho amostral do estudo foi baseado nas frequências dos genótipos das referidas SNVs em indivíduos saudáveis de populações mundiais, e

foi calculado de acordo com as normas descritas por Beiguelman (1995).⁹⁸ O tamanho amostral desejado para o estudo foi de 250 pacientes.

Avaliamos a atividade transcricional da região 5'-flanqueadora dos genes *TPH1* e *HTR1D* por meio do ensaio de gene repórter da luciferase em linhagem celular de CCE de faringe humano (FaDu) (ATCC[®], HTB-43[™], Estados Unidos) modificada para apresentar os diferentes alelos das SNVs *TPH1* rs623580 (T>A) e *HTR1D* rs674386 (G>A), que foram consideradas de interesse por terem sido associadas ao risco de ocorrência da doença e à sobrevida dos pacientes.

Aspectos clínicos

Os pesquisadores responsáveis pelo estudo coletaram dados sobre a idade, sexo e hábito de fumar dos pacientes e controles por meio de um questionário específico. Para classificar os indivíduos como tabagistas, foi utilizado o critério proposto por Freedman et al. (1996).⁹⁹ De acordo com esse critério, os indivíduos foram classificados como fumantes se relataram o hábito frequente de tabagismo, ex-fumantes se haviam cessado o hábito de tabagismo há pelo menos cinco anos, e não fumantes se nunca haviam tido esse hábito.

Aspectos do tumor

Obtivemos as informações sobre as características do tumor, como o tamanho, o estágio e o número de linfonodos afetados, por meio dos registros médicos dos pacientes. O diagnóstico de CCEOF foi confirmado por análise histológica de amostras de tumor em cortes de parafina corados com hematoxilina e eosina. A imunistoquímica para a proteína P16 e a hibridização *in situ* foram realizadas em fragmentos tumorais, visando testar a presença do HPV-16.¹⁰⁰ O processamento das amostras foi conduzido pelo Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

A classificação do grau de diferenciação celular do tumor foi baseada nos critérios propostos por Gale & Zidar (2013).⁹ O estágio do tumor foi determinado de acordo com os critérios da 7^a edição do *American Joint Committee on Cancer*,¹⁰¹ por meio de exames clínicos, nasofibrolaringoscopia, tomografia computadorizada do pescoço e radiografia do tórax, realizados no Serviço de Radiologia do Hospital de Clínicas da UNICAMP.

Tratamento dos pacientes

Os pacientes diagnosticados com CCEO de tipo B receberam tratamento combinado de QT à base de CDDP e RT loco-regional. A administração de CDDP foi feita por via intravenosa, com dose de 100mg/m²/dose nos dias D1, D22 e D43, para pacientes com condição física ideal e sem comorbidades renais, neurológicas ou cardiológicas.¹⁰² Para os pacientes com desempenho de Karnofsky entre 60-70% ou 80-100% e com comorbidades renais, neurológicas ou cardiológicas, a dose intravenosa de CDDP foi reduzida para 80mg/m²/dose nos mesmos dias.¹⁰²

Genotipagem

Seleção das SNVs

As SNVs *TPH1* rs623580, *TPH2* rs4570625 e *HTR1D* rs674386 foram selecionadas a partir do banco de dados da *University of California Santa Cruz* (UCSC) (genome.ucsc.edu) (**figura 4**). A seleção foi baseada nos seguintes critérios: a localização das SNVs na região 5'-flanqueadora do gene com frequência do alelo variante maior que 20% na população do Projeto 1000 Genomas (The 1000 Genomes Project Consortium, 2015),¹⁰³ além de terem trabalhos publicados anteriormente na literatura (**Apêndice 1, Supporting information**).

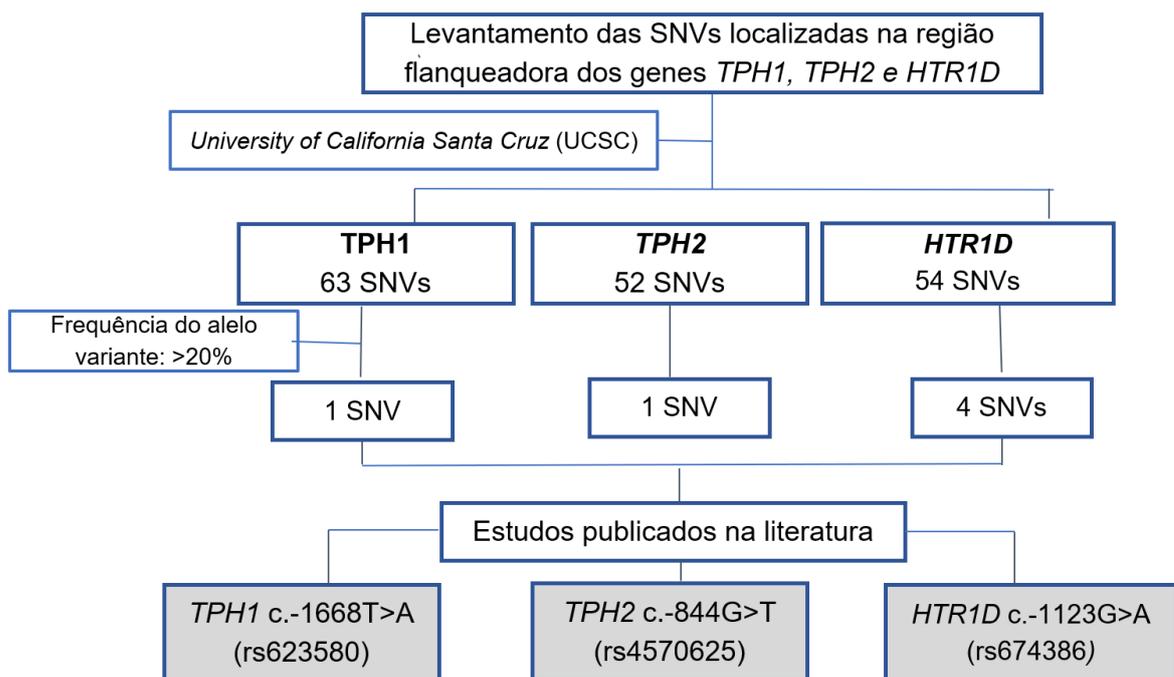


Figura 4: Seleção de SNVs localizadas na região flanqueadora dos genes *TPH1*, *TPH2* e *HTR1D* através do banco de dados da *University of California Santa Cruz* (UCSC). Foram encontradas 63 SNVs localizadas na região flanqueadora do gene *TPH1*, 52 SNVs no gene *TPH2* e 54 SNVs no gene *HTR1D*. Dessas, selecionamos aquelas com frequência alélica maior que 20%. Por fim, foram incluídas no estudo aquelas com publicações na literatura.

Extração do DNA genômico

Inicialmente foi realizada a extração de DNA em leucócitos do sangue periférico de 251 pacientes e 254 controles por meio da técnica com cloreto de lítio (LiCl) e proteinase K.¹⁰⁴

Resumidamente, as amostras de sangue periférico foram coletadas com anticoagulante ácido etilenodiamino tetracético (EDTA) e posteriormente lisadas em 1 mL de tampão de lise composto por 320 mM de sacarose, 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) e 1% de Triton X-100. O concentrado de células obtido foi então ressuspensionado em 400 µL de tampão de digestão contendo 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM de EDTA, 10 mM de cloreto de sódio (NaCl) e 0,5% de dodecil sulfato de sódio (SDS), juntamente com proteinase K (20 mg/mL), e incubado a 55°C por 2 horas. Em seguida, foram adicionados 200 µL de LiCl (7,5 M) às amostras, que foram incubadas a -20°C por pelo menos 15 minutos. As amostras foram então centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos, e ao sobrenadante foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado. O DNA precipitado foi centrifugado novamente a 13.000 rpm por 10 minutos, seguido de duas lavagens com etanol 70%, e finalmente ressuspensionado em tampão TE (2 M de tris base e 0,2 M de EDTA, pH 8,0), sendo armazenado a -20°C para uso posterior.

A integridade do DNA genômico extraído foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. A concentração e a pureza das amostras de DNA foram determinadas utilizando o espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies®, Estados Unidos).

Identificação dos genótipos

Os genótipos das SNVs *TPH1* rs623580, *TPH2* (rs4570625) e *HTR1D* (rs674386) foram obtidos por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real utilizando os ensaios para genotipagem TaqMan® (referências:

C_2645676_10, C_226207_10, C_3278318_10, respectivamente) (Applied Biosystems®, Estados Unidos) (**Figura 5**).

A PCR em tempo real foi realizada utilizando aproximadamente 50 nanogramas (ng) de DNA. Para cada reação, foram adicionados 0,5 µL de *SNV Genotyping Assay Mix 1X*, contendo duas sondas e dois fluorocromos detectores (FAM e VIC), 5 µL de *TaqMan® Universal PCR Master Mix 1X*, que inclui a Taq DNA polimerase, desoxirribonucleotídeos (dNTPs) e uma solução tampão otimizada para a reação, além de água estéril para atingir um volume final de 10 µL.

As condições de amplificação consistiram em uma etapa inicial de ativação da Taq DNA polimerase a 95°C por 10 minutos, seguida por 45 ciclos de incubação a 92°C por 15 segundos e a 60°C por 1 minuto (**Figura 5**). Controles positivos (com genótipos já estabelecidos) e controles negativos (com água estéril) foram incluídos em todas as reações de genotipagem.

Além disso, 15% das amostras, selecionadas aleatoriamente, foram genotipadas novamente como controle de qualidade, garantindo uma concordância de 100% entre as análises. Os resultados da genotipagem foram analisados utilizando o software *TaqMan® Genotyper* (Applied Biosystems®, Estados Unidos) (**Figura 6**).

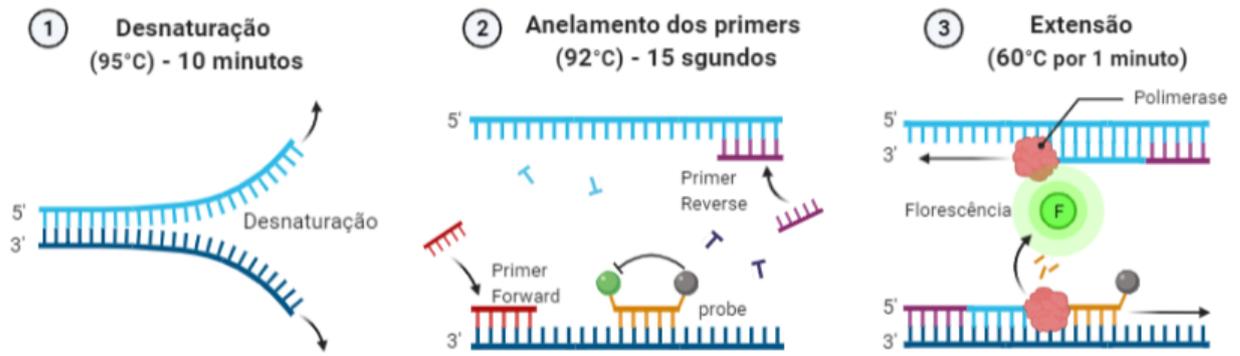


Figura 5. Representação esquemática das etapas da reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. (1) Desnaturação: abertura da dupla fita de DNA a 95°C por 10 minutos. (2) Anelamento dos primers: na temperatura de 92°C, os primers são capazes de se ligar à complementariedade na fita de DNA, da mesma forma que ocorre o anelamento das sondas TaqMan. (3) Extensão: nessa fase, a enzima Taq DNA polimerase adiciona novos nucleotídeos à fita, a uma temperatura de 60°C. Quando a enzima Taq encontra a sonda de hidrólise, ela a rompe e emite fluorescência, que é captada pelo termociclador

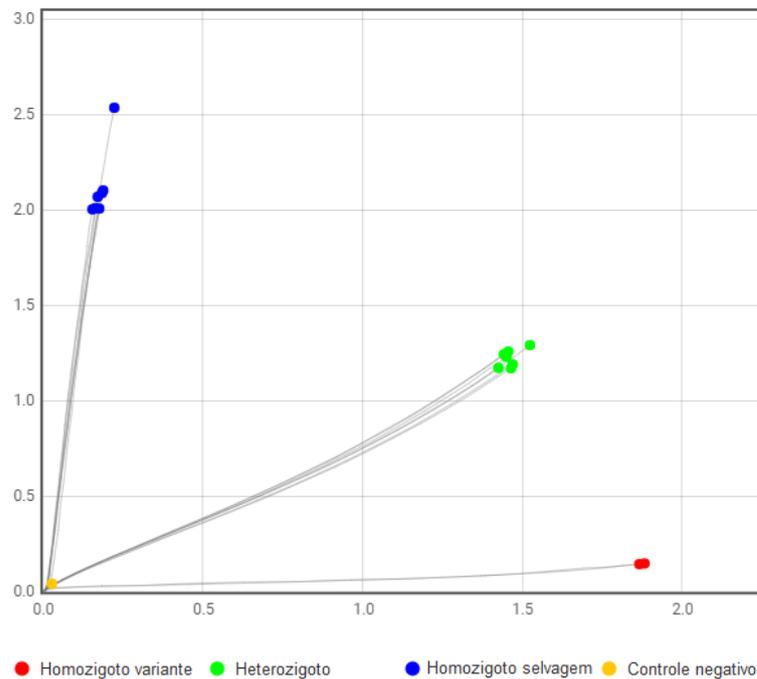


Figura 6. Representação esquemática de um gráfico de pontos com as distribuições dos genótipos das SNVs de pacientes com carcinoma de células escamosas de orofaringe e controles analisados pelo programa *TaqMan® Genotyper* (Applied Biosystems®, Estados Unidos) após a reação em cadeia da polimerase em tempo real. Os círculos azuis, verdes e vermelhos representam, respectivamente, genótipos homozigotos ancestral, heterozigotos e homozigotos variantes. O círculo amarelo, no canto inferior esquerdo representa o controle negativo (água estéril) da reação

Avaliação da atividade transcricional dos genes

Cultura de células

As células da linhagem FaDu foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco[®], Estados Unidos), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco[®], Estados Unidos), 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de sulfato de estreptomicina (Cultilab, Brasil). O cultivo ocorreu em uma atmosfera úmida com 5% de dióxido de carbono (CO₂) a 37°C e o meio de cultura foi trocado três vezes por semana. Quando as células atingiram 60-80% de confluência, foram recultivadas ou utilizadas para os experimentos. As culturas celulares foram mantidas em um número limitado de passagens e estoques de células congeladas em nitrogênio líquido foram usados para garantir a uniformidade dos experimentos, com células fenotipicamente semelhantes.

Ensaio do gene repórter da luciferase

O ensaio de luciferase é capaz de avaliar a modulação da expressão gênica, pois a proteína luciferase codificada pelo gene repórter é detectada e quantificada através da reação de bioluminescência. A oxidação da luciferina, que é o substrato da luciferase, gera um *flash* de luz que é detectado pelo luminômetro (**Figura 7**). Dessa forma, a intensidade da luz é proporcional à atividade da luciferase em cada amostra, refletindo a taxa de transcrição do gene repórter sob a ação dos diferentes alelos da SNV.

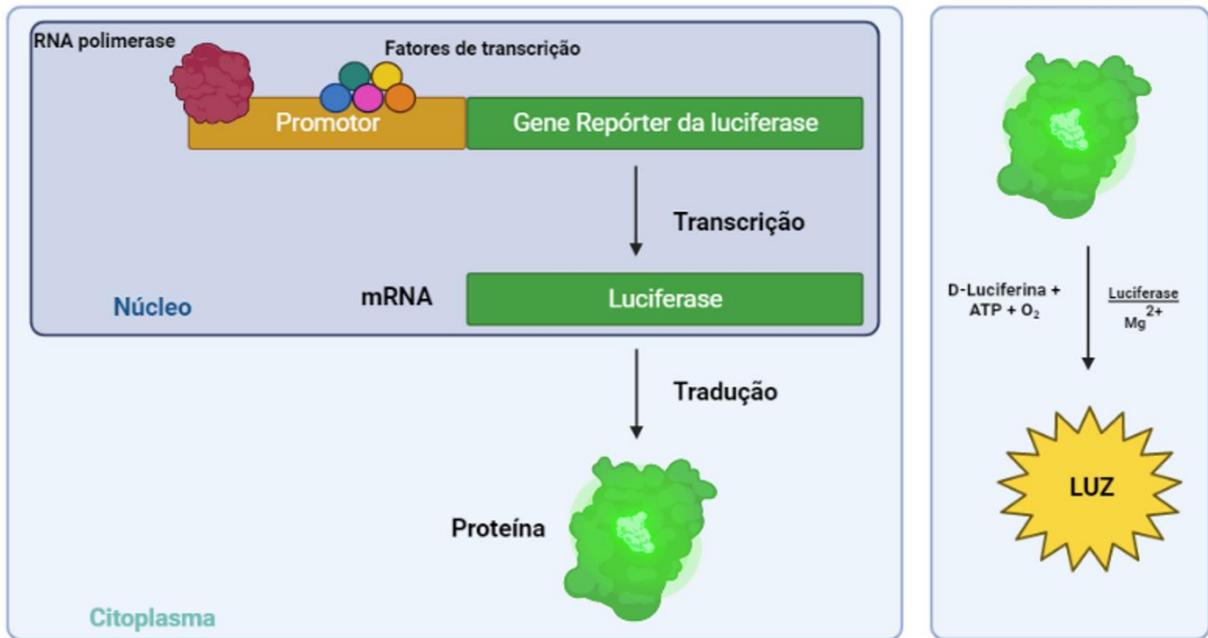


Figura 7. Representação esquemática do ensaio do gene repórter da luciferase. O quadrante esquerdo representa uma célula contendo o núcleo e o citoplasma. No promotor do gene, é inserida uma sequência contendo a SNV de interesse. Quando estimulado por fatores de transcrição e pela RNA polimerase, o promotor transcreve o gene da luciferase. O gene repórter da luciferase é bioluminescente e, após ser transcrito em RNA mensageiro, é transportado para o citoplasma e traduzido em uma proteína bioluminescente. O quadrante direito representa a reação realizada para quantificar a luciferase. Após o experimento, a luciferase é lisada e exposta a alguns substratos, o que gera luz que é capturada pelo equipamento. Quanto mais luz for captada, maior será a atividade do gene repórter

Utilizamos o sistema *pGL3-Basic Luciferase Reporter Vector* (Promega®, Estados Unidos) (**Anexo 4**) para realizar a técnica do ensaio do gene repórter da luciferase. Esse vetor contém a sequência do gene de resistência ao antibiótico ampicilina, que é utilizado na seleção das bactérias que receberam o vetor com o inserto de interesse, além da sequência ori de origem de replicação em *E. coli*, onde a transcrição se inicia. O vetor também possui o gene repórter *firefly luciferase*, que permite a análise da expressão da enzima luciferase determinada pela atividade da região promotora do gene alvo.

Construção dos plasmídeos

Amplificação de parte da região 5'- flanqueadora do gene *TPH1*

Inicialmente, foi realizado uma PCR com o iniciador direto: 5'- AGCAACTT TTCCACATGTTT -3' e iniciador indireto: 5'- GAAAAGAAGGGACACTGAGATC -3' para obtenção de fragmentos com 867pb. Realizamos as PCRs usando o DNA de indivíduos saudáveis o genótipo homocigoto ancestral *TPH1* TT e outra amostra de um indivíduo controle com o genótipo homocigoto variante *TPH1* AA. As reações consistiram em 100ng de DNA, 1,25µL de DMSO 2%, 1,0µL de sulfato de magnésio (MgSO₄) 50mM, 2,5µL de solução tampão 10X, 0,5µL de dNTP 40mM, 0,1µL (2U) de *Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Scientific®, Estados Unidos). As misturas foram incubadas inicialmente por 2 minutos a 94°C, seguidas de 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 58°C e 1 minuto e 20 segundos a 68°C, e extensão final de 5 minutos a 68°C.

Posteriormente, com objetivo de aumentar a sensibilidade e especificidade de amplificação dos fragmentos, foi realizada uma nested-PCR utilizando os produtos da PCR anterior em uma nova PCR, para obtenção de fragmentos com 376pb. A PCR consistiu em 1,0µL da PCR anterior, 1,25µL de DMSO 2%, 1,0µL de MgSO₄ 50mM, 2,5µL de solução tampão 10X, 0,5µL de dNTP 40mM e 0,1µL de *Dream® Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Thermo Scientific®, Estados Unidos). Para a segunda PCR foi utilizado o iniciador direto: 5'- CCTGCTAGCGTGTTAATTATCC -3' (o sítio de restrição da enzima *NheI* está sublinhado) e iniciador indireto: 5'- CCCTCGAGAAGTGACCATTTC -3' (o sítio de restrição da enzima *XhoI* está sublinhado).

Amplificação de parte da região 5'- flanqueadora do gene *HTR1D*

Foi realizado uma PCR com o iniciador direto: 5'- CCCGGTACCTTCATGCTCACTATAG -3' (o sítio da enzima de restrição *KpnI* está sublinhado) e iniciador indireto: 5'- CCCCTCGAGTTCTAAAAAGTATCAG -3' (o sítio da enzima de restrição *XhoI* está sublinhado) para obtenção de fragmentos com 318pb. A PCR consistiu em 50ng de DNA, 2,5µL de tampão, 0,75µL de MgSO₄ 50mM, 0,5µL dNTP, 0,5µL de iniciador direto, 0,5µL de iniciador indireto e 0,1µL *Taq DNA Polymerase Platinum* (Invitrogen®, Estados Unidos).

Digestão enzimática

As PCRs dos alelos ancestral e variante, juntamente com o vetor pGL3 (Promega®, Estados Unidos), foram digeridas utilizando as respectivas enzimas de restrição. Para cada amostra (aproximadamente 150 ng), foram adicionados 10U de cada enzima de restrição e 2 µL da solução tampão 10X de cada enzima (New England Biolabs®, Estados Unidos), em uma mistura final de 20 µL. A reação de digestão foi realizada durante a noite a 37°C, seguida de uma inativação da enzima por 20 minutos a 80°C.

Após a digestão enzimática, os fragmentos das PCRs dos diferentes alelos foram purificados novamente utilizando o kit *QIAquick PCR Purification* (Qiagen®, Alemanha). Os vetores foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo, e em seguida, os fragmentos de interesse foram purificados utilizando o kit *QIAEX II Gel Extraction* (Qiagen®, Alemanha).

Ligação

Após a purificação das reações, os insertos foram clonados no vetor pGL3 (Promega®, Estados Unidos) na proporção de 1:5 (vetor:inserto). As misturas das soluções para um volume final de 10 µL estão apresentadas na **Tabela 3**.

Após o período de incubação, foram gerados os plasmídeos pGL3-TPH1_TT ou pGL3-HTR1D_GG (alelo ancestral) e pGL3-TPH1_AA ou pGL3-HTR1D_AA (alelo variante).

Tabela 3. Reagentes utilizados no ensaio de ligação dos insertos aos vetores

Reagente	Tempo de incubação
65 ng vetor pGL3*	
24,2 ng de cada inserto	
1 µL da enzima T4 DNA Ligase**	24 horas a 14°C
2 µL da solução <i>T4 DNA Ligase Reaction Buffer 10X</i>	

*Promega®, Estados Unidos. **New England Biolabs®, Estados Unidos

Transformação dos plasmídeos em bactérias *E. coli* DH5 α

Os plasmídeos pGL3-TPH1_TT ou pGL3-HTR1D_GG (alelo ancestral) e pGL3-TPH1_AA ou pGL3-HTR1D_AA (alelo variante) foram transformados em bactérias *E. coli* DH5 α (Life Technologies®, Estados Unidos) quimicamente competentes. O processo de transformação está representado na **Figura 8**.

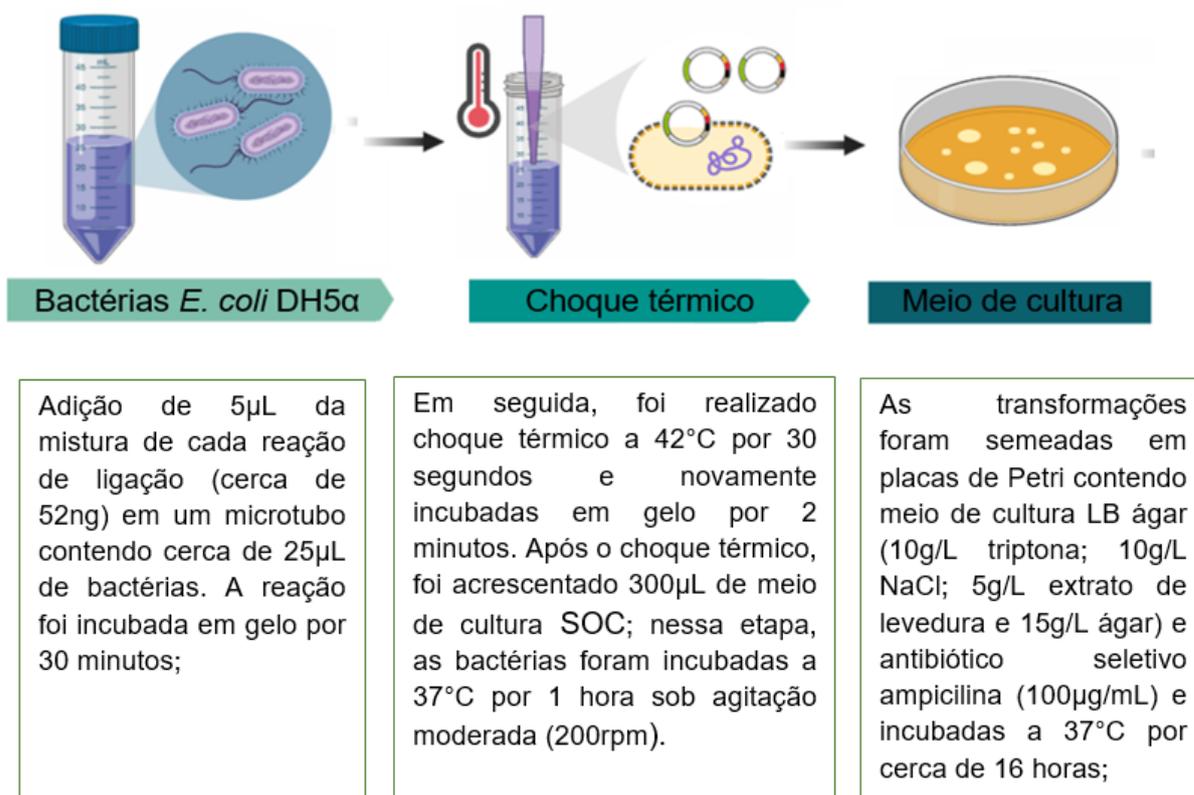


Figura 8. Representação esquemática do processo de transformação dos plasmídeos em em bactérias *E. coli* DH5 α . O meio de cultura SOC contém: 5g/L de extrato de levedura, 20g/L de triptona, 0,5g/L de cloreto de sódio, 2,5mM de cloreto de potássio, 10mM de sulfato de magnésio, 10mM de cloreto de magnésio e 20mM de glicose

Após 16 horas de incubação, observou-se o crescimento de colônias transformadas (que incorporaram o plasmídeo de interesse) na placa de Petri. As colônias selecionadas e isoladas foram submetidas à expansão, separadamente em tubos de polipropileno contendo 5mL de meio LB líquido (10g/L triptona, 5g/L extrato de levedura, 10g/L NaCl) com antibiótico ampicilina (100 μ g/mL) a 37°C por cerca de 18 horas sob agitação moderada (200rpm).

Após os processos de transformação e expansão, os clones obtidos foram submetidos à extração do DNA plasmidial por meio do kit *QIAprep Spin Miniprep* (Qiagen®, Alemanha). A concentração e a pureza do DNA plasmidial foram determinadas por meio do espectrofotômetro NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies®, Estados Unidos). Nessa etapa, a inserção e a orientação dos fragmentos foram confirmadas por meio do Sequenciador Sanger 3730xL (Applied Biosystems®, Estados Unidos).

Transfecção dos plasmídeos na linhagem celular FaDu

Um dia antes da transfecção das células da linhagem FaDu, 1×10^5 células foram cultivadas em placas de 12 poços, em condições ótimas para o crescimento e manutenção das células.

Além dos plasmídeos pGL3-TPH1_TT ou pGL3-HTR1D_GG (alelo ancestral) e pGL3-TPH1_AA ou pGL3-HTR1D_AA (alelo variante) e o vetor vazio, o plasmídeo *Renilla Luciferase Control Reporter* (pRL) (Promega®, Estados Unidos) foi utilizado como controle interno das reações, a fim de reduzir as discrepâncias das transfecções entre os grupos.

A transfecção dos referidos plasmídeos nas células FaDu foi realizada em três grupos: grupo 1) plasmídeo pGL3-alelo_ancestral e pRL; grupo 2) plasmídeo pGL3-alelo_variante e pRL e grupo 3) pGL3-vazio e pRL. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e repetidos em três experimentos independentes.

Foram utilizados cerca de 500ng dos respectivos plasmídeos de interesse, 50ng do plasmídeo pRL, em meio de cultura Opti-MEM (Life Technologies®, Estados Unidos) durante os ensaios de transfecção. As combinações dos plasmídeos de cada grupo foram incubadas com 3,0 μ L/poço do reagente Lipofectamina 3000™ (Life Technologies®, Estados Unidos) a temperatura ambiente por 15 minutos. Nessa etapa, ocorre a formação de um complexo entre o DNA plasmidial e o lipossomo, que é capaz de ser internalizado pelas células FaDu.

As misturas de plasmídeo-lipofectamina foram adicionadas às células dos respectivos grupos, que já continham 700 μ L de DMEM sem SFB. Depois de 6 horas, foi realizado a troca do meio DMEM, adicionando 1 mL de meio DMEM com 2% de SFB (Gibco®, Estados Unidos) e 100U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de sulfato de estreptomicina (Cultilab®, Brasil) por poço. As células foram mantidas em atmosfera

umidificada contendo 5% de CO₂ a 37°C até o momento do ensaio do gene repórter da luciferase.

Ensaio do gene repórter da luciferase

Após 48 horas da transfecção dos plasmídeos em células Fadu, foi realizada a quantificação da atividade da luciferase. A lise das células foi realizada usando 100 µL do tampão de lise PLB (Promega®, Estados Unidos), seguida da quantificação das atividades das enzimas da luciferase dos plasmídeos transfectados. Essa quantificação foi feita utilizando um luminômetro (Promega®, Estados Unidos) e o kit *Dual-Luciferase® Reporter (DLR™) Assay System* (Promega®, Estados Unidos). Esse kit permitiu medir a bioluminescência das luciferases *firefly* e *renilla* no mesmo experimento. A atividade relativa da luciferase *firefly* de cada amostra foi normalizada em relação aos valores da luciferase *renilla*. Para medir a bioluminescência da luciferase *firefly*, adicionamos 20 µL do lisado de células a 100 µL do reagente LAR II. Em seguida, adicionamos 100 µL do reagente *Stop & Glo* à mistura para possibilitar a leitura da luciferase *renilla* (Promega®, Estados Unidos).

Análise de sítios de fatores de transcrição

A análise de sítios de ligação de fatores de transcrição foi realizada usando o programa computacional atSNP (atsnp.biostat.wisc.edu). O atSNP avaliou o impacto de SNVs nos sítios de ligação de fatores de transcrição no genoma humano.¹⁰⁵ A significância das alterações na ligação de fatores de transcrição foi determinada comparando a afinidade de ligação do fator de transcrição para os sítios que continham o alelo ancestral ou o alelo variante. O atSNP calcula o valor de p da estatística de log-rank avaliada nas melhores correspondências de sítios de ligação com ambos os alelos, referido como valor p de impacto, e um valor p de impacto abaixo ou igual a 0,001 foi considerado significativo.¹⁰⁵ Os resultados foram representados como pontuações de *log de odds*. Fatores de transcrição sem expressão conhecida em tecidos de cabeça e pescoço foram excluídos da análise.

Análise estatística

Foi aplicado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg¹⁰⁶ para verificar a existência de distribuição preferencial de algum dos genótipos dos genes *TPH1*, *TPH2* e *HTR1D* entre os pacientes e os controles.

As diferenças estatísticas significativas entre os grupos foram avaliadas pelos testes de probabilidade exata de Fisher ou qui-quadrado.

A regressão logística múltipla foi utilizada para calcular os riscos de ocorrência do CCEOF, com obtenção das razões das chances (ORs) ajustadas pela idade, sexo e hábito do tabagismo, considerando o intervalo de confiança (IC) de 95%.

Utilizamos as curvas de Kaplan-Meier (KM) para avaliar a sobrevida dos pacientes, estimando os tempos de SLE e SG. A SLE foi determinada a partir do diagnóstico até a ocorrência da primeira progressão, recidiva da doença, óbito relacionado à doença ou perda de seguimento. A SG foi calculada desde o diagnóstico até o óbito por qualquer causa ou perda de seguimento. A análise comparativa das curvas foi realizada utilizando o teste de log-rank. Avaliamos o fator prognóstico de cada variável (características clínicas e do tumor) por meio da análise univariada de Cox. Em seguida, incluímos todas as variáveis com $p < 0,10$ na análise multivariada de Cox. Os resultados significativos ($p < 0,05$) foram validados internamente por meio da análise de *bootstrap*, uma técnica de reamostragem dos dados originais para obter desvios-padrão mais confiáveis (10.000 repetições).

Para analisar a atividade da luciferase entre os grupos, utilizamos o teste de Shapiro-Wilk para avaliar a distribuição normal dos valores das amostras, e os resultados da luciferase foram submetidos ao teste *t* de Student.

Foram considerados significativos os valores de $p < 0,05$. Todas as análises foram executadas no software estatístico SPSS 21.0 (SPSS Incorporation®, Estados Unidos).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e a discussão do estudo foram publicados na revista científica internacional *Head & Neck* e podem ser consultados no artigo intitulado *Influence of variants in serotonin modulating genes on the risk, aggressiveness, and prognosis of oropharynx cancer* (DOI: 10.1002/hed.27394) (**Apêndice 1**).

CONCLUSÕES

A SNV *TPH1* rs623580 influenciou o risco de ocorrência do CCEOF e modulou a atividade transcricional do gene *TPH1*, possivelmente devido ao impacto no sítio de ligação do fator de transcrição RUNX1.

A SNV *TPH2* rs4570625 não apresentou influência no risco, nas características do tumor ou na sobrevida dos pacientes com CCEOF.

A SNV *HTR1D* rs674396 foi associada ao prognóstico dos pacientes com a doença e com a alteração da atividade de transcrição do *HTR1D*, possivelmente devido à alteração do sítio de ligação do fator de transcrição SOX8.

REFERÊNCIAS

1. Chow LQM. Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*. 2020; 2382(1):60-72.
2. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(6):394–42.
3. Shin E, Kim J. The potential role of YAP in head and neck squamous cell carcinoma. *Exp Mol Med*. 2020; 52(8):1264-1274.
4. Safdar Y, Khalili M, Farajnia S, Asgharzadeh M, Yazdani Y, Sadeghi M. Recent advances in head and neck squamous cell carcinoma-a review. *Clin Biochem*. 2014; 47(13-14):1195-202.
5. McDermott JD, Bowles DW. Epidemiology of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas: Impact on Staging and Prevention Strategies. *Curr Treat Options Oncol*. 2019; 22;20(5):43.
6. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa de câncer 2020. Ministério da Saúde, Brasil, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/estimativa/estado-capital/brasil>.
7. Fossum CC, Chintakuntlawar AV, Price DL, Garcia JJ. Characterization of the oropharynx: anatomy, histology, immunology, squamous cell carcinoma and surgical resection. *Histopathology*. 2017; 70(7):1021-1029.
8. Hashim D, Genden E, Posner M, Hashibe M, Boffetta P. Head and neck cancer prevention: from primary prevention to impact of clinicians on reducing burden. *Ann Oncol*. 2019; 1;30(5):744-756.
9. Gale N, Zidar N. Tumours of the head and neck. In: Damjanov I, Fan F. *Cancer grading manual*. 2 ed. Heidelberg New York Dordrecht London: Springer; 2013. p.9-29.
10. Rettig E, D'Souza G. Epidemiology of head and neck cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*. 2015; 24(3):379-96.
11. Hui Huang S, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2017; 18(7):40.
12. Monden N, Asakage T, Kiyota N, Homma A, Matsuura K, Hanai N, et al. A review of head and neck cancer staging system in the TNM classification of malignant tumors (eighth edition). *Jpn J Clin Oncol*. 2019; 49(7):589-595.

13. Glastonbury CM. Diseases of the Brain, Head and Neck, Spine 2020-2023: Diagnostic Imaging. Cham (CH) Springer; 2020. Capitulo 17.
14. Marur S, Forastiere AA. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Update on Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clin Proc.* 2016; 91(3):386-96.
15. Margalit DM, Salz T, Venchiarutti R, Milley K, McNamara M, et al. Interventions for head and neck cancer survivors: Systematic review. *Head Neck.* 2022; 44(11):2579-2599.
16. Ghosh S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry.* 2019; 88:102925.
17. Dasari S, Tchounwou PB. Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology.* 2014; 5;740:364-78.
18. Zraik IM, Heß-Busch Y. Management of chemotherapy side effects and their long-term sequelae. *Urologe A.* 2021;60(7):862-871.
19. Belcher R, Hayes K, Fedewa S, Chen AY. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. *J Surg Oncol.* 2014;110(5):551-74.
20. Kawakita D, Matsuo K. Alcohol and head and neck cancer. *Cancer Metastasis Reviews.* 2017; 36(3):425-434
21. Mizumoto A, Ohashi S, Hirohashi K, Amanuma Y, Matsuda T, Muto M. Molecular Mechanisms of Acetaldehyde-Mediated Carcinogenesis in Squamous Epithelium. *Int J Mol Sci.* 2017; 10;18(9):1943.
22. Jethwa AR, Khariwala SS. Tobacco-related carcinogenesis in head and neck cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 2017;36(3):411-423.
23. Tomar SL, Hecht SS, Jaspers I, Gregory RL, Stepanov I. Oral Health Effects of Combusted and Smokeless Tobacco Products. *Adv Dent Res.* 2019;30(1):4-10.
24. Tanaka TI, Alawi F. Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *Dent Clin North Am.* 2018;62(1):111-120.
25. Spence T, Bruce J, Yip KW, Liu FF. HPV Associated Head and Neck Cancer. *Cancers (Basel).* 2016; 5;8(8):75.
26. Ducatman BS. The Role of Human Papillomavirus in Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2018; 142(6):715-718.
27. Kobayashi K, Hisamatsu K, Suzui N, Hara A, Tomita H, Miyazaki T. A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *J Clin Med.* 2018; 27;7(9):241.

28. Gillison ML. HPV and prognosis for patients with oropharynx cancer. *Eur J Cancer*. 2009; 45 (1):383-5.
29. Fossum GH, Lie AK, Jebsen P, Sandlie LE, Mork. Human papillomavirus in oropharyngeal squamous cell carcinoma in South-Eastern Norway: prevalence, genotype, and survival. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2017; 274(11):4003-4010.
30. Nørregaard C, Grønhøj C, Jensen D, Friborg J, Andersen E, von Buchwald C. Cause-specific mortality in HPV+ and HPV- oropharyngeal cancer patients: insights from a population-based cohort. *Cancer Med*. 2018; 7(1):87-94.
31. López RVM, Levi JE, Eluf-Neto J, Koifman RJ, Koifman S, Curado MP, 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*. 2014;25(4):461-71.
32. Jou A, Hess J. *Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer*. *Oncol Res Treat*. 2017;40(6):328-332.
33. Sant' Anna CC, Junior AGF, Soares P, Tuji F, Paschoal E, Chaves LC, Burbano RR. Molecular biology as a tool for the treatment of cancer. *Clin Exp Med*. 2018;18(4):457-464.
34. Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol*. 2018;52(Pt 2):228-240.
35. Costa EF, Santos ES, Liutti VT, Leal F, Santos VC, Rinck-Junior JA, et al. Association between polymorphisms in genes related to DNA base-excision repair with risk and prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016; 142(9):1917–26.
36. Lacko M, Braakhuis BJM, Sturgis EM, Boedeker CC, Suárez C, Rinaldo A, et al. Genetic susceptibility to head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2013; 89(1):38-48.
37. Lopes-Aguiar L, Dias Costa EF, Silva Nogueira GA, Penna Lima TR, Visacri MB, Pincinato EC, et al. XPD c.934G>A polymorphism of nucleotide excision repair pathway in outcome of head and neck squamous cell carcinoma patients treated with cisplatin chemoradiation. *Oncotarget*. 2017; 7;8(10):16190-16201.

39. Vossen DM, Verhagen CVM, Grénman R, Kluin RJC, Verheij M, Van Den Brekel MWM, et al. Role of variant allele fraction and rare SNP filtering to improve cellular DNA repair endpoint association. *PLoS One*. 2018; 8;13(11):e0206632.
40. Köberle B, Koch B, Fischer BM, Hartwig A. Single nucleotide polymorphisms in DNA repair genes and putative cancer risk. *Arch Toxicol*. 2016;90(10):2369-88.
41. Deng N, Zhou H, Fan H, Yuan Y. Single nucleotide polymorphisms and cancer susceptibility. *Oncotarget*. 2017; 7;8(66):110635-110649.
42. Lu M, Liu Z, Yu H, Wang LE, Li G, Sturgis EM, et al. Combined effects of E2F1 and E2F2 polymorphisms on risk and early onset of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Mol Carcinog*. 2012;51:E132-41.
43. Ruiz-Ballesteros AI, Meza-Meza MR, Vizmanos-Lamotte B, Parra-Rojas I, Cruz-Mosso U. Association of Vitamin D Metabolism Gene Polymorphisms with Autoimmunity: Evidence in Population Genetic Studies. *Int J Mol Sci*. 2020; 17;21(24):9626.
44. Mayr C. What Are 3' UTRs Doing?. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2019; 1;11(10):a034728.
45. Erokhin M, Vassetzky Y, Georgiev P, Chetverina D. Eukaryotic enhancers: common features, regulation, and participation in diseases. *Cell Mol Life Sci*. 2015; 72(12):2361-75
46. Li Y, Sturgis EM, Zhu L, Cao X, Wei Q, Zhang H, et al. E2F transcription factor 2 variants as predictive biomarkers for recurrence risk in patients with squamous cell carcinoma of the oropharynx. *Mol Carcinog*. 2017;56(4):1335-1343.
47. Degtyareva AO, Antontseva EV, Merkulova TI. Regulatory SNPs: Altered Transcription Factor Binding Sites Implicated in Complex Traits and Diseases. *Int J Mol Sci*. 2021; 16;22(12):6454.
48. Coller HA. Is cancer a metabolic disease?. *Am J Pathol*. 2014;184(1):4-17.
49. Jones LA, Sun EW, Martin AM, Keating DJ. The ever-changing roles of serotonin. *Int J Biochem Cell Biol*. 2020;125:105776.
50. Sarrouilhe D, Mesnil M. Serotonin and human cancer: A critical view. *Biochimie*. 2019; 161:46-50.
51. Sarrouilhe D, Clarhaut J, Defamie N, Mesnil M. Serotonin and cancer: what is the link?. *Curr Mol Med*. 2015;15(1):62-77.

52. Bader M. Inhibition of serotonin synthesis: A novel therapeutic paradigm. *Pharmacol Ther.* 2020; 205:107423.
53. O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav Brain Res.* 2015; 15; 277:32-48.
54. Baudry A, Pietri M, Launay JM, Kellermann O, Schneider B. Multifaceted Regulations of the Serotonin Transporter: Impact on Antidepressant Response. *Front Neurosci.* 2019; 12;13:91.
55. Peters MAM, Walenkamp AME, Kema IP, Meijer C, De Vries EGE, Oosting S. Dopamine and serotonin regulate tumor behavior by affecting angiogenesis. *Drug Resist Updat.* 2014;17(4-6):96-104.
56. Gheorghe CE, Martin JA, Manriquez FV, Dinan TG, Cryan JF, Clarke G. Focus on the essentials: tryptophan metabolism and the microbiome-gut-brain axis. *Curr Opin Pharmacol.* 2019; 48:137-145.
57. Yabut JM, Crane JD, Green AE, Keating DJ, Khan WI, Steinberg GR. Emerging Roles for Serotonin in Regulating Metabolism: New Implications for an Ancient Molecule. *Endocr Rev.* 2019; 1;40(4):1092-1107.
58. Pytliak M, Vargová V, Mechírová V, Felšöci M. Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiol Res.* 2011; 60(1):15-25.
59. Frazer A, Hensler JG. *Serotonin Receptors: Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* 6th edition.
60. McCorvy JD, Roth BL. Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther.* 2015; 150:129-42.
61. Teitler M, Herrick-Davis K, Purohit A. Constitutive activity of G-protein coupled receptors: emphasis on serotonin receptors. *Curr Top Med Chem.* 2002 Jun;2(6):529-38.
62. Martin AM, Young RL, Leong L, Rogers GB, Spencer NJ, Jessup CF, et al. The Diverse Metabolic Roles of Peripheral Serotonin. *Endocrinology.* 2017; 1;158(5):1049-1063.
63. Giulietti M, Vivenzio V, Piva F, Principato G, Bellantuono C, Bernardo Nardi. How much do we know about the coupling of G-proteins to serotonin receptors? *Mol Brain.* 2014; 10;7:49.

64. Ahmed MB, Alghamdi AAA, Islam SU, Joon-Seok L, Young-Sup L. cAMP Signaling in Cancer: A PKA-CREB and EPAC-Centric Approach. *Cells*. 2022; 24;11(13):2020.
65. Felsing DE, Canal CE, Booth RG. Ligand-directed serotonin 5-HT_{2C} receptor desensitization and sensitization. *Eur J Pharmacol*. 2019; 5; 848:131-139.
66. Afzal R, Shim WS. Glucosylsphingosine Activates Serotonin Receptor 2a and 2b: Implication of a Novel Itch Signaling Pathway. *Biomol Ther (Seoul)*. 2017; 1;25(5):497-50.
67. Balakrishna P, George S, Hatoum H, Mukherjee S. Serotonin Pathway in Cancer. *nt J Mol Sci*. 2021; 28;22(3):1268.
68. Ballou Y, Rivas A, Belmont A, Patel L, Amaya CN, Lipson S, et al. 5-HT serotonin receptors modulate mitogenic signaling and impact tumor cell viability. *Mol Clin Oncol*. 2018; 9(3):243-254.
69. Pawluski JL, Li M, Lonstein JS. Serotonin and motherhood: From molecules to mood. *Front Neuroendocrinol*. 2019; 53:100742.
70. Ala M. Tryptophan metabolites modulate inflammatory bowel disease and colorectal cancer by affecting immune system. *Int Rev Immunol*. 2022; 41(3):326-345.
71. Hubková B, Valko-Rokytovská M, Čižmárová B, Zábavníková M, Mareková M, Birková A. Tryptophan: Its Metabolism along the Kynurenine, Serotonin, and Indole Pathway in Malignant Melanoma. *Int J Mol Sci*. 2022; 15;23(16):9160.
72. Siddiqui EJ, Shabbir M, Mikhailidis DP, Thompson CS, Mumtaz FH. The role of serotonin (5-hydroxytryptamine_{1A} and _{1B}) receptors in prostate cancer cell proliferation. *J Urol*. 2006;176(4 Pt 1):1648-1653.
73. Dizeyi N, Hedlund P, Bjartell A, Tinzl M, Austild-Taskén K, Abrahamsson PA. Serotonin activates MAP kinase and PI3K/Akt signaling pathways in prostate cancer cell lines. *Urol Oncol*. 2011;29(4):436-445.
74. Cattaneo MG, Fesce R, Vicentini LM. Mitogenic effect of serotonin in human small cell lung carcinoma cells via both 5-HT_{1A} and 5-HT_{1D} receptors. *Eur J Pharmacol*. 1995;291(2):209-211.
75. Atae R, Ajdary S, Zarrindast M, Rezayat M, Hayatbakhsh MR. Anti-mitogenic and apoptotic effects of 5-HT_{1B} receptor antagonist on HT29 colorectal cancer cell line. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(10):1461-1469.

76. Sonier B, Arseneault M, Lavigne C, Ouellette RJ, Vaillancourt C. The 5-HT_{2A} serotonergic receptor is expressed in the MCF-7 human breast cancer cell line and reveals a mitogenic effect of serotonin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(4):1053-1059.
77. Soll C, Jang JH, Riener MO, et al. Serotonin promotes tumor growth in human hepatocellular cancer. *Hepatology*. 2010;51(4):1244-1254.
78. Soll C, Riener MO, Oberkofler CE, et al. Expression of serotonin receptors in human hepatocellular cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):5902-5910.
79. Dizeyi N, Hedlund P, Bjartell A, Tinzl M, Austild-Taskén K, Abrahamsson PA. Serotonin activates MAP kinase and PI3K/Akt signaling pathways in prostate cancer cell lines. *Urol Oncol*. 2011;29(4):436-445.
80. Asada M, Ebihara S, Yamanda S, et al. Depletion of serotonin and selective inhibition of 2B receptor suppressed tumor angiogenesis by inhibiting endothelial nitric oxide synthase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Neoplasia*. 2009;11(4):408-417.
81. Yildiz O, Smith JR, Purdy RE. Serotonin and vasoconstrictor synergism. *Life Sci*. 1998; 62(19):1723-32.
82. Valente EEL, Harmon DL, Klotz JL. Influence of Prolonged Serotonin and Ergovaline Pre-Exposure on Vasoconstriction Ex Vivo. *Toxins (Basel)*. 2021; 23;14(1):9.
83. Houston DS, Vanhoutte PM. Serotonin and the vascular system. Role in health and disease, and implications for therapy. *Drugs*. 1986 Feb;31(2):149-63.
84. Sui H, Xu H, Ji Q, et al. 5-hydroxytryptamine receptor (5-HT_{1DR}) promotes colorectal cancer metastasis by regulating Axin1/ β -catenin/MMP-7 signaling pathway. *Oncotarget*. 2015;6(28):25975-25987.
85. Gurbuz N, Ashour AA, Alpay SN, Ozpolat B. Down-regulation of 5-HT_{1B} and 5-HT_{1D} receptors inhibits proliferation, clonogenicity and invasion of human pancreatic cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(9):e110067.
86. Wu W, Li Q, Zhu Z, et al. HTR1D functions as a key target of HOXA10-AS/miR-340-3p axis to promote the malignant outcome of pancreatic cancer via PI3K-AKT signaling pathway. *Int J Biol Sci*. 2022;18(9):3777-3794.

87. Jin X, Li H, Li B, Zhang C, He Y. Knockdown and inhibition of hydroxytryptamine receptor 1D suppress proliferation and migration of gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2022;620:143-149.
88. Zuo X, Chen Z, Cai J, et al. 5-Hydroxytryptamine Receptor 1D Aggravates Hepatocellular Carcinoma Progression Through FoxO6 in AKT-Dependent and Independent Manners. *Hepatology.* 2019;69(5):2031-2047.
89. Zhang YY, Mao MH, Han ZX. Identification of a Gene Prognostic Signature for Oral Squamous Cell Carcinoma by RNA Sequencing and Bioinformatics. *Biomed Res Int.* 2021;2021:6657767.
90. Zeng C, Chen Y. HTR1D, TIMP1, SERPINE1, MMP3 and CNR2 affect the survival of patients with colon adenocarcinoma. *Oncol Lett.* 2019;18(3):2448-2454.
91. Ching-López A, Cervilla J, Rivera M, et al. Epidemiological support for genetic variability at hypothalamic-pituitary-adrenal axis and serotonergic system as risk factors for major depression. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015; 11:2743-2754.
92. Wigner P, Czarny P, Synowiec E, et al. Association between single nucleotide polymorphisms of TPH1 and TPH2 genes, and depressive disorders. *J Cell Mol Med.* 2018;22(3):1778-1791.
93. International Hapmap 3 Consortium, Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Altshuler, DM, Gibbs RA, et al. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature.* 2010; 467(7311):52-8.
94. Ottenhof KW, Sild M, Lévesque ML, Ruhé HG, Booij L. TPH2 polymorphisms across the spectrum of psychiatric morbidity: A systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev.* 2018; 92:29-42.
95. Liu ZL, Wang XQ, Liu MF, Ye BJ. Meta-analysis of association between TPH2 single nucleotide polymorphism and depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 2022; 134:104517.
96. Chen GL, Vallender EJ, Miller GM. Functional characterization of the human TPH2 5' regulatory region: untranslated region and polymorphisms modulate gene expression in vitro. *Hum Genet.* 2008;122(6):645-57.
97. Middeldorp CM, Landt MCT, Medland SE, Beijsterveldt SEMV, Bartels M, Willemsen G, et al. Anxiety and depression in children and adults: influence of serotonergic and neurotrophic genes?. *Genes Brain Behav.* 2010; 9(7):808-16.

98. Beiguelman B. Dinâmica dos genes nas famílias e populações. 2 ed. Ribeirão Preto: SBG; 1995. p.1-472.
99. Freedman AN, Michalek AM, Marshall JR, Mettlin CJ, Petrelli NJ, Zhang ZF, et al. The relationship between smoking exposure and p53 overexpression in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1996; 73(8):902-8.
100. Carron J, Costa APD, Rinck-Junior JA, et al. Role of a genetic variation in the microRNA-4421 binding site of ERP29 regarding risk of oropharynx cancer and prognosis. *Sci Rep*. 2020;10(1):17039.
101. Edge SB, Byrd DR, Compton CC. editors. American Joint Committee on Cancer: Cancer Staging Manual. 7 ed. New York: Springer; 2010. p.21-97.
102. Mendenhall WM, Werning JW, Pfister DG. Treatment of head and neck cancers. In: De Vita VT, Lawrence TS, Rosemberg SA. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 9 ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2011. p.729-80.
103. Abecasis GA, Altshuler D, Auton A, Brooks LD. The 1000 Genomes Project Consortium. A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature*. 2010; 467:1061–73.
104. Woodhead JL, Fallon R, Figueredo H, Langdale J, Malcom ADB. Alternative methodology of gene diagnosis. In: Davies KE. *Human genetic diseases: a practical approach*. Oxford: IRL Press Limited; 1986. p.51-64.
105. Zuo C, Shin S, Keleş S. atSNP: transcription factor binding affinity testing for regulatory SNP detection. *Bioinformatics*. 2015; 15;31(20):3353-5.
106. Linck E, Battey CJ. Minor allele frequency thresholds dramatically affect population structure inference with genomic datasets. *Mol Ecol Resour*. 2019;19(3):639-647.

ANEXOS

Anexo1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Influência de variantes genéticas em moduladores da serotonina no risco e prognóstico de pacientes com câncer de orofaringe

Pesquisador: Gustavo Jacob Lourenço

Área Temática: Genética Humana:

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

Versão: 5

CAAE: 15054219.8.0000.5404

Instituição Proponente: Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.399.521

Apresentação do Projeto:

Solicitação de emenda ao projeto original.

Segundo o documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1589201_E1.pdf 21/10/2020 : Justificativa da Emenda: Venho por meio desta solicitar a emenda para avaliação adicional dos polimorfismos TPH1 rs623580, TPH2 rs4570625 e 5-HTR1D rs674386 no projeto intitulado "Influência de variantes genéticas em moduladores da serotonina no risco e prognóstico de pacientes com câncer de orofaringe" aprovado sob o número do parecer: 3.449.210 e CAAE: 15054219.8.0000.5404. O empréstimo de 55 paciente e 55 controles irá completar o total de 510 participantes. Vale comentar que os demais pacientes e controles já foram submetidos a ligação e posterior aprovação.

Objetivo da Pesquisa:

Inclusão de um objetivo secundário:

Objetivos secundário 1) Verificar se os distintos genótipos (homozigoto selvagem, heterozigoto, homozigoto variante) dos referidos SNPs influenciam o risco de ocorrência do CCEOF em 255 pacientes e 255 controles, os aspectos clínicos dos pacientes (sexo, cor da pele, hábitos do tabagismo e do etilismo) e as características do tumor (localização, grau de diferenciação e estágio

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.399.521

TNM).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Inalterados

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O empréstimo com posterior devolução de 55 amostras de pacientes com câncer de orofaringe armazenadas no Biorrepositório projeto "Análise funcional de genes polimórficos em carcinoma de células escamosas de orofaringe" (CAAE: 48904215.8.0000.5404) e 55 de indivíduos saudáveis (controles) armazenadas no Biorrepositório do projeto "Influência de polimorfismos na via TNFR2 na susceptibilidade e prognóstico de pacientes com melanoma cutâneo" (CAAE nº: 02607118.9.0000.5404) para o desenvolvimento do projeto completará o tamanho amostral do estudo (n= 502).

Vale comentar que a pesquisadora responsável pelo projeto Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz realizará ligações via Skype solicitando a autorização dos participantes. Além disso, as referidas informações foram incluídas (tarja amarela) na nova versão do projeto.

Há pesquisadores em comum em todos os projetos citados, garantindo que os dados dos participantes não serão encaminhados a pesquisadores que não fizeram parte do estudo inicial.

Vale comentar que todas as amostras que serão utilizadas no estudo já se encontram armazenadas no biorrepositório do Laboratório de Genética do Câncer (LAGECA) da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP, vinculadas aos projetos de pesquisa que estão em andamento: CAAE: 48904215.8.0000.5404, 90922518.1.0000.5404 e 02607118.9.0000.5404. O armazenamento das referidas amostras foi aprovado anteriormente pelo CEP da PRP da UNICAMP. Frente ao exposto, solicitamos o compartilhamento das amostras para a execução do nosso estudo. Assim, será necessário obter o consentimento livre e esclarecido dos 255 pacientes e 255 controles oralmente. As entrevistas serão realizadas por telefone. Para isto, será utilizado um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os pacientes (anexo 5) e um TCLE para os controles (anexo 6) que serão lidos para os indivíduos que serão convidados a participar do estudo. Depois disso, será dada a oportunidade para que os indivíduos façam perguntas e esclareçam dúvidas. Quando o indivíduo se considerar satisfeito com as informações e esclarecimentos recebidos, lhe será perguntado se aceita participar do estudo e se formalizará o seu consentimento de forma oral, o que será gravado. Vale comentar que somente a aluna de mestrado Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz terá acesso ao nome dos pacientes e dos controles e de seus respectivos telefones para convidá-los a participar do estudo. A participação na pesquisa desses indivíduos

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.399.521

não envolve riscos previsíveis, no entanto eles poderão sentir um desconforto em responder as 15 perguntas. Caso isso ocorra, o indivíduo poderá avisar a entrevistadora e se desejar, encerrar a entrevista. Para os indivíduos que evoluíram ao óbito e para aqueles com perda de seguimento clínico, sem a possibilidade de contato telefônico, solicitamos a dispensa da aplicação do TCLE ao CEP da PRP da UNICAMP.

Características clínicas

Os dados relativos a identificação, a idade, ao gênero, a cor da pele, ao hábito de fumar e ao etilismo foram coletados de pacientes e controles por meio de questionário específico aplicado pelos pesquisadores responsáveis pelo estudo. Ressaltando que esses dados foram obtidos através dos estudos anteriores (CAAE: 48904215.8.0000.5404, 90922518.1.0000.5404 e 02607118.9.0000.5404), sendo que serão usados no atual estudo mediante aprovação do CEP e autorização dos pacientes e controles.

Tamanho da Amostra no Brasil: 510.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Para a presente versão:

- Solicitacao_Emenda.pdf 08/11/2020: com destaque nas novas amostras.
- Projeto_Mestrado.pdf 08/11/2020 : com destaque nas alterações da emenda.
- TCLE_pacientes_emenda.pdf 08/11/2020 :
- TCLE_controle_emenda.pdf 08/11/2020 :

Recomendações:

Os projetos citados para utilização de material biológico não apresentam relatório de acompanhamento ao CEP como solicitado nos pareceres de aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em consideração ao parecer anterior de 07 de Novembro de 2020, Número do Parecer: 4.384.634:

- Apresenta TCLE para o novo grupo de participante.
- Atualiza PB.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
 Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887
 UF: SP Município: CAMPINAS
 Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.399.521

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa.
- Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.
- Relatórios parciais semestrais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.
- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".
- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_158920_1_E1.pdf	08/11/2020 16:40:35		Aceito

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.399.521

Outros	Solicitacao_Emenda.pdf	08/11/2020 16:38:28	Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Mestrado.pdf	08/11/2020 16:37:30	Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pacientes_emenda.pdf	08/11/2020 16:34:00	Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controle_emenda.pdf	08/11/2020 16:33:41	Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz	Aceito
Parecer Anterior	Aceitecontroles.pdf	21/10/2020 10:24:15	Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_controle.pdf	17/09/2019 09:29:45	Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_pacientes.pdf	17/09/2019 09:29:37	Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz	Aceito
Outros	Compartilhamento_pacientes_pdf.pdf	20/08/2019 16:34:03	Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	28/05/2019 14:15:28	GABRIELA SOUZA RODRIGUES DE QUEIROZ	Aceito
Outros	TCLE_antigo_pacientes.pdf	28/05/2019 14:11:47	GABRIELA SOUZA RODRIGUES DE QUEIROZ	Aceito
Outros	Compartilhamento_controles.pdf	28/05/2019 14:07:22	GABRIELA SOUZA RODRIGUES DE QUEIROZ	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126

Bairro: Barão Geraldo

CEP: 13.083-887

UF: SP

Município: CAMPINAS

Telefone: (19)3521-8936

Fax: (19)3521-7187

E-mail: cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 4.399.521

CAMPINAS, 15 de Novembro de 2020

Assinado por:
Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Anexo 2

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Pacientes)

Título da pesquisa: Influência de variantes genéticas em moduladores da serotonina no risco e prognóstico de pacientes com câncer de orofaringe

Nomes dos responsáveis: Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz e Gustavo Jacob Lourenço

Número do CAAE: 15054219.8.0000.5404

Entrevista com paciente por meio de telefone

O(A) senhor(a) participou anteriormente da pesquisa sobre análise de polimorfismos genéticos e o risco de desenvolvimento de câncer de cabeça e pescoço. Neste momento, estamos realizando uma nova pesquisa que tem como objetivo avaliar variações genéticas em moduladores da serotonina, relacionada ao desenvolvimento tumoral. Gostaria de convidá-lo(a) a participar como voluntário(a) desta nova pesquisa. Eu vou ler um documento chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que visa assegurar seus direitos como participante e que tem informações sobre a pesquisa e no que consiste a sua participação, para que o(a) senhor(a) possa decidir se deseja ou não participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se o(a) senhor(a) não aceitar participar ou retirar sua autorização a qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

Esta pesquisa tem como objetivo investigar variantes genéticas envolvidas com a produção e a captação da serotonina, que foi relacionada com o desenvolvimento tumoral. Será estudado uma predisposição pessoal para o desenvolvimento do câncer de orofaringe por meio da análise de segmentos de DNA. Este estudo poderá ajudar a melhorar o entendimento sobre esse tipo de câncer e contribuir para o melhor entendimento sobre a relação da genética e o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço.

Procedimentos:

- 1) Se o(a) senhor(a) aceitar participar desta pesquisa, será entrevistado(a), por telefone via Skype, um programa que nos permite ligar diretamente no seu telefone e/ou celular e gravar a entrevista mediante a sua autorização. A entrevista será realizada em data e horário que lhe for mais conveniente. Durando aproximadamente 10 minutos e será realizada por uma entrevistadora que foi especialmente treinada para isto. Serão feitas perguntas sobre sua doença e hábitos pessoais.
- 2) Antes de iniciar a entrevista, a entrevistadora perguntará se o(a) senhor(a) aceita participar da pesquisa e se autoriza gravar a entrevista.
- 3) Informamos ao senhor(a) que após sua autorização, alguns dados já coletados anteriormente, como data de nascimento, idade, sexo, cor de pele, hábitos de tabagismo e etilismo serão novamente utilizados no atual estudo, assim como, os dados obtidos do prontuário referidos a data do diagnóstico, sítio, região do tumor, estadiamento, estágio do tumor e grau de diferenciação celular.
- 4) Seu nome não será registrado junto com a gravação da entrevista, para que não seja possível identificá-la. Para isto, o(a) senhor(a) será identificado(a) somente por um número. Ninguém, além da equipe da pesquisa, terá acesso à gravação. Quando os resultados da pesquisa forem apresentados, a identidade das pessoas que participaram da pesquisa nunca será revelada.
- 5) O(A) senhor(a) pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, ou pode deixar de responder a qualquer pergunta, sem que isso lhe cause qualquer tipo de prejuízo.

Desconfortos e riscos:

A sua participação nesta pesquisa não envolve nenhum tipo de risco previsível, no entanto o(a) senhor(a) poderá sentir um desconforto em responder as perguntas durante a entrevista. Caso isso ocorra, poderá avisar a entrevistadora e se desejar encerrar a entrevista.

Benefícios:

Participando da pesquisa o(a) senhor(a) não terá nenhum benefício direto, porém acreditamos que os resultados deste estudo poderão contribuir para o melhor entendimento sobre a relação da genética com o câncer de cabeça e pescoço.

Sigilo e privacidade:

O(A) senhor(a) tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado. As entrevistas serão armazenadas em local seguro e somente a equipe de pesquisa terá acesso a esse material. Após cinco anos as entrevistas serão destruídas.

Ressarcimento e indenização:

O(A) senhor(a) não receberá nenhum tipo de ressarcimento pela participação nesta pesquisa porque a entrevista será realizada por telefone. O(A) senhor(a) terá a garantia ao direito de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Contato:

O(A) senhor(a) pode fazer perguntas, pedir esclarecimentos sobre esta pesquisa sempre que quiser. Para isto, pode contatar o pesquisador responsável pelo estudo que é o Dr. Gustavo Jacob Lourenço pelo telefone (19) 3521-9120 ou a pesquisadora Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz pelo telefone (19) 3521-8695 de segunda à sexta-feira das 8:30 às 17:30 horas. Caso tenha alguma reclamação sobre os aspectos éticos desta pesquisa, pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas, das 8:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs, situado à Rua Tessália Vieira de Camargo, 126; Distrito de Barão Geraldo, Campinas, SP, CEP: 13083-887; telefones (19) 3521-8936 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

Responsabilidade do pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da Resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e esclarecido todas as dúvidas. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar:

1) O(A) senhor(a) aceita participar da pesquisa?

[1] SIM

[2] NÃO → AGRADEÇA E ENCERRE

2) Podemos fazer a entrevista agora?

[1] SIM (IR PARA 4)

[2] NÃO (IR PARA 3)

3) Podemos agendá-la para quando?

4) Posso gravar a entrevista?

[1] SIM

[2] NÃO → AGRADEÇA E ENCERRE A ENTREVISTA

Anexo 3

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Controles)

Título da pesquisa: Influência de variantes genéticas em moduladores da serotonina no risco e prognóstico de pacientes com câncer de orofaringe

Nomes dos responsáveis: Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz e Gustavo Jacob Lourenço

Número do CAAE: 15054219.8.0000.5404

Entrevista com controle por meio de telefone

O(A) senhor(a) participou anteriormente como voluntário da pesquisa “Influência de polimorfismo no gene PDCC1, regulador da atividade linfocitária, na expressão gênica e na suscetibilidade ao melanoma cutâneo”. Neste momento, estamos realizando uma nova pesquisa que tem como objetivo avaliar variações genéticas em moduladores da serotonina, relacionada ao desenvolvimento tumoral. Gostaria de convidá-lo(a) a participar como voluntário(a) desta nova pesquisa. Eu vou ler um documento chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido que visa assegurar seus direitos como participante e que tem informações sobre a pesquisa e no que consiste a sua participação, para que o(a) senhor(a) possa decidir se deseja ou não participar. Não haverá nenhum tipo de penalização ou prejuízo se o(a) senhor(a) não aceitar participar ou retirar sua autorização a qualquer momento.

Justificativa e objetivos:

Esta pesquisa tem como objetivo investigar variantes genéticas envolvidas com a produção e a captação da serotonina, que foi relacionada com o desenvolvimento tumoral. Será estudado uma predisposição pessoal para o desenvolvimento do câncer de orofaringe por meio da análise de segmentos de DNA. Este estudo poderá ajudar a melhorar o entendimento sobre esse tipo de câncer e contribuir para o melhor entendimento sobre a relação da genética e o desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço.

Procedimentos:

- 1) Se o(a) senhor(a) aceitar participar desta pesquisa, será entrevistado(a), por telefone via Skype, um programa que nos permite ligar diretamente no seu telefone e/ou celular e gravar a entrevista mediante a sua autorização. A entrevista será realizada em data e horário que lhe for mais conveniente. Durando aproximadamente 10 minutos e será realizada por uma entrevistadora que foi especialmente treinada para isto. Serão feitas perguntas sobre sua doença e hábitos pessoais.
- 2) Antes de iniciar a entrevista, a entrevistadora perguntará se o(a) senhor(a) aceita participar da pesquisa e se autoriza gravar a entrevista.
- 3) Informamos ao senhor(a) que após sua autorização, alguns dados já coletados anteriormente, como data de nascimento, idade, sexo, cor de pele, hábitos de tabagismo e etilismo serão novamente utilizados no atual estudo.
- 4) Seu nome não será registrado junto com a gravação da entrevista, para que não seja possível identificá-la. Para isto, o(a) senhor(a) será identificado(a) somente por um número. Ninguém, além da equipe da pesquisa, terá acesso à gravação. Quando os resultados da pesquisa forem apresentados, a identidade das pessoas que participaram da pesquisa nunca será revelada.
- 5) O(A) senhor(a) pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, ou pode deixar de responder a qualquer pergunta, sem que isso lhe cause qualquer tipo de prejuízo.

Desconfortos e riscos:

A sua participação nesta pesquisa não envolve nenhum tipo de risco previsível, no entanto o(a) senhor(a) poderá sentir um desconforto em responder as perguntas durante a entrevista. Caso isso ocorra, poderá avisar a entrevistadora e se desejar encerrar a entrevista.

Benefícios:

Participando da pesquisa o(a) senhor(a) não terá nenhum benefício direto, porém acreditamos que os resultados deste estudo poderão contribuir para o melhor entendimento sobre a relação da genética com o câncer de cabeça e pescoço.

Sigilo e privacidade:

O(A) senhor(a) tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e nenhuma informação será dada a outras pessoas que não façam parte da equipe de pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, seu nome não será citado. As entrevistas serão armazenadas em local seguro e somente a equipe de pesquisa terá acesso a esse material. Após cinco anos as entrevistas serão destruídas.

Ressarcimento e indenização:

O(A) senhor(a) não receberá nenhum tipo de ressarcimento pela participação nesta pesquisa porque a entrevista será realizada por telefone. O(A) senhor(a) terá a garantia ao direito de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.

Contato:

O(A) senhor(a) pode fazer perguntas, pedir esclarecimentos sobre esta pesquisa sempre que quiser. Para isto, pode contatar o pesquisador responsável pelo estudo que é o Dr. Gustavo Jacob Lourenço pelo telefone (19) 3521-9120 ou a pesquisadora Gabriela Souza Rodrigues de Queiroz pelo telefone (19) 3521-8695 de segunda à sexta-feira das 8:30 às 17:30 horas. Caso tenha alguma reclamação sobre os aspectos éticos desta pesquisa, pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas, das 8:30hs às 11:30hs e das 13:00hs as 17:00hs, situado à Rua Tessália Vieira de Camargo, 126; Distrito de Barão Geraldo, Campinas, SP, CEP: 13083-887; telefones (19) 3521-8936 3521-7187; e-mail: cep@fcm.unicamp.br.

Responsabilidade do pesquisador:

Asseguro ter cumprido as exigências da Resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e esclarecido todas as dúvidas. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos

nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Consentimento livre e esclarecido:

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e o incômodo que esta possa acarretar:

1) O(A) senhor(a) aceita participar da pesquisa?

[1] SIM

[2] NÃO → AGRADEÇA E ENCERRE

2) Podemos fazer a entrevista agora?

[1] SIM (IR PARA 4)

[2] NÃO (IR PARA 3)

3) Podemos agendá-la para quando?

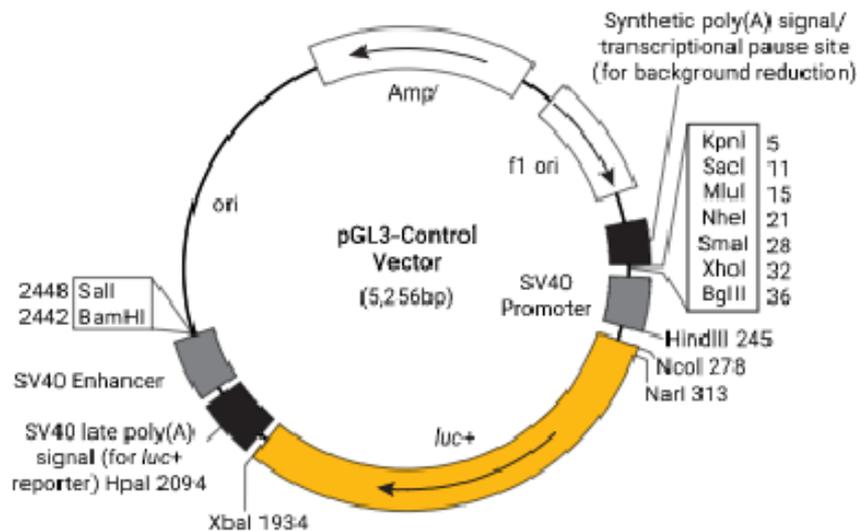
4) Posso gravar a entrevista?

[1] SIM

[2] NÃO → AGRADEÇA E ENCERRE A ENTREVISTA

Anexo 5

Mapa do vetor pGL3-Basic (Promega®, Estados Unidos)



Base pairs	4818 bases
Promoter	(none)
Enhancer	(none)
Multiple cloning region	1-58
Luciferase gene (luc ⁺)	88-1740
GLprimer2 binding site	89-111
SV40 late poly(A) signal	1772-1993
RVprimer4 binding site	2061-2080
ColE1-derived plasmid replication origin	2318
beta-lactamase gene (Amp ^r)	3080-3940
f1 origin	4072-4527
Synthetic (upstream) poly(A) signal	4658-4811
RVprimer3 binding site	4760-4779

ORIGINAL ARTICLE

Influence of variants in serotonin modulating genes on the risk, aggressiveness, and prognosis of oropharynx cancer

Gabriela Souza Rodrigues Queiroz MSc¹ | Juliana Carron PhD¹ |
Ligia Traldi Macedo MD² | Carmen Silvia Passos Lima PhD^{1,2}  |
Gustavo Jacob Lourenço PhD¹ 

¹Laboratory of Cancer Genetics, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

²Department of Anesthesiology, Oncology, and Radiology, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

Correspondence

Gustavo Jacob Lourenço, Laboratory of Cancer Genetics, School of Medical Sciences, University of Campinas, 50 Vital Brasil Street, Barão Geraldo, Campinas, São Paulo, Brazil.
Email: guslour@unicamp.br

Abstract

Background: Serotonin (5-HT) is involved in regulating tumor growth, as well as psychiatric disorders. It is synthesized by tryptophan hydroxylase (TPH) and acts through 5-HT receptors (HTRs). Single-nucleotide variations (SNVs) in *TPH1* rs623580 (T>A), *TPH2* rs4570625 (G>T), and *HTR1D* rs674386 (G>A) may affect 5-HT levels. However, the effect of these SNVs on oropharynx carcinoma (OPC) is unknown.

Methods: DNA from 251 patients with OPC and 254 controls was analyzed by RT-PCR. Transcriptional activity of *TPH1* rs623580 and *HTR1D* rs674386 was studied by luciferase assays. Multivariate statistical tests were utilized to evaluate group differences and survival outcomes.

Results: *TPH1* TT was more frequent in patients than in controls (OR: 1.56, $p = 0.03$). Patients with *HTR1D* GG/GA showed invasive tumors ($p = 0.01$) and shorter survival (HR: 1.66, $p = 0.04$). *TPH1* TT (0.79-fold, $p = 0.03$) and *HTR1D* GG (0.64-fold, $p = 0.008$) presented lower transcriptional activity.

Conclusion: Our data suggest that SNVs in 5-HT modulating genes can influence OPC.

KEYWORDS

aggressiveness, oropharynx cancer, prognosis, risk, serotonin, single-nucleotide variant

1 | INTRODUCTION

Oropharynx (OP) squamous cell carcinoma (SCC) is a significant contributor to morbidity and mortality.¹ In 2020, it was estimated that there were over 98 000 cases of oropharynx cancer.² Smoking and alcohol consumption³ as well as infection by human papillomavirus (HPV)⁴ have been established as the key risk factors for OPSCC.

Serotonin, also known as 5-hydroxytryptamine (5-HT), is a multifunctional molecule that has properties of both a neurotransmitter and a hormone in the central

nervous system and peripheral circulation, respectively.⁵ While the study of 5-HT has traditionally focused on its role in regulating mood and behavior, its significance in cancer biology has become increasingly recognized.^{5,6}

5-HT has been implicated in the development and progression of various types of cancer, including prostate,^{7,8} bladder,⁹ lung,¹⁰ colorectal,¹¹ breast,¹² and hepatocellular carcinoma.^{13,14} Studies have shown that stimulation of tumor cells by 5-HT leads to the activation of oncogenic signaling pathways, such as the PI3K/Akt and MAPK pathways, which contribute to tumor growth, invasion, and metastasis.^{6,8,15} However, other studies

have reported that 5-HT could inhibit tumor growth, primarily via the vasoconstrictive effects of 5-HT on tumor vessels.¹⁶ These findings suggest that the role of 5-HT in tumor growth is concentration-dependent and tissue-specific.^{6,17}

5-HT is synthesized from tryptophan through a two-step process catalyzed by the enzymes tryptophan hydroxylase (TPH) and decarboxylase.⁶ Recent research has shown that TPH1 contributes to the regulation of cellular proliferation, migration, and chemoresistance in glioma cells through its involvement in the NF- κ B signaling.¹⁸

The effects of 5-HT are mediated through several 5-HT receptors (HTRs).⁶ HTR subtypes have been implicated in the progression of specific solid tumors,^{17,19} with the HTR1D overexpressed in head and neck tumors.^{15,20} Activation of HTR1D has been shown to promote lung metastasis of colorectal cancer through the axin1/ β -catenin/MMP7 pathway,²¹ increase tumor proliferation in pancreatic^{22,23} and gastric cancer cells,²⁴ and inhibit apoptosis of pancreatic cancer cell lines via PI3K-Akt signaling pathway.²³

The prognostic value of *HTR1D* expression has been demonstrated in specific cancer types, with low expression predicting a worse outcome in colorectal cancer,²⁵ while upregulation has been associated with poor overall survival in hepatocellular carcinoma²⁶ and oral SCC.²⁰

Single-nucleotide variants (SNVs) in 5-HT modulator genes, including *TPH1* (gene ID 7166), *TPH2* (gene ID 121278), and *HTR1D* (gene ID 3352), have been shown to impact 5-HT levels^{27,28} and have been linked to behavioral and psychological symptoms.^{29,30}

SNVs located in the 5'-flanking region (regulatory region) of a gene can impact gene expression and may play a role in the development of OPSCC.¹ *TPH1* rs623580, *TPH2* rs4570625, and *HTR1D* rs674386 are SNVs in this region that have the potential to alter the function of regulatory elements and influence gene transcription.^{27,28}

The A allele of *TPH1* rs623580 (T>A)^{31,32} and the T allele of *TPH2* rs4570625 (G>T)^{30,32,33} have been associated to depressive disorders, while the A allele of *HTR1D* rs674386 (G>A) has been linked to anorexia nervosa.³⁴ The T allele of *TPH2* rs4570625 has been shown to reduce *TPH2* expression.^{27,28} However, the functional effects of *TPH1* rs623580 and *HTR1D* rs674386 are still unknown.

Despite this, the potential impact of these SNVs on cancer development and progression, including OPSCC, is yet to be studied. Thus, we hypothesize that these SNVs in the genes regulating the 5-HT system may affect the risk, progression, and outcome of OPSCC. To the best of our knowledge, this investigation is the first study to explore this hypothesis.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study population

This retrospective study included 251 patients with OPSCC who attended the Clinical Oncology Service of the University Hospital between March 2002 and August 2016. The control sample included 254 blood donor volunteers recruited from the Hematology and Hemotherapy Center of our University in the same period. Our University's Institutional Research Ethical Committee approved the study (reference number: 15054219.8.0000.5404). Our study followed the ethical guidelines of the Declaration of Helsinki. All participants signed informed consent.

All participants afforded age, sex (female or male), and tobacco habits (no smoker, active, or former smoker). For patients, the World Health Organization and the TNM system criteria of the American Joint Committee of Cancer Staging assessed the diagnosis and tumor stage, respectively.³⁵ P16 immunohistochemistry and in situ hybridization were performed in tumor fragments, aiming to test the presence of human papillomavirus type 16 (HPV 16).¹

Our survival analysis included 245 patients. Six of our patients searched for other treatment services and no consistent clinical information could be obtained. The treatment protocol included surgery, chemotherapy (CT) based on cisplatin (80–100 mg/m²) or carboplatin (area under the curve), and radiation therapy (RT) (35 sessions, 2 Gy per session).¹ Medical records provided information on treatment and follow-up data. The end of the follow-up period was March 2022.

2.2 | Selection of SNVs

The *TPH1* rs623580, *TPH2* rs4570625, and *HTR1D* rs674386 SNVs were chosen using the University of California Santa Cruz (UCSC) Genome Browser Database (genome.ucsc.edu). Searches were conducted based on the following criteria: SNVs location at the 5'-flanking region, a minor allele frequency of 0.20 or greater in the 1000 Genomes Project combined population,³⁶ and those previously published in the literature (Table S1, Supporting Information).

2.3 | Genotyping

DNA was isolated from the leukocytes of all participants. The genotypes of studied SNVs were obtained by polymerase chain reaction using TaqMan[®] assays

(rs623580: C_2645676_10, rs4570625: C_226207_10, and rs674386: C_3278318_10; Applied Biosystems), according to manufacturer's instructions. For quality control, 10% of the samples were genotyped twice in two independent reactions.

2.4 | Transcriptional activity

Due to a significant result obtained, we examine whether SNVs rs623580 and rs674386 modulate the transcription activity of *TPH1* and *HTR1D*, respectively, using luciferase reporter gene assay in the human pharyngeal SCC cell line (FaDu) purchased from the American Type Culture Collection (ATCC, HTB-43).

2.5 | FaDu cell line

The FaDu was cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Gibco) supplemented by fetal bovine serum (FBS) (10%) and penicillin–streptomycin (100 µg/mL) (Sigma–Aldrich) in an incubator at 37°C with a humidified atmosphere and 5% CO₂. All cells were free of mycoplasma. Tandem repeat analysis validated the FaDu cells.

2.6 | Construction of plasmids

The 5'-flanking region of *TPH1* rs623580_T (ancestral allele) and rs623580_A (variant allele) DNA of individuals with known *TPH1* TT and AA genotypes, respectively, were amplified by nested-PCR using 2U of Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Scientific) and specific primers (forward: 5'-AGCAACTTTTCCA CATGTTT-3' and reverse: 5'-GAAAAGAAGGGACACT GAGATC-3') to obtain fragments with 867 base pairs (bps). After, the obtained fragments were amplified by PCR using 2U of Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Thermo Scientific) and specific primers with restriction site for *NheI* (forward: 5'-CCTGCTAGCGTGT TAATTATCC-3', where the *NheI* site is underlined) and *XhoI* (reverse: 5'-CCCTCGAGAAGTGACCATTTTC-3'; where the *XhoI* site is underlined) to obtain fragments with 376 bps. Fragments were inserted into the *NheI* and *XhoI* cloning sites in the pGL3-basic luciferase reporter vector (Promega) by sticky-end ligation. Fragments were placed upstream of the firefly luciferase reporter gene. Plasmids were transformed into DH5α competent *Escherichia coli* cells (Invitrogen). The sequence and cloning orientation in the pGL3 vector was determined via direct sequencing. After procedures, the plasmids pGL3_rs623580_T and pGL3_rs623580_A were obtained.

Similarly, the 5'-flanking regions of *HTR1D* rs674386_G (ancestral allele) and rs674386_A (variant allele) DNA were amplified from individuals with *HTR1D* TT and AA genotypes, respectively, using PCR with specific primers containing restriction sites for *KpnI* (forward: 5'-CCCGGTACCTTCATGCTCACTA-TAG-3'; where the *KpnI* site is underlined) and *XhoI* (reverse: 5'-CCCCCTCGAGTTCTAAAAAGTATCAG-3', where the *XhoI* site is underlined). The resulting fragments of 318-bp fragments were then inserted into the *KpnI* and *XhoI* cloning sites in the pGL3-basic luciferase reporter vector using the same method described above. Subsequently, the plasmids pGL3_rs674386_G and pGL3_rs674386_A were generated.

2.7 | Dual-luciferase reporter assay

FaDu cells were transiently transfected with the obtained plasmids, empty pGL3-basic vector, and Renilla luciferase control reporter (pRL) (normalizing control) (Promega) using Lipofectamine 3000 (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. FaDu cells (1×10^5) were seeded in 12 well plates with DMEM medium 24 h prior to transfection. In summary, cells were transfected in three different groups in each assay: 500 ng of constructed pGL3 (pGL3_rs623580_T or pGL3_rs674386_G) co-transfected with 50 ng of pRL and 500 ng of constructed pGL3 (pGL3_rs623580_A or pGL3_rs674386_A) co-transfected with 50 ng of pRL.

Cells were harvested 48 h after transfection and luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase Reporter Assay System kit (Promega), according to the manufacturer's instructions. Relative firefly luciferase activity was normalized to the pRL vector activity. Assays were performed in triplicate, repeated, and included a negative control in each reaction.

2.8 | Transcription factor binding motif analysis

The predicted binding scores of transcription factors (TFs) were calculated using atSNP (atsnp.biostat.wisc.edu). atSNP tested the impact of SNVs on TF binding motifs in the human genome.³⁷ The significance of changes in TF binding was determined by comparing the binding affinity of the TF for motifs that contained either the ancestral allele or the variant allele. The atSNP search calculates the *p*-value of the log-rank statistic evaluated at the best motif matches with both alleles, referred to as the *p*-value impact, and a *p*-value impact below or equal to 0.001 was considered significant.³⁷ The results were represented as

log odds scores. TFs with no known expression in head neck tissues were excluded from the analysis.

2.9 | Statistical analysis

The Hardy–Weinberg (HW) equilibrium was tested using the chi-square (χ^2) statistics for the goodness-of-fit test.

Comparison of groups (bivariate analysis) was performed by *t* test and χ^2 or Fisher's exact test. Multivariate analysis using logistic regression model (backward method) served to obtain age, sex, and tobacco status adjusted crude odds ratios (ORs) with 95% confidence intervals (CI), and to assess associations between genotypes and OPSCC. The statistical power was obtained by the G*Power tool (gpower.hhu.de).

For survival analysis, the event-free survival (EFS) was calculated from the date of diagnosis until the date of progression of disease, the first relapse, death by disease, or the last follow-up. Overall survival (OS) was calculated from the date of diagnosis until the date of death, resulting from any cause, or the date of last follow-up. EFS and OS curves were plotted using the Kaplan–Meier method. The prognostic impact of patients' characteristics (age, sex, tumor location, tumor stage, and surgery procedures) on survival of patients was assessed by Cox proportional hazard ratio (HR) regression. In a second step, all variables with $p < 0.10$ were included in a multivariate Cox regression (backward conditional stepwise selection). A bootstrap analysis ($n = 10\,000$) based on random resampling was applied to ensure the stability of the Cox regression model.

For all statistical tests, significance is two-sided and achieved when p -values were < 0.05 . All tests were carried out using the SPSS 21.0 software (SPSS Inc.).

3 | RESULTS

3.1 | Study population

Demographics from 251 patients with OPSCC and 254 healthy subjects are presented in Table S2. Patients were older than the control individuals ($p < 0.0001$). The percentages of men (90.8% vs. 78.0%), smokers (or formers) (95.6% vs. 76.8%) were higher in patients than in controls ($p < 0.0001$). These differences were corrected in all comparisons using multivariate statistical analysis.

Frequencies of tumor characteristics are shown in Table S2. Tumors located at the base of the tongue (45.8%) and at an advanced staged (TNM stage IV)

(73.7%) were observed in most patients. Eight patients (3.2%) had a positive tumor for HPV type 16.

Out of 245 patients, information on therapy could not be obtained for six of them. The remaining 239 patients underwent treatment with a combination of CT, RT, and surgery. Among these, 199 patients received neoadjuvant therapy, with 189 receiving concomitant CT and RT, four receiving only CT, and six receiving only RT. The remaining 40 patients underwent surgery, with 11 of them having received neoadjuvant therapy with RT and 25 having received neoadjuvant therapy with concomitant CT and RT.

3.2 | Genotyping

Patient and control samples did not deviate from HW equilibrium for *TPH1* rs623580 ($\chi^2 = 0.01$, $p = 0.92$ and $\chi^2 = 0.59$, $p = 0.44$, respectively), *TPH2* rs4570625 ($\chi^2 = 0.59$, $p = 0.44$ and $\chi^2 = 1.23$, $p = 0.26$, respectively), and *HTR1D* rs674386 ($\chi^2 = 0.67$, $p = 0.41$ and $\chi^2 = 0.55$, $p = 0.45$, respectively) loci.

3.3 | OPSCC risk and SNVs

Carriers of *TPH1* rs623580 TT genotype (44.8% vs. 34.6%, $p = 0.03$) and T allele (66.3% vs. 59.8%, $p = 0.02$) were more common in patients than in controls. Subjects with reported variants had a 1.56-fold (95% CI: 1.02–2.37) and 1.41-fold (95% CI: 1.05–1.91) increased risk for OPSCC than others (Table 1).

Frequencies of *TPH2* rs4570625, *HTR1D* rs674386, and combined genotypes were similar in patients and controls (Table 1).

3.4 | Tumor malignancy and SNVs

No associations were observed between tumor location and *TPH1* rs623580, *TPH2* rs4570625, and *HTR1D* rs674386 genotypes in our sample (data not shown).

The *HTR1D* GG or GA genotypes were more frequent in invasive tumors (T4) than in the others (T1, T2, or T3) (91.5% vs. 80.6%, $p = 0.01$) (Table 2).

3.5 | Survival of patients with OPSCC

The mean follow-up was 54 months (range: 2–200 months). At the final follow-up, 190 patients died from the disease and 55 patients were alive (12 with the disease and 43 without the disease). Sixty-five

TABLE 1 Frequencies of *TPH1* rs623580, *TPH2* rs4570625, and *HTR1D* rs674386 genotypes in 251 patients with oropharynx squamous cell carcinoma and 254 controls

Genotype	Patient, N (%)	Control, N (%)	OR (95% CI)	p-value
<i>TPH1</i> rs623580				
TT	110 (44.8)	88 (34.6)	2.07 (1.05–4.07)	0.03*
TA	113 (45.0)	128 (50.4)	1.45 (0.93–2.26)	0.09
AA	28 (11.2)	38 (15.0)	Reference	
TT or TA	223 (88.8)	216 (85.0)	1.66 (0.89–3.11)	0.10
AA	28 (11.2)	38 (15.0)	Reference	
TT	110 (44.8)	88 (34.6)	1.56 (1.02–2.37)	0.03**
TA or AA	141 (56.2)	166 (65.4)	Reference	
T allele	333 (66.3)	304 (59.8)	1.41 (1.05–1.91)	0.02***
A allele	169 (33.7)	204 (40.2)	Reference	
<i>TPH2</i> rs4570625				
GG	131 (52.2)	134 (52.8)	1.25 (0.55–2.83)	0.59
GT	104 (41.5)	96 (37.8)	1.42 (0.65–3.10)	0.37
TT	16 (6.3)	24 (9.4)	Reference	
GG or GT	237 (93.7)	231 (90.6)	1.32 (0.61–2.87)	0.47
TT	16 (6.3)	24 (9.4)	Reference	
GG	131 (52.2)	134 (52.8)	1.00 (0.65–1.48)	0.96
GT or TT	120 (47.8)	120 (47.2)	Reference	
G allele	366 (72.9)	364 (71.7)	1.04 (0.75–1.43)	0.79
T allele	136 (27.1)	144 (28.3)	Reference	
<i>HTR1D</i> rs674386				
GG	105 (41.8)	101 (39.9)	1.39 (0.68–2.86)	0.36
GA	110 (43.9)	122 (48.2)	0.76 (0.40–1.43)	0.40
AA	36 (14.3)	30 (11.9)	Reference	
GG or GA	215 (85.7)	223 (88.1)	0.76 (0.41–1.40)	0.38
AA	36 (14.3)	30 (11.9)	Reference	
GG	105 (41.8)	101 (39.9)	1.06 (0.70–1.60)	0.77
GA or AA	146 (58.2)	152 (60.1)	Reference	
G allele	320 (63.7)	324 (64.0)	0.96 (0.71–1.30)	0.82
A allele	182 (36.3)	182 (36.0)	Reference	
<i>TPH1</i> and <i>TPH2</i>				
TT+GG	56 (45.9)	50 (37.9)	1.46 (0.79–2.70)	0.22
TA or AA+GT or TT	66 (54.1)	82 (62.1)	Reference	
<i>TPH1</i> and <i>HTR1D</i>				
TT+GG	50 (36.8)	34 (25.8)	1.75 (0.96–3.20)	0.06
TA or AA+GA or AA	86 (63.2)	98 (74.2)	Reference	
<i>TPH2</i> and <i>HTR1D</i>				
GG+GG	50 (43.1)	53 (42.7)	1.07 (0.59–1.92)	0.81
GT or TT+GA or AA	66 (56.9)	71 (57.3)	Reference	

Note: Statistical power: *0.45, **0.65, and ***0.57. $p < 0.05$ is indicated by bold letters.

Abbreviations: CI, confidence interval; N, number of patients or controls; OR, odds ratio adjusted by age, sex, and tobacco habit.

TABLE 2 *TPH1* rs623580, *TPH2* rs4570625, and *HTR1D* rs674386 variants in 251 oropharynx squamous cell carcinoma patients stratified by tumor aspects

Genotype	Tumor size		Nodal stage		Tumor stage	
	1–3, N (%)	4, N (%)	None, N (%)	1 or more, N (%)	I–III, N (%)	IV, N (%)
<i>TPH1</i> rs623580						
TT or TA	116 (86.6)	107 (91.5)	60 (85.7)	163 (90.1)	60 (89.6)	166 (89.2)
AA	18 (13.4)	10 (8.5)	10 (14.3)	18 (9.9)	7 (10.4)	20 (10.8)
<i>p</i> -value	0.22		0.32		1.00	
TT	63 (47.0)	47 (40.2)	27 (38.6)	83 (45.9)	31 (46.3)	81 (43.5)
TA or AA	71 (53.0)	70 (59.8)	43 (61.4)	98 (54.1)	36 (53.7)	105 (56.5)
<i>p</i> -value	0.30		0.29		0.70	
<i>TPH2</i> rs4570625						
GG or GT	126 (94.0)	109 (93.2)	65 (92.9)	170 (93.9)	62 (92.5)	175 (94.1)
TT	8 (6.0)	8 (6.8)	5 (7.1)	11 (6.1)	5 (7.5)	11 (5.9)
<i>p</i> -value	0.80		0.77		0.77	
GG	66 (49.3)	65 (55.6)	39 (55.7)	92 (50.8)	33 (49.3)	99 (53.2)
GT or TT	68 (50.7)	52 (44.4)	31 (44.3)	89 (40.2)	34 (50.7)	87 (46.8)
<i>p</i> -value	0.37		0.48		0.57	
<i>HTR1D</i> rs674386						
GG or GA	108 (80.6)	107 (91.5)	61 (87.1)	154 (85.1)	58 (86.6)	158 (84.9)
AA	26 (19.4)	10 (9.5)	9 (12.9)	27 (14.9)	9 (13.4)	28 (15.1)
<i>p</i> -value	0.01*		0.67		0.84	
GG	56 (41.8)	49 (41.9)	28 (40.0)	77 (42.5)	27 (40.3)	78 (41.9)
GA or AA	78 (58.2)	68 (58.1)	42 (60.0)	104 (57.5)	40 (59.7)	108 (58.1)
<i>p</i> -value	0.98		0.71		0.81	

Note: Tumor size, nodal status, and tumor stage were classified according to the American Joint Committee of Cancer Staging. Statistical power: *0.69. $p < 0.05$ is indicated by bold letters.

Abbreviation: N, number of patients.

patients showed relapse of disease. The 5-year EFS and OS rates were 41.4% and 40.0%, respectively.

The univariate Cox analysis for EFS and OS of patients with OPSCC is presented in Table 3.

Sex ($p = 0.07$), tumor location ($p = 0.008$), tumor stage ($p < 0.0001$), surgery status ($p < 0.0001$), and *HTR1D* rs674386 genotypes ($p = 0.05$) were included in multivariate Cox regression for EFS analysis (Table 3). After multivariate analysis, tumor location (base of tongue) (HR: 1.41, 95% CI: 1.02–1.93, $p = 0.03$), advanced tumor stage (stage IV) (HR: 1.75, 95% CI: 1.15–2.67, $p = 0.008$), unresectable tumors (HR: 1.90, 95% CI: 1.11–3.27, $p = 0.01$), and GG or GA genotypes (*HTR1D* rs674386) (HR: 1.66, 95% CI: 1.01–2.77, $p = 0.04$) (Figure 1A) were found to be a predictor of worse EFS (Table 3).

Considering OS analysis, tumor location ($p = 0.001$), tumor stage ($p = 0.001$), and surgery status ($p = 0.001$)

were included in the multivariate Cox regression. After multivariate analysis, tumors located in the base of tongue (HR: 1.51, 95% CI: 1.13–2.01, $p = 0.005$), advanced tumor stage (stage IV) (HR: 1.49, 95% CI: 1.04–2.13, $p = 0.02$), and unresectable tumors (HR: 1.61, 95% CI: 1.05–2.48, $p = 0.02$) were found to be a predictor of poor OS (Table 3).

3.6 | Transcriptional activity of *TPH1* and *HTR1D*

Luciferase transcriptional activity was 25.5% lower in FaDu cells transfected with *TPH1* T allele plasmid (0.79-fold decreased, $p = 0.03$) (Figure 1B) and 57.4% lower in cells with *HTR1D* G allele (0.64-fold decreased, $p = 0.008$) (Figure 1C) than in those with the A allele and A allele, respectively.

TABLE 3 Cox regression analysis examining the association of clinical and tumor characteristics, and *TPH1* rs623580, *TPH2* rs4570625, and *HTRID* rs674386 variants in 245 patients with oropharynx squamous cell carcinoma

Variable	Total N	Event-free survival			Overall survival				
		N of event	Univariate analysis		N of event	Univariate analysis			
			HR (95% CI)	p-value		HR (95% CI)	p-value		
Median age									
≤56 years	130	87	1.15 (0.84–1.58)	0.37	NC	101	1.01 (0.76–1.34)	0.92	NC
>56 years	115	69	Reference			89	Reference		
Sex									
Male	223	147	1.85 (0.94–3.63)	0.07	1.75 (0.89–3.44)	0.10	1.52 (0.88–2.63)	0.12	NC
Female	22	9	Reference		Reference		Reference		
Tumor location									
Base of tongue	113	79	1.53 (1.11–2.10)	0.008	1.41 (1.02–1.93)	0.03^a	1.63 (1.23–2.18)	0.001	1.51 (1.13–2.01)
Others	132	77	Reference		Reference		Reference		Reference
Tumor stage									
IV	181	127	2.09 (1.39–3.13)	<0.0001	1.75 (1.15–2.67)	0.008^b	1.76 (1.25–2.48)	0.001	1.49 (1.04–2.13)
I–III	64	29	Reference		Reference		Reference		Reference
Surgery									
No	205	140	2.51 (1.49–4.32)	<0.0001	1.90 (1.11–3.27)	0.01^c	2.01 (1.33–3.03)	0.001	1.61 (1.05–2.48)
Yes	40	16	Reference		Reference		Reference		Reference
<i>TPH1</i> rs623580									
TT	106	64	1.14 (0.83–1.57)		NC		1.03 (0.77–1.37)	0.82	NC
TA or AA	139	92	Reference	0.40			Reference		
TT or TA	217	139	1.22 (0.73–2.02)		NC		1.00 (0.65–1.53)	0.99	NC
AA	28	17	Reference	0.43			Reference		
<i>TPH2</i> rs4570625									
GG	128	79	1.03 (0.75–1.42)		NC		1.05 (0.79–1.40)	0.71	NC
GT or TT	117	77	Reference	0.82			Reference		
GG or GT	231	146	1.02 (0.54–1.95)		NC		1.25 (0.64–2.45)	0.50	NC
TT	14	10	Reference	0.93			Reference		
<i>HTRID</i> rs674386									
GG	105	69	1.03 (0.75–1.41)	0.84	NC		1.17 (0.88–1.56)	0.27	NC
GA or AA	140	87	Reference				Reference		
GG or GA	210	139	1.64 (0.99–2.73)	0.05	1.66 (1.01–2.77)	0.04^d	1.41 (0.91–2.19)	0.11	NC
AA	35	17	Reference		Reference		Reference		

Note: Bootstrapping analysis: ^a $p = 0.06$, ^b $p = 0.003$, ^c $p = 0.01$, ^d $p = 0.05$, ^e $p = 0.007$, ^f $p = 0.001$, and ^g $p = 0.005$. Bold numbers indicate the significant values ($p < 0.05$) after multivariate analysis. Abbreviations: CI, confidence interval; HR, hazard ratio; N, number of patients; NC, variable not computed in multivariate analysis.

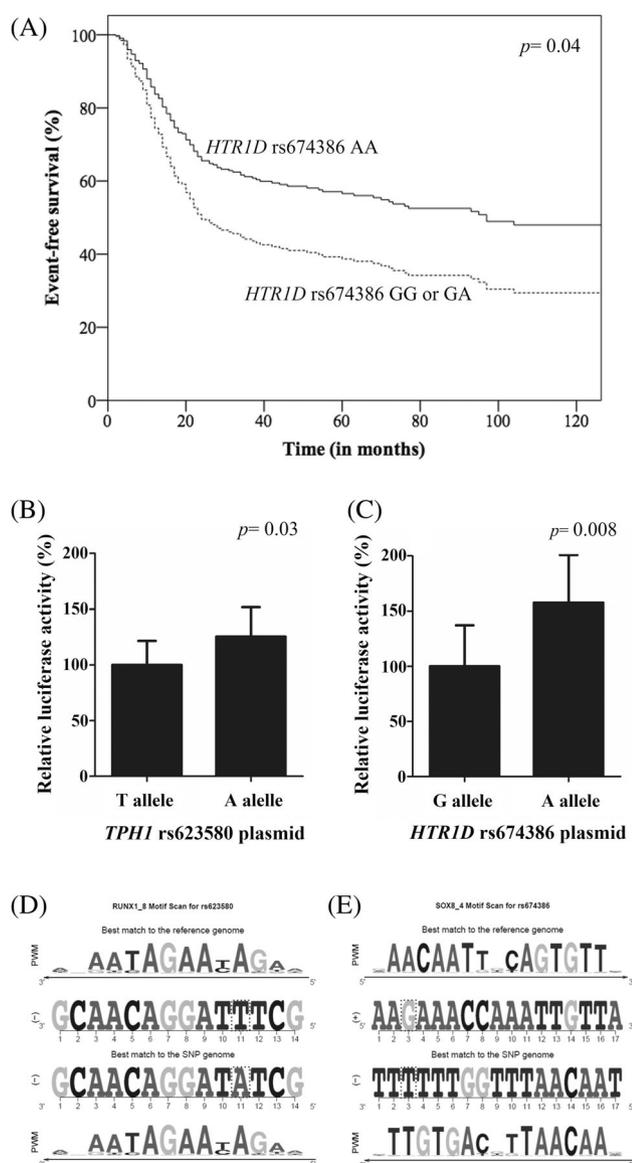


FIGURE 1 (A) Association between *HTR1D* rs674386 GG or GA genotypes and event-free survival, showing a hazard ratio of 1.66 (95% CI: 1.01–2.77, $p = 0.04$) indicating a predictor of worse survival. (B) Luciferase transcriptional activity in FaDu cells transfected with *TPH1* rs623580 T allele plasmid compared to those with the A allele, showing a significant 0.79-fold decrease ($p = 0.03$). (C) Luciferase transcriptional activity in cells with *HTR1D* rs674386 G allele plasmid compared to those with the A allele, showing a significant 0.64-fold decrease ($p = 0.008$). (D) Transcription factor (TF) binding sites for the *TPH1* rs623580 (T>A) single-nucleotide polymorphism (SNP). PWM, position weight matrix of TF RUNX1. (E) TF binding sites for the *HTR1D* rs674386 (G>A) SNP. PWM of TF SOX8. The dashed square represents the SNP alleles

3.7 | TF binding motif analysis

We performed a motif binding affinity analysis to investigate whether the SNVs rs623580 (T>A) and rs674386

(G>A) alter the TF binding sites in the regulatory region of *TPH1* and *HTR1D*, respectively.

The analysis indicated that the T allele of *TPH1* is predicted to reduce the binding affinity of RUNX1 resulting in a decrease in log odds from -17.9 to -41.8 (p -value impact = 0.0005) (Figure 1D). Additionally, the G allele of *HTR1D* is predicted to reduce the binding affinity of SOX8, leading to a decrease in log odds from -29.3 to -41.8 (p -value impact = 0.001) (Figure 1E).

4 | DISCUSSION

The present study aimed to investigate the impact of the *TPH1* rs623580, *TPH2* rs4570625, and *HTR1D* rs674386 SNVs on the risk, tumor characteristics, and prognosis of OPSCC. Furthermore, this study aimed to evaluate the effect of the SNVs rs623580 and rs674386 on the transcriptional activity of *TPH1* and *HTR1D*, respectively, in a pharynx SCC cell line.

5-HT has been linked to the carcinogenesis of solid tumors, in addition to their well-known role in regulating psychiatric and neurological disorders.¹⁷ 5-HT is synthesized from the tryptophan, and the conversion of tryptophan to 5-HT is catalyzed by enzyme TPH.⁶ TPH1 is expressed widely in the periphery, with highest expression in the enterochromaffin cells of the intestine.³⁸ The effects of 5-HT are mediated through tissue specific HTRs.⁶

Our results showed that individuals with TT genotype of *TPH1* rs623580 (T>A) had a 1.56-fold increased risk of OPSCC compared to those with other genotypes. This is the first investigation to evaluate the role of studied SNV in OPSCC risk. Previous studies have linked this SNV to depressive disorders^{31,32} and anorexia nervosa.³⁴ The SNVs *TPH2* rs4570625 and *HTR1D* rs674386 were found to have no influence on the risk of OPSCC.

The SNV *TPH1* rs623580 results in the exchange of thymine (T) for adenine (A) in the regulatory region (5'-flanking region) of *TPH1*. Our transcription activity analysis showed that the FaDu cell line transfected with the TT genotype displayed lower luciferase activity compared to those transfected with the AA genotype. Furthermore, our in silico analysis showed that the T allele could lose the binding site for TF RUNX1 compared to A allele. Previous study has linked RUNX1 to the progression of disease in patients with head and neck tumors.³⁹

The activity of TPH1 is considered to be the rate-limiting step in the 5-HT synthesis pathway,¹⁷ and 5-HT has been suggested to act as a growth factor in tumor cells, although its effects remain unclear due to conflicting reports.^{17,40,41} Some of the observed effects on cell growth were observed at physiological concentration of 5-HT,¹⁶ while others were observed at higher

concentrations.¹⁷ Our results support the idea that individuals with the *TPH1* TT genotype may be at increased risk of OPSCC due to *TPH1* downregulation and consequent lower synthesis of 5-HT.^{16,17} Large-scale studies and additional functional experiments are necessary to provide a clearer picture of the relevance of *TPH1* rs623580 SNV in OPSCC risk.

Our results showed that patients with GG or GA genotypes of *HTR1D* rs674386 (G>A) had more invasive tumors and worse survival. This is the first study to examine the association between the studied SNV and OPSCC aggressiveness and survival. However, previous research has linked this SNV to anorexia nervosa.³⁴ The SNVs *TPH1* rs623580 and *TPH2* rs4570625 did not have any influence on tumor characteristics or patient survival in OPSCC.

The *HTR1D* rs674386 SNV involves a substitution of guanine (G) with adenine (A) in the regulatory region of *HTR1D*. Our analysis of transcriptional activity showed that FaDu cells transfected with the GG genotype had lower luciferase activity than those with the AA genotype. Furthermore, our in silico analysis suggested that the G allele might result in a loss of binding sites for TF SOX8, in contrast to the A allele. A previous study demonstrated that SOX8 is involved in regulating cancer stem-like properties and cisplatin-induced epithelial-mesenchymal transition in tongue SCC.⁴²

HTR1D overexpression has been observed in head and neck tumors.^{15,20} Previous studies have demonstrated that 5-HT can have both stimulatory and inhibitory effects on carcinogenesis, indicating that the response of HTRs may be tissue-specific or influenced by multiple receptors.¹⁷ Low *HTR1D* expression has been associated with worse outcomes in colorectal cancer,²⁵ while upregulation has been linked to poor overall survival in hepatocellular carcinoma²⁶ and oral SCC.²⁰

Based on our findings, patients carrying the *HTR1D* GG or GA genotypes may present with invasive tumors and worse EFS due to lower *HTR1D* expression, leading to tumor proliferation. Furthermore, the expression of *HTR1D* may be correlated with the levels of 5-HT.¹⁷ The effect of low levels of 5-HT on tumor progression could be attributed to the specific vasodilatory effect of 5-HT on the vessels that supply oxygen and nutrients to tumors, through the modulation of nitric oxide production in a concentration-dependent manner.^{16,41} To better understand the role of *HTR1D* in tumor invasion and prognosis, a functional analysis of *HTR1D* expression modulation during OPSCC progression would be informative.

Our study has several limitations. First, our associations were established based on a relatively small number of patients. Second, HPV infection is one of the primary

risk factors in OPSCC. However, our conclusions may only be applicable to cases of HPV-negative OPSCC due to the association of our sample with alcohol and tobacco consumption. Third, the underlying biological mechanisms of the detected associations remain unclear. Although we have presented some evidence through in vitro transcriptional activity analysis and in silico analysis of TF binding motifs, further verification of the involvement of SNVs in 5-HT-related genes in target tissues or cell lines will be necessary.

5 | CONCLUSION

In summary, our data demonstrate for the first time that genetic variants in 5-HT modulating genes can influence the risk and aggressiveness of OPSCC, and can serve as independent prognostic factors in patients with OPSCC. Once validated by larger studies with functional protein analyses, these findings suggest the potential for using these variants to select patients for differentiated treatment approaches.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Gabriela Souza Rodrigues Queiroz, Juliana Carron, Ligia Traldi Macedo, Carmen Silvia Passos Lima, and Gustavo Jacob Lourenço contributed to data collection. Gabriela Souza Rodrigues Queiroz and Juliana Carron conducted methodology assays. Gustavo Jacob Lourenço performed statistical analysis of the data. Gustavo Jacob Lourenço supervised the project. Gabriela Souza Rodrigues Queiroz and Gustavo Jacob Lourenço were responsible for manuscript writing. All authors have reviewed and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENT

We would like to thank Dr. Rafael Della Coletta for assistance with bioinformatics analysis.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The authors declare no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy or ethical restrictions.

ORCID

Carmen Silvia Passos Lima  <https://orcid.org/0000-0002-1314-2345>

Gustavo Jacob Lourenço  <https://orcid.org/0000-0002-5944-0305>

REFERENCES

- Carron J, Costa APD, Rinck-Junior JA, et al. Role of a genetic variation in the microRNA-4421 binding site of ERP29 regarding risk of oropharynx cancer and prognosis. *Sci Rep*. 2020;10(1):17039.
- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-249.
- Hashibe M, Brennan P, Chuang SC, et al. Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009;18(2):541-550.
- Taberna M, Mena M, Pavón MA, Alemany L, Gillison ML, Mesía R. Human papillomavirus-related oropharyngeal cancer. *Ann Oncol*. 2017;28(10):2386-2398.
- Sarrouilhe D, Mesnil M. Serotonin and human cancer: a critical view. *Biochimie*. 2019;161:46-50.
- Balakrishna P, George S, Hatoum H, Mukherjee S. Serotonin pathway in cancer. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3):1268.
- Siddiqui EJ, Shabbir M, Mikhailidis DP, Thompson CS, Mumtaz FH. The role of serotonin (5-hydroxytryptamine1A and 1B) receptors in prostate cancer cell proliferation. *J Urol*. 2006;176(4 Pt 1):1648-1653.
- Dizeyi N, Hedlund P, Bjartell A, Tinzl M, Austild-Taskén K, Abrahamsson PA. Serotonin activates MAP kinase and PI3K/Akt signaling pathways in prostate cancer cell lines. *Urol Oncol*. 2011;29(4):436-445.
- Siddiqui EJ, Shabbir MA, Mikhailidis DP, Mumtaz FH, Thompson CS. The effect of serotonin and serotonin antagonists on bladder cancer cell proliferation. *BJU Int*. 2006;97(3):634-639.
- Cattaneo MG, Fesce R, Vicentini LM. Mitogenic effect of serotonin in human small cell lung carcinoma cells via both 5-HT1A and 5-HT1D receptors. *Eur J Pharmacol*. 1995;291(2):209-211.
- Ataee R, Ajdary S, Zarrindast M, Rezayat M, Hayatbakhsh MR. Anti-mitogenic and apoptotic effects of 5-HT1B receptor antagonist on HT29 colorectal cancer cell line. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010;136(10):1461-1469.
- Sonier B, Arseneault M, Lavigne C, Ouellette RJ, Vaillancourt C. The 5-HT2A serotoninergic receptor is expressed in the MCF-7 human breast cancer cell line and reveals a mitogenic effect of serotonin. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;343(4):1053-1059.
- Soll C, Jang JH, Riener MO, et al. Serotonin promotes tumor growth in human hepatocellular cancer. *Hepatology*. 2010;51(4):1244-1254.
- Soll C, Riener MO, Oberkofler CE, et al. Expression of serotonin receptors in human hepatocellular cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(21):5902-5910.
- Ballou Y, Rivas A, Belmont A, et al. 5-HT serotonin receptors modulate mitogenic signaling and impact tumor cell viability. *Mol Clin Oncol*. 2018;9(3):243-254.
- Asada M, Ebihara S, Yamada S, et al. Depletion of serotonin and selective inhibition of 2B receptor suppressed tumor angiogenesis by inhibiting endothelial nitric oxide synthase and extracellular signal-regulated kinase 1/2 phosphorylation. *Neoplasia*. 2009;11(4):408-417.
- Sarrouilhe D, Clarhaut J, Defamie N, Mesnil M. Serotonin and cancer: What is the link? *Curr Mol Med*. 2015;15(1):62-77.
- Zhang J, Guo Z, Xie Q, Zhong C, Gao X, Yang Q. Tryptophan hydroxylase 1 drives glioma progression by modulating the serotonin/LICAM/NF- κ B signaling pathway. *BMC Cancer*. 2022;22(1):457.
- Cinar V, Hamurcu Z, Guler A, Nuridinov N, Ozpolat B. Serotonin 5-HT7 receptor is a biomarker poor prognostic factor and induces proliferation of triple-negative breast cancer cells through FOXM1. *Breast Cancer*. 2022;29(6):1106-1120.
- Zhang YY, Mao MH, Han ZX. Identification of a gene prognostic signature for oral squamous cell carcinoma by RNA sequencing and bioinformatics. *Biomed Res Int*. 2021;2021:6657767.
- Sui H, Xu H, Ji Q, et al. 5-hydroxytryptamine receptor (5-HT1DR) promotes colorectal cancer metastasis by regulating Axin1/ β -catenin/MMP-7 signaling pathway. *Oncotarget*. 2015;6(28):25975-25987.
- Gurbuz N, Ashour AA, Alpay SN, Ozpolat B. Down-regulation of 5-HT1B and 5-HT1D receptors inhibits proliferation, clonogenicity and invasion of human pancreatic cancer cells. *PLoS One*. 2014;9(9):e110067.
- Wu W, Li Q, Zhu Z, et al. HTR1D functions as a key target of HOXA10-AS/miR-340-3p axis to promote the malignant outcome of pancreatic cancer via PI3K-AKT signaling pathway. *Int J Biol Sci*. 2022;18(9):3777-3794.
- Jin X, Li H, Li B, Zhang C, He Y. Knockdown and inhibition of hydroxytryptamine receptor 1D suppress proliferation and migration of gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022;620:143-149.
- Zeng C, Chen Y. HTR1D, TIMP1, SERPINE1, MMP3 and CNR2 affect the survival of patients with colon adenocarcinoma. *Oncol Lett*. 2019;18(3):2448-2454.
- Zuo X, Chen Z, Cai J, et al. 5-Hydroxytryptamine receptor 1D aggravates hepatocellular carcinoma progression through FoxO6 in AKT-dependent and independent manners. *Hepatology*. 2019;69(5):2031-2047.
- Strobel A, Dreisbach G, Müller J, Goschke T, Brocke B, Lesch KP. Genetic variation of serotonin function and cognitive control. *J Cogn Neurosci*. 2007;19(12):1923-1931.
- Chen GL, Vallender EJ, Miller GM. Functional characterization of the human TPH2 5' regulatory region: untranslated region and polymorphisms modulate gene expression in vitro. *Hum Genet*. 2008;122(6):645-657.
- Gatt JM, Burton KL, Williams LM, Schofield PR. Specific and common genes implicated across major mental disorders: a review of meta-analysis studies. *J Psychiatr Res*. 2015;60:1-13.
- Ottenhof KW, Sild M, Lévesque ML, Ruhé HG, Booij L. TPH2 polymorphisms across the spectrum of psychiatric morbidity: a systematic review and meta-analysis. *Neurosci Biobehav Rev*. 2018;92:29-42.
- Ching-López A, Cervilla J, Rivera M, et al. Epidemiological support for genetic variability at hypothalamic-pituitary-adrenal axis and serotonergic system as risk factors for major depression. *Neuropsychiatr Dis Treat*. 2015;11:2743-2754.
- Wigner P, Czarny P, Synowiec E, et al. Association between single nucleotide polymorphisms of TPH1 and TPH2 genes, and depressive disorders. *J Cell Mol Med*. 2018;22(3):1778-1791.

33. Liu ZL, Wang XQ, Liu MF, Ye BJ. Meta-analysis of association between TPH2 single nucleotide polymorphism and depression. *Neurosci Biobehav Rev.* 2022;134:104517.
34. Brown KM, Bujac SR, Mann ET, Campbell DA, Stubbins MJ, Blundell JE. Further evidence of association of OPRD1 & HTR1D polymorphisms with susceptibility to anorexia nervosa. *Biol Psychiatry.* 2007;61(3):367-373.
35. Edge SB, Compton CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(6):1471-1474.
36. Auton A, Abecasis GR, Altshuler DM, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature.* 2015;526(7571):68-74.
37. Zuo C, Shin S, Keleş S. atSNP: transcription factor binding affinity testing for regulatory SNP detection. *Bioinformatics.* 2015;31(20):3353-3355.
38. Walther DJ, Bader M. A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochem Pharmacol.* 2003;66(9):1673-1680.
39. Liu K, Hu H, Jiang H, et al. RUNX1 promotes MAPK signaling to increase tumor progression and metastasis via OPN in head and neck cancer. *Carcinogenesis.* 2021;42(3):414-422.
40. Vicaut E, Laemmel E, Stücker O. Impact of serotonin on tumour growth. *Ann Med.* 2000;32(3):187-194.
41. Siddiqui EJ, Thompson CS, Mikhailidis DP, Mumtaz FH. The role of serotonin in tumour growth (review). *Oncol Rep.* 2005;14(6):1593-1597.
42. Xie SL, Fan S, Zhang SY, et al. SOX8 regulates cancer stem-like properties and cisplatin-induced EMT in tongue squamous cell carcinoma by acting on the Wnt/ β -catenin pathway. *Int J Cancer.* 2018;142(6):1252-1265.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Queiroz GSR, Carron J, Macedo LT, Lima CSP, Lourenço GJ. Influence of variants in serotonin modulating genes on the risk, aggressiveness, and prognosis of oropharynx cancer. *Head & Neck.* 2023;45(7):1790-1800. doi:10.1002/hed.27394