



UNIVERSITÀ DI PARMA

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato in Medicina Molecolare

Tematica di Ricerca: Oncologia Maxillo Facciale

XXXI ciclo

Modelli prognostici e Gene Signatures per la stratificazione dei pazienti affetti da carcinoma del cavo orale

Coordinatore:

Chiar.mo Prof.ssa Stefania Conti

Tutore:

Chiar.mo Prof. Tito Poli

Dottorando: Dott. Davide Lanfranco

Anni 2015/2018

INDICE

RIASSUNTO

ABSTRACT

INTRODUZIONE

**VALUTAZIONE DEI PAZIENTI ORAMOD AFFETTI DA CARCINOMA
SQUAMOCELLULARE DEL CAVO ORALE**

- *Il background interno del progetto NeoMark*
- *Come OraMod integra e va oltre NeoMark*

OBIETTIVI SCIENTIFICI

MATERIALI E METODI

- Protocollo per la raccolta dei dati clinici
- Protocollo per la raccolta dei dati radiologici
- Protocollo per la raccolta dei dati anatomopatologici
- Protocollo Genomico
- Analisi d'espressione mediante Array
- Preelaborazione dei dati dei microarray
- Selezione genica
- Quantitative real-time PCR
- Analisi dell'espressione genica dai dati qPCR
- Validazione tecnica qPCR
- Validazione indipendente dei geni selezionati mediante RT-Qpcr
- Validazione esterna con dataset RNAseq TCGA
- Istopatologia
- Dati clinici
- Risultati

- **Analisi statistica**
- **Relazione delle firme genomiche con altri marcatori prognostici**

RISULTATI

Un modello basato sull'espressione genica per predire le metastasi linfonodali in OSCC

Un modello prognostico basato sull'espressione genica per OSCC con valore prognostico indipendente

Validazione tecnica di transizione di piattaforma da qPCR tradizionale a Sistema Lab-On-Chip-Q3-Plus

DISCUSSIONE

REFERENCES

RIASSUNTO

Il concetto alla base del progetto Oramod nasce dall'esigenza avvertita dagli specialisti coinvolti nel trattamento di pazienti oncologici testa-collo di migliorare la rappresentazione multilivello dei processi biologici notoriamente implicati nella genesi tumorale per prevedere la crescita e la disseminazione delle neoplasie, in particolare del carcinoma squamocellulare del cavo orale.

Poiché una visione omnicomprensiva del paziente è oggi preclusa da una sua valutazione settoriale per differente campo di competenza (clinico, radiologico, anatomopatologico, ecc.), risulterebbe estremamente utile poter disporre di un sistema informatico in grado di assemblare dati di varia origine appianando le problematiche derivanti da differenti scale di valutazione (alfa numerica, percentuale, ecc.).

Lo scopo di Oramod è di portare alla pratica clinica l'approccio VPH (Virtual phisical human) per supportare i medici nella gestione di aspetti chiave nella predizione della recidiva del carcinoma del cavo orale.

Il modello VPH è già stato validato dal precedente progetto ICT Neomark (ICT-VPH-224483) dove il reparto di Chirurgia Maxillo Facciale di Parma ha ricoperto il ruolo di coordinatore e di partner clinico.

L' approccio proposto, basato appunto sull' integrazione di dati clinici, conoscenze mediche, collaborazione multidisciplinare, tecnologie dedicate migliorerà: 1) l'approccio multi specialistico alla diagnosi, valutazione del rischio e decisione del trattamento 2) l'integrazione delle evidenze scientifiche con la pratica clinica.

I trial preclinici sul carcinoma del cavo orale hanno dimostrato il potenziale di questo modello nel facilitare le decisioni cliniche e hanno permesso di

prevedere l'impatto socioeconomico e i benefici di questo approccio per i pazienti, i medici e il sistema sanitario nazionale.

Gli obiettivi principali del progetto sono quindi: 1) Concetto VPH di malattia e la sua virtualizzazione 2) l'integrazione con le attuali infrastrutture ospedaliere 3) la conformità con gli attuali standard industriali 4) l'integrazione con gli attuali workflow clinici.

I modelli precedentemente sviluppato nel progetto NeoMark verrà implementato e adattato alle esigenze cliniche rendendolo maggiormente interattivo ed aumentato la capacità di simulazione oltre ad affinare l'accuratezza nel determinare il rischio di recidiva. Questo approccio implementato verrà integrato in un strumento web-based integrato che includerà:

- I) una cartella clinica elettronica con un sistema di supporto decisionale.
- II) un data repository (archivio) di dati multi sorgente integrabile con i sistemi operativi aziendali.
- III) un sistema altamente interattivo per la visualizzazione e la simulazione dei dati del paziente in linea con il concetto di "Paziente Digitale"
- IV) il "Virtual Tumor Board" per supportare l'approccio multidisciplinare grazie all'integrazione di differenti specialisti
- V) un sofisticato analizzatore di immagini ed estrattore di caratteristiche per la diagnostica Head and neck
- VI) un dispositivo RT-PCR lab-on-chip per la determinazione rapida e precisa dei marker genomici inclusi nel modello predittivo.

Gli obiettivi scientifici del progetto Oramod sono l'identificazione dei pazienti a più alto rischio di recidiva e la diagnosi preclinica dell'eventuale ripresa di

malattia in futuro.

L' identificazione di pazienti ad alto o basso rischio di recidiva dovrebbe inoltre razionalizzare la scelta di trattamenti adiuvanti radio/chemioterapici, riservando l'impiego di tali terapie complementari ai soli pazienti in cui gli effetti terapeutici sono tali da poter giustificare una tossicità ancora oggi elevata, nonché consentire il contenimento dei costi per il S.S.N..

Una più precoce diagnosi di recidiva permetterebbe infine la realizzazione di trattamenti meno demolitivi nei pazienti affetti da carcinomi del cavo orale, aumentandone qualità e aspettativa di vita.

In questo studio vengono presentati i risultati del suddetto progetto Oramod.

ABSTRACT

The idea behind Oramod project rised from the need felt by experts working in head-neck cancer field to improve the multilevel representation of the biological processes notoriously implicated in the cancerogenesis to foresee the growth and the dissemination of the tumors, particularly of the oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma.

As a comprehensive vision of the patient is hampered by a sectoralized evaluation accomplished in each different field of competence (clinical, radiological, pathological, biomolecular) it would be extremely useful to dispose of an informatic system able to assemble data of various origin each one characterized by a different staircase of evaluation (numerical alpha, percentage, etc.).

OraMod will translate into the clinical practice a VPH-based approach for supporting the management of key aspects in the prediction of the reoccurrence of oral cancer.

The supporting VPH model has already been validated in the previous ICT project NeoMark (ICT-VPH-224483), where some of the OraMod clinical and technical Partners (including the Coordinator) were participating, and will be advanced into a clinically-oriented system.

The proposed approach, relying on secure integration of huge health datasets, medical knowledge, multidisciplinary collaborative best clinical practices and cutting-edge technologies, including modelling and insilico simulation, will improve (1) the multi-specialist approach to diagnosis, risk assessment, and

treatment decisions and (2) the integration of research-derived evidences into the clinical practice (i.e. the evidencedriven approach).

A pre-clinical trial on Oral Cavity Cancer will demonstrate the effectiveness of the model to improve clinical decisions and will evaluate the socioeconomic impacts and benefits for patients, clinicians, the Healthcare Systems and the external payers.

The key IT pillars of the project are: (1) the VPH concept of disease and patient virtualization, (2) the integration with the current IT hospital infrastructures, (3) the compliance with the current international standards in the field, and in the device industry, and (4) the integration with the current clinical workflow.

The NeoMark model will be adapted for clinical implementation, and advanced to include interactivity and simulation functionalities and to dynamically improve prediction accuracy from a variety of multi-scale data.

Finally this enhanced model will be integrated into a web-based modular framework of tools, services and diagnostic devices including:

- i. an Electronic Health Records (EHRs) management and decision support system,
- ii. a multi-source data collection layer, interoperable with legacy hospital systems,
- iii. a highly interactive Knowledge Assisted Visualization and Simulation environment for the "virtual" presentation of patients' data, in line with the "Digital Patient" concept,
- iv. a collaborative decision-making space, the "Virtual Tumour Board", to support the multi-disciplinary approach through the interaction of the different

specialists concerned with treatment decisions,

v. a sophisticated suite for image analysis and feature extraction for head&neck diagnostics

vi. a RT-PCR device and lab-on-chip for fast, precise, quantitative detection of the genomic markers included in the prediction model.

The predictive model will envisage multi-domain data collection (clinical, imaging, histology, genomics, etc.) and will be built on the integration of automated data extraction (i.e. biomarkers and imaging analysis), self-learning automated modelling techniques, and clinical experience of the user.

The scientific objectives of the Oramod project are the identification of the patients with higher risk of relapse and the preclinical diagnosis of tumor recurrence.

Identification of patients with higher or lower risk of recurrence should rationalize the decision to complete the patient's treatment with adjuvant (radio/chemotherapy), limiting the use of such complementary therapies only to patients for whom the therapeutic effects are of paramount importance to justify a still elevated toxicity, as well as to allow the containment of the costs for the S.S.N.. A earlier diagnosis of recurrence would finally allow to perform less demolitive treatments in patients effected by oral carcinoma increasing their quality of life.

In this study the above mentioned results of the Oramod project are presented.

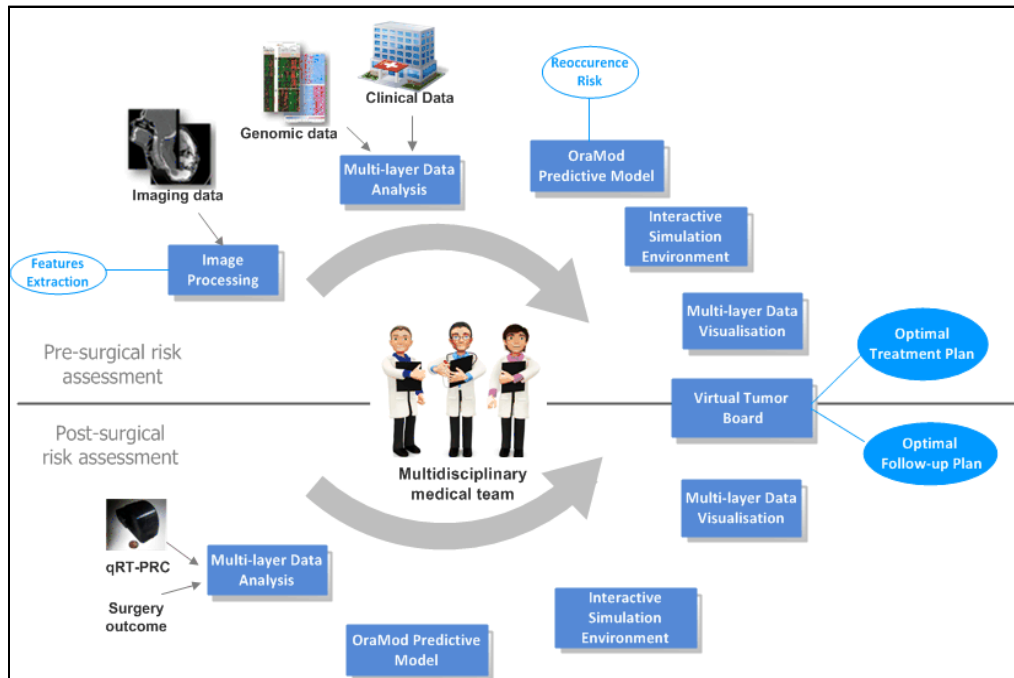


Figure 1. The OraMod clinical scenario

INTRODUZIONE

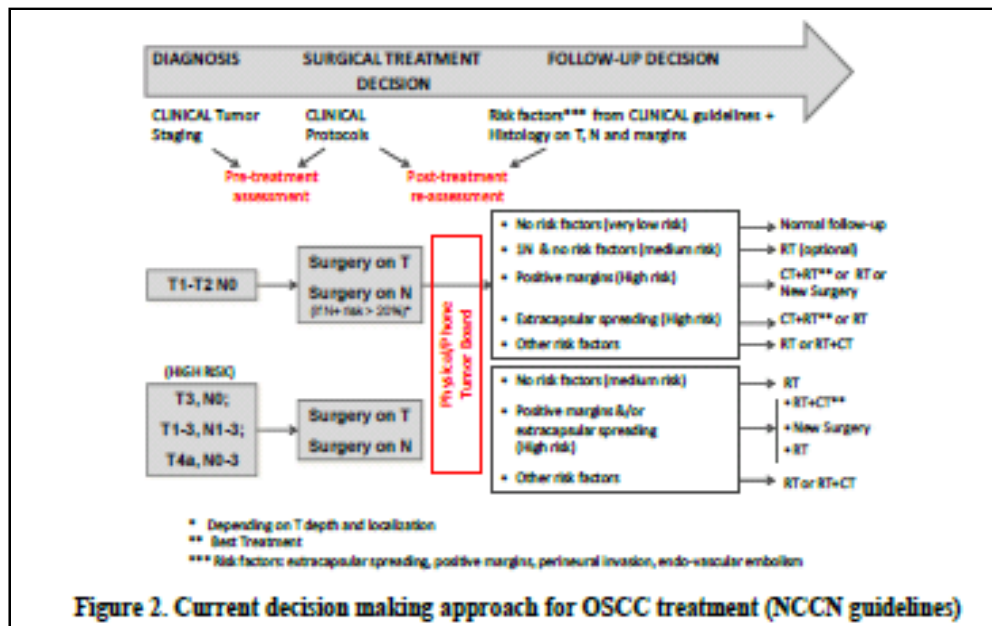
Il cancro del distretto testa e al collo è il settimo tumore per incidenza a livello mondiale; in Europa, ogni anno vengono diagnosticati circa 132.000 nuovi casi, con circa 63.000 morti (1). Il Carcinoma squamocellulare del cavo orale (OSCC) rappresenta almeno il 25% dei tumori nella regione della testa e del collo. Il cancro del cavo orale è spesso diagnosticato in ritardo e ha quindi un basso tasso di sopravvivenza: circa il 50% dei pazienti affetti da questa patologia muoiono entro cinque anni dalla diagnosi. Le recidive della malattia sono frequenti (10-25% dei casi) e si verificano di solito entro 24 mesi dal trattamento del tumore primario. I pazienti con OSCC sono trattati con un approccio multidisciplinare che include chirurgia demolitiva con eventuale ricostruzione, radioterapia e chemioterapia. ¹

Le decisioni terapeutiche sono prese da un team multidisciplinare di chirurghi testa e collo, chirurghi orali e maxillo-facciali, radiologi, oncologi, patologi e radioterapisti. Ogni giorno questi team multidisciplinari devono decidere il piano di trattamento per questi pazienti. Questo processo decisionale è complesso e richiede competenze cliniche diverse: il cancro del cavo orale è infatti una malattia complessa da affrontare terapeuticamente a causa della sua variabilità e imprevedibilità da un lato e per l'impatto estetico e funzionale del trattamento sia per la morbidità post-trattamento dall' altro.

Il trattamento standard più frequentemente adottato per l'OSCC è la chirurgia con o senza radioterapia postoperatoria. Per asportare completamente il tumore e prevenire le recidive di malattia, la chirurgia è spesso estremamente

invasiva. Di conseguenza, il trattamento chirurgico può essere un importante impatto sulla qualità di vita del paziente in quanto associato a deturpazione, difficoltà nell'eloquio e deglutizione (disfagia). Attualmente i clinici basano le loro decisioni su alcuni fattori predittivi, fissati dalle linee guida internazionali (Fig. 2).

Questi includono stadio del tumore, profondità del tumore, invasione linfovaskolare o perineurale, margini chirurgici positivi, stato linfonodale, diffusione extracapsulare ^{2,3} e - in una minoranza di casi (<5%) - fattori infettivi come il papillomavirus umano (HPV) ^{4,5}. Tuttavia, questi criteri non consentono una precisa stratificazione del rischio del paziente perché i fattori prognostici utilizzati non rispecchiano tutti gli aspetti rilevanti della malattia, con particolare riferimento al comportamento biologico, mentre questa lacuna potrebbe essere colmata associando marcatori molecolari e genomici. Potrebbe quindi verificarsi che i pazienti considerati inizialmente ad alto rischio dimostrino invece una bassa incidenza di recidive nel tempo, mentre i pazienti considerati a basso rischio manifestino al contrario tumori estremamente aggressivi e sviluppino precocemente una recidiva.



Una accurata stratificazione dei pazienti a rischio maggiore o minore di recidiva, nonostante condividano la medesima stadiazione, sarebbe importante per utilizzare meglio le risorse, sottoporre a trattamenti adiuvanti chi ne abbia veramente bisogno e applicare un rigoroso follow-up solo in un sottogruppo di pazienti ad alto rischio.

Come già accennato precedentemente, la moderna gestione diagnostico-terapeutica del cancro del cavo orale è quasi universalmente coordinata attraverso un team multidisciplinare (Tumor Board). Le discussioni all'interno di questo gruppo possono essere influenzate da posizioni più forti detenute da diverse specialità. Le opinioni dei membri più accreditati del Tumor Board possono prevalere sulle posizioni degli altri. Di conseguenza le decisioni riguardanti il trattamento dei pazienti sono in qualche modo interpretazioni "soggettive" e negoziate di fattori predittivi standard derivati da linee guida cliniche.

Modelli predittivi in grado di considerare la complessità del cancro del cavo

orale - come nel caso dei modelli VPH – potrebbero garantire una valutazione più "oggettiva" dei fattori predittivi. Il risultato auspicato dal loro utilizzo è un'applicazione meno soggettiva delle linee guida cliniche in un modo più appropriato ed efficace di quello ottenuto oggi. Tali modelli predittivi, nonostante siano utilizzati nella ricerca sul cancro del cavo orale, necessitano di una significativa evoluzione/implementazione delle attuali tecnologie per tradursi con successo nella pratica clinica.

In letteratura sono stati proposti diversi modelli prognostici basati su profili molecolari per HNSCC in generale, o per OSCC in particolare [6-9]. Questi modelli hanno predetto la sopravvivenza delle popolazioni studiate e hanno aggiunto informazioni indipendenti ai fattori prognostici già consolidati. Tuttavia, nessuno di questi modelli è stato introdotto nella pratica clinica. I motivi sono (1) insufficiente validazione clinica dei modelli, (2) la complessità e la mancanza di riproducibilità delle diverse piattaforme di profiling ¹⁰, (3) popolazioni di studio eterogenee per quanto riguarda lo stato dell'HPV e la sottosede del tumore, (4) i costi elevati di profiling trascrittomico e (5) la mancanza di compatibilità con il campione di tessuto FFPE (tessuto paraffinato fissato in formalina). La traduzione di profili di espressione in piattaforme RT-qPCR (utilizzando pannelli di geni selezionati) può superare la maggior parte di questi svantaggi.

Un altro interessante ambito di applicazione dei profili di espressione riguarda i pazienti affetti da OSCC stazioni linfonodali laterocervicali clinicamente e radiologicamente negative per metastasi (cN0). In un precedente studio multicentrico è stato identificato e validato un profilo genomico specifico per questo gruppi di pazienti [11-13]. Tale firma genomica ha stabilito valori predittivi

negativi (NPV) dall'88% al 90% nel sottogruppo clinicamente rilevante. Ad oggi, in pazienti affetti da OSCC con collo N0 il gold standard è rappresentato dalla biopsia del linfonodo sentinella, tecnica che possiede un NPV ancora più elevato (95%) ¹⁴. Nonostante ciò, la biopsia del linfonodo sentinella non è universalmente accettata ed utilizzata, pone maggiori problematiche realizzative ed interpretative per i tumori del pavimento orale e presenta l'ovvio svantaggio di rimanere pur sempre una procedura chirurgica che utilizza traccianti radioattivi, mentre per l'analisi dell'espressione genica è richiesta solo una biopsia. In particolare, l'analisi RT-qPCR di un pannello genico ben selezionato può ulteriormente migliorare la potenza predittiva della firma genomica grazie all'ampia gamma dinamica di RT-qPCR. Abbiamo quindi identificato e testato le firme di espressione genica focalizzando la nostra attenzione su: predizione di metastasi linfonodali (LNM) e sopravvivenza globale (OS). Innanzitutto, le firme genetiche sono state selezionate dai dati di espressione genica mediante metodi di regressione. Successivamente, è stato selezionato un numero limitato di geni per la transizione di piattaforma a RT-qPCR e la potenza prognostica è stata convalidata utilizzando una coorte indipendente di pazienti affetti da OSCC HPV negativi non trattati chirurgicamente. I dati molecolari sono stati ulteriormente combinati con dati clinici e patologici per mettere a punto modelli in grado di predire con maggiore accuratezza la prognosi della malattia e il rischio di metastasi linfonodali e pertanto rendendoli sfruttabili nella pratica clinica.

Il progetto OraMod perseguirà la realizzazione di un ambiente di modellazione e simulazione affidabile volto a supportare le decisioni cliniche per il trattamento

del cancro del cavo orale con due scopi principali:

1. identificare alla diagnosi i pazienti ad alto rischio di recidiva, attraverso la diagnosi precoce di marcatori genomici da biopsie pre-chirurgia e l'identificazione di eventuali di invasioni linfonodali misconosciute su immagini diagnostiche (rischi pre-chirurgici), e
2. riesaminare la previsione del rischio di recidiva del paziente dopo il trattamento (rischi post-chirurgici).

Per chiarire il razionale clinico proponiamo un esempio del futuro scenario di OraMod.

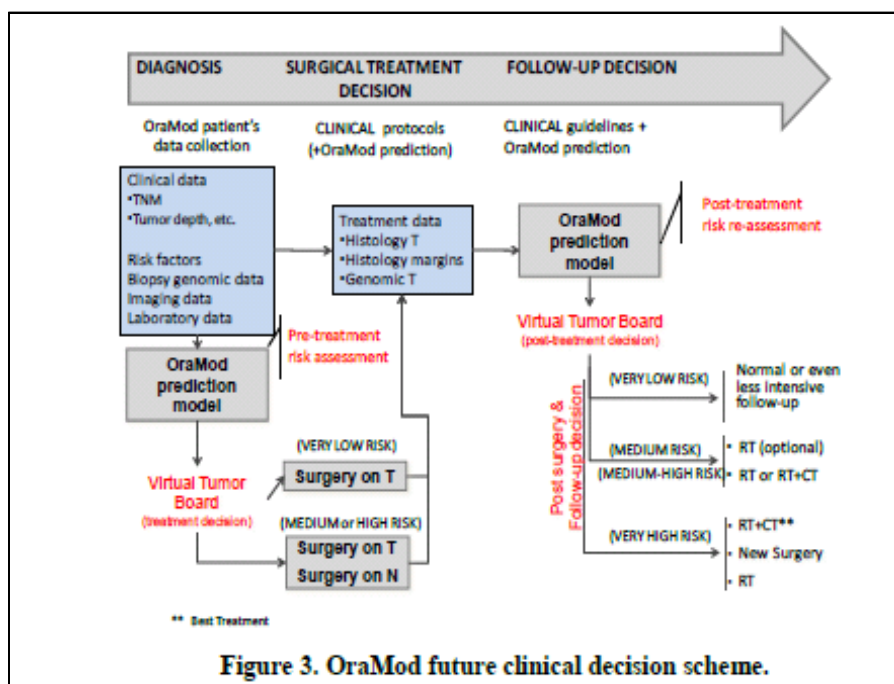
A un paziente viene diagnosticato l'OSCC attraverso l'approccio clinico tradizionale (visita, imaging TC / MRI). Il chirurgo raccoglie i dati clinici ed esegue una biopsia locale. I dati di imaging e gli esami di laboratorio vengono automaticamente aggiunti ai dati clinici nella cartella clinica OraMod del paziente. Grazie all'analisi integrata di dati genomici desunti dalla biopsia e unitamente dati clinici raccolti alla diagnosi, OraMod supporta i medici nella previsione del rischio di recidiva (rischio pre-chirurgico) e stratifica il paziente come ad alto o basso rischio. I dati del paziente sono disponibili in formato digitale per tutti i professionisti coinvolti nel processo di diagnosi e trattamento (radiologi, oncologi, patologi e chirurghi). Ad ogni specialista il "pacchetto" complessivo dei dati del paziente viene presentato con visualizzazioni personalizzate, adattate alle sue esigenze specifiche e vengono fornite opzioni di interazione personalizzate (scorrimento, rotazione, ingrandimento / riduzione) mediante rappresentazioni 3D. Il trattamento chirurgico più appropriato è deciso congiuntamente in base alle informazioni messe a disposizione da OraMod nel

corso del "Tumor Board". Si opterà per interventi chirurgici più aggressivi nel caso di pazienti ad alto rischio; sulla base dei dati di imaging linfonodale estratti dallo strumento di analisi delle immagini OraMod, i chirurghi potranno infine decidere oggettivamente se i linfonodi del collo debbano essere trattati.

Successivamente all' intervento chirurgico il tumore viene analizzato istologicamente e vengono determinati la profondità di invasione, il pattern di crescita, i margini chirurgici e il profilo di rischio di recidiva viene rivalutato sulla base di nuove analisi genomiche utilizzando il dispositivo OraRod-PCR qRT. Di norma, quando l'esame istologico indica che i margini chirurgici risultano interessati da malattia, il paziente viene automaticamente classificato come ad alto rischio.

Il "Tumor Board" decide congiuntamente il trattamento post-operatorio, sulla base delle informazioni messe a disposizione da OraMod (nessun trattamento adiuvante per i casi a basso rischio; radioterapia adiuvante o radio/chemioterapia per i casi ad alto rischio ed eventuale trattamento del collo).

La figura 3 seguente illustra il processo decisionale di OraMod.



I medici possono controllare la bontà/validità della previsione rispetto ai più recenti risultati di ricerca (ad esempio aggiungendo predittori scoperti di recente) e in base alla loro personale esperienza (prediligendo predittori specifici) mediante gli strumenti di simulazione OraMod. Infine, verranno valutati due possibili scenari: (1) il paziente ha un rischio molto basso di recidiva: si esegue un follow-up clinico standard (o anche meno intensivo); o (2) il paziente ha un alto rischio di recidiva: è pianificato un trattamento post-chirurgico adiuvante personalizzato e il paziente viene seguito più assiduamente sia clinicamente che radiologicamente durante le visite di controllo.

VALUTAZIONE DEI PAZIENTI ORAMOD AFFETTI DA CARCINOMA SQUAMOCELLULARE DEL CAVO ORALE

L'approccio scelto da OraMod è quello di adattare alle esigenze cliniche i modelli predittivi VPH esistenti, nonché gli strumenti informatici e i dispositivi diagnostici, applicati con successo nella ricerca. La strategia adottata si basa sui risultati del progetto VPH NeoMark (ICT-VPH-224483), che sarà implementato includendo/prevedendo funzionalità di auto-miglioramento, di modellazione dinamica e simulazione, in grado di adattarsi al progresso della ricerca e al know-how in campo medico.

A tal fine OraMod svilupperà la ricerca lungo tre assi principali:

- i. il perfezionamento dei metodi per l'integrazione e l'analisi di dati multi-scala e multilivello con sofisticate tecniche di modellazione basate su un approccio "graduale",
- ii. la nuova visualizzazione e interazione per la rappresentazione virtuale degli aspetti/parametri di malattia del paziente, in accordo con le direttive fissate/codificate nel paradigma del "Virtual Patient", disponibile sulle più recenti piattaforme tecnologiche per il processo decisionale multidisciplinare e
- iii. l'integrazione nei sistemi IT ospedalieri già presenti e la standardizzazione e certificazione degli strumenti OraMod e dei dispositivi diagnostici per uso clinico.

Per raggiungere il primo obiettivo si è pensato di potenziare/implementare l'approccio già utilizzato in NeoMark (vedi sotto), rendendolo dinamico e interattivo, per consentire l'inclusione del know-how dei medici, la

personalizzazione delle previsioni e delle simulazioni, al fine di aggiungere esperienza ai processi di modellazione "automatica". La procedura graduale proposta per la costruzione del modello risponde a questa esigenza. Nessun modello predittivo sarebbe applicabile per il processo decisionale clinico a meno che non sia consolidato e clinicamente validato. Pertanto, per offrire ai professionisti clinici l'uso del modello VPH, nell'ambito del progetto sarà prodotta evidenza clinica dell'efficacia e dell'utilità di OraMod per mezzo di uno studio clinico condotto su 120-140 pazienti arruolati dagli ospedali partecipanti. Questo studio consentirà di misurare - mediante indicatori quantitativi di prestazione - l'efficacia di OraMod per ridurre la morbilità correlata al trattamento, l'accuratezza della previsione e l'impatto sui costi del SSN.

Per il secondo obiettivo, il progetto si propone di adottare il paradigma del "paziente digitale" e svilupperà funzionalità di "Knowledge Assisted Visualization" altamente interattive per la rappresentazione virtuale delle regioni corporee colpite, per aggregazioni e presentazioni selettive di tutti i fattori correlati alla malattia e per le simulazioni di predizione.

La visione VPH offerta da OraMod consente ai medici di cogliere la complessità della malattia attraverso una quantità limitata di biomarcatori altamente significativi e - allo stesso tempo - di analizzare in profondità e interpretare facilmente tutti i dati che contribuiscono al modello predittivo. Il software OraMod fornisce inoltre una visione complessiva dei meccanismi di evoluzione della malattia. Per facilitare le decisioni congiunte dei diversi specialisti coinvolti nel trattamento dei pazienti affetti da OSCC, l'idea è di integrare OraMod nel flusso di lavoro clinico: la funzionalità "Virtual Tumor Board" faciliterà le

decisioni multidisciplinari attraverso l'accesso dinamico 24 / 24h e 7 / 7 giorni ai dati dei pazienti.

Per il terzo filone di ricerca, saranno adottati gli standard internazionali per la gestione e l'interoperabilità dei dati sulla salute e saranno adottate le linee guida europee per la certificazione dei prodotti come dispositivo medico ¹⁵. La standardizzazione sarà applicata in particolare per garantire l'interoperabilità di diversi prodotti IT già inseriti nelle reti ospedaliere e per consentire acquisizione automatica dei dati (da HIS esistente, LIS, PACS, da dispositivi / sistemi diagnostici) per ridurre la registrazione manuale dei dati e per massimizzare conseguentemente l'accettazione da parte degli utenti. OraMod si propone inoltre di dimostrare il potenziale di nuovi dispositivi diagnostici “point-of-care” per test genomici personalizzati mediante l'uso di un'apparecchiatura portatile RT-PCR, che è conforme agli standard CE e che può essere certificata per specifici target genomici. In questo modo il progetto intende migliorare l'esperienza acquisita in NeoMark e avvicinare i test di genomica al letto del paziente (traslazionalità), con vantaggi significativi in termini di tempi di diagnosi, costi e medicina personalizzata. L'utilizzo di un dispositivo miniaturizzato di RT-PCR ha lo scopo di ridurre i costi dello studio clinico (in particolare dei test di genomica), evitando gli alti costi dei microarray e dimostrare parallelamente che i dati genomici possono essere raccolti e trasferiti automaticamente al Sistema informativo ospedaliero e in particolare alle cartelle cliniche elettroniche del paziente.

Il background interno del progetto NeoMark

Il progetto ICT-VPH-224483 NeoMark ha dimostrato la possibilità di ottenere una bio-firma caratteristica per OSCC grazie a sofisticati algoritmi di analisi e alla modellazione di dati multi-sorgente (clinica, patologica, radiologica, genomica) raccolti in coorti indipendenti di pazienti (in totale: 86 casi) arruolati da tre centri clinici. Questo modello ha identificato un insieme di 35 biomarcatori, indipendenti l'uno dall'altro, che hanno dimostrato di poter predire la ricomparsa del cancro del cavo orale consentendo infine di stratificare i pazienti con basso o elevato rischio di ricomparsa di malattia.

Poiché questo panel di biomarcatori corrispondeva solo in parte con i fattori prognostici attualmente utilizzati nella pratica clinica aggiungendone di nuovi (specie genomici), non ancora riportati in letteratura ¹⁶, in NeoMark si è deciso di includere un profilo genomico più completo, composto da 11 marcatori genomici tissutali (ottenuti mediante un'analisi condotta su ricerche pubblicate). Questo modello ha mostrato un'ottima precisione (91,23), sensibilità (94,7), specificità (87,7) e per questo motivo si è pensato di trasferire questi fattori predittivi in OraMod. NeoMark ha inoltre reso disponibile un web based repository sfruttabile per gestire in modo collaborativo i dati del paziente. La piattaforma NeoMark, pur basandosi su una rappresentazione semantica dedicata (l'ontologia NeoMark), non è pienamente conforme agli standard di Electronic Health Records e di conseguenza necessita di miglioramenti significativi per essere integrata nei sistemi informativi ospedalieri e nel flusso di lavoro clinico della gestione del cancro orale: ecco l'opportunità offerta da Oramod.

Come OraMod integra e va oltre NeoMark

Il principale fattore che limita l'adozione del modello NeoMark VPH nella pratica clinica è la limitata fiducia nella sua affidabilità predittiva: il modello (come per molti modelli basati su data mining, che sono puramente fornitori di dati) viene visto dai medici come una "scatola nera" ciò non consente loro di capire come viene calcolata la previsione e quali fattori prognostici sono etichettati dal modello come "ridondanti". Inoltre i fattori predittivi di NeoMark non includono caratteristiche importanti ben consolidate nella ricerca e riconosciute da linee guida cliniche intenzionali, come i pattern di crescita e i marcatori genomici estratti da biopsie, molto probabilmente perché le informazioni fornite da questi fattori predittivi (investigate a partire dalla pratica clinica) sono ottenute da marcatori alternativi ancora non utilizzati. I profili di espressione saranno quindi sviluppati in un sistema qRT-PCR in OraMod e validati in modo indipendente.

Il modello sviluppato da NeoMark è statico, lo strumento di presentazione e di recupero dei dati offre un'interattività limitata e nessuna capacità di simulazione. La gestione dei dati si concentra sulla loro completa raccolta (necessaria per la costruzione e l'esecuzione del modello) piuttosto che sulla presentazione e visualizzazione interattiva. Nessuna interoperabilità con HIS / LIS / PACS legacy è stata prevista in NeoMark: le limitazioni legate all'acquisizione automatica dei dati sono state imposte dalla necessità di mantenere un ambiente di ricerca distinto dalla rete IT sanitaria. La raccolta dei dati è stata principalmente eseguita con l'input manuale dell'utente.

In Neomark, la potenzialità offerta dalla disponibilità e integrazione dei dati

sembravano pertanto vanificati dal tempo e gli sforzi necessari per utilizzare il sistema nella pratica quotidiana.

OraMod ha mirato fin da subito a superare questi limiti: rendendo trasparente la scelta e dei criteri di modellazione e previsione; offrendo strumenti di modellazione e simulazione interattivi (l'ambiente di simulazione interattiva) specie per ciò che riguarda le interfacce utente, (in particolare il Knowledge Assisted Visualization Environment consentirà al medico di avere punti di vista diversi sulle informazioni del paziente). OraMod stressa la necessità di interoperabilità e integrazione della soluzione proposta con HIS e database esistenti; attraverso l'utilizzo dei principi SOA (Service Oriented Architecture), i servizi sviluppati sono in grado di comunicare e interagire con i sistemi esistenti mantenendo la flessibilità e l'autonomia necessarie per consentire di integrarsi in contesti diversi. La piattaforma OraMod include un'interfaccia dati per permettere l'analisi dei dati acquisiti tramite una qRT-PCR portatile. Utilizzando OraMod, il medico sarà in grado di verificare la previsione del rischio prodotta dal modello in base ai dati del paziente e perfezionare manualmente la previsione dando la priorità ai fattori correlati al rischio (suggeriti dalla sua esperienza e / o dalle linee guida cliniche.)

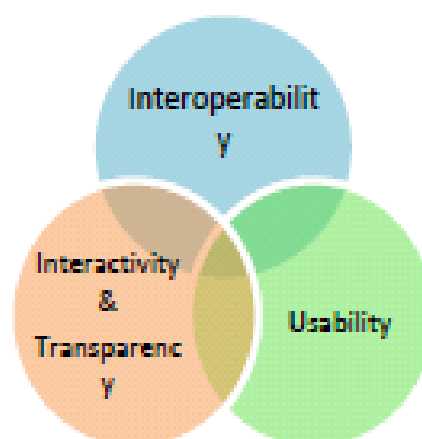


Figure 4. OraMod features

Obiettivi scientifici

L'obiettivo scientifico generale di OraMod è quello di integrare e implementare in ambito clinico tecniche e strumenti di modellazione predittiva basati sull'IT per supportare i medici in due fasi decisionali:

1. predire precocemente il rischio di recidiva di malattia, ovvero stratificare i pazienti con un elevato rischio di recidiva alla diagnosi o immediatamente dopo il trattamento primario (valutazione del rischio pre-chirurgico);
2. adattare il trattamento al rischio di recidiva del singolo paziente e pianificare in modo più accurato le terapie post-trattamento al fine di ridurre le possibilità di ricaduta (valutazione del rischio post-chirurgico).

Per raggiungere questi obiettivi il progetto contempla le seguenti fasi scientifiche:

1. definizione di uno strumento di modellizzazione predittiva interattivo, trasparente, affidabile e accurato basato sull'analisi aggregata di dati multiscala e multilivello raccolti da casi OSCC retrospettivi, a partire da un bioprofilo stabilito dal precedente progetto NeoMark, e
2. validazione clinica della modellizzazione predittiva e della simulazione su una coorte indipendente di pazienti OSCC al fine di supportare le decisioni terapeutiche per il trattamento e il follow-up.

Da quanto sopra possiamo individuare i seguenti obiettivi scientifici di OraMod:

Obiettivi primari:

- Verificare l'accuratezza predittiva del modello per la stratificazione del rischio del paziente.

- Verificare se uno strumento di modellazione che combini dati clinici, di laboratorio, istologici, di imaging e genomici dal tumore migliori la predizione del rischio di recidiva nel cancro del cavo orale rispetto ai criteri di stratificazione standard dei pazienti.
- Verificare se l'approccio OraMod e la piattaforma informatica possono essere applicati nella pratica clinica per fornire informazioni più accurate sulla prognosi OSCC e sulla scelta di una terapia personalizzata.

Obiettivi secondari:

- Valutare nuove modalità di previsione del rischio di recidiva (con possibile inclusione nelle linee guida cliniche internazionali.)
- Verificare la flessibilità del sistema OraMod, ossia consente flessibilità per l'inclusione di nuovi biomarcatori.
- Verificare se la fusione avanzata di immagini e le tecniche di segmentazione automatica dei tumori e dei linfonodi possono migliorare l'accuratezza diagnostica per i radiologi e consentire la stadiazione dei linfonodi.
- Verificare se la tecnologia qRT-PCR portatile lab-on-chip possa essere utilizzata con successo nella pratica clinica per l'analisi di dati genomici su target specifici.
- Verificare se l'RNA isolato da un campione di tessuto incluso in paraffina fissato in formalina possa essere utilizzato per la profilazione genomica, in alternativa al material genetico estratto da tessuto fresco.
- Valutare se l'eterogeneità intra-tumorale influenza le prestazioni del sistema.
- Verificare se piccole biopsie prelevate durante le visite sono adatte al profiling genomico.

Materiali e metodi

Protocollo per la raccolta dei dati clinici

I dati clinici sono stati raccolti direttamente dal medico responsabile (ricercatore biomedico - clinico o investigatore clinico) alla prima visita del paziente.

Tali dati clinici includono informazioni anamnestiche (quali parametri fisici, fattori di rischio e anamnesi familiare rilevante per la malattia); localizzazione delle lesioni, la loro dimensione e aspetto, rilevati nel corso dell' esame obiettivo del cavo orale, dati ricavabili da referti degli esami di laboratorio,diagnostic per immagini, analisi istologiche (se disponibili).

Dati clinici

Se l'esame istologico definitivo condotto su biopsia incisionale della lesione conferma una diagnosi di OSCC, il paziente viene considerato lo studio Oramod, e la decisione finale viene presa tenendo presenti I criteri di inclusion ed esclusione (vedi tabelle seguenti).

INCLUSION CRITERIA
1. Signed informed consent
2. No received prior cancer treatment or tissue samples taken before or at the same time of surgery if first cancer treatment
3. Histologically confirmed diagnosis of oral squamous cell carcinoma or oropharyngeal carcinoma
4. Pathological stage, any T, any N, M0
5. Patient is candidate for curative treatment
6. Adequate tumor specimen available
7. Male or female older than 18 years old
8. ECOGperformance status 0, 1, 2 or 3 (see follow table)
9. Life expectancy of at least 6 months
10. Patients without auto-immune diseases

Tabella 1: criteri di inclusione adottati nel progetto Oramod

ECOG PERFORMANCE STATUS: i valori indicano la valutazione complessiva della capacità del paziente di svolgere attività quotidiane. I valori sono riportati nella tabella 2 di seguito.

Value	Description
0	Fully active, able to carry on all pre-disease performance without restriction
1	Restricted in physically strenuous activity but ambulatory and able to carry out work of a light or sedentary nature, e.g. light house work, office work
2	Ambulatory and capable of all selfcare but unable to carry out any work activities. Up and about more than 50% of waking hours
3	Capable of only limited selfcare, confined to bed or chair more than 50% of waking hrs
4	Completely disabled. Cannot carry on any selfcare. Totally confined to bed or chair
5	Dead

Tabella 2: ECOG PERFORMANCE STATUS

EXCLUSION CRITERIA
Patients with either: any sort of malignant tumour in head and neck previous squamous cell carcinoma treatment up to 10 years before enrollment
2. Hystological type other than OSCC
3. Clinically relevant granulomatous pathologies past or active or any other disease affecting immune and lymphatic system
4.-Evidence of distant metastases or gross post-operative residual disease
5. Psychiatric disorders or any other problems affecting the compliance of the patient
6. HIV positive
7. Chronic current concomitant treatment with: Corticosteroids or other immuno-suppressant drugs NSAIDs Immuno-stimulants Immuno-stimulants specific for allergies

8. Chronic lung diseases except untreated patients or treated with inalatory beta-agonist only
9. Radiological artifacts in the same plane of the tumor
10. Any kind of pathological condition which may condition the proper treatment of patient

Tabella 3: criteri di esclusione adottati nel progetto Oramod

Protocollo per la raccolta dei dati radiologici

Per quanto riguarda la diagnostica per immagini, il paziente viene stratificato mediante CT e/o MRI del massiccio facciale e collo (con e senza mdc). L'esame radiologico (CT e/o MRI) viene eseguito sia nel preoperatorio che ogni sei mesi durante il followup. Ciascun dato di imaging deve essere correlato a una data e dalla visita specifica (l'imaging di follow-up deve essere identificato). I dati di imaging devono essere registrati e trasferiti al sistema Oramod in formato DICOM, insieme a informazioni aggiuntive (data dell'esame, note, file pdf di riferimento).

I dati sono di due tipi: inserimento manuale dal radiologo; input automatico dall'estrazione delle caratteristiche imaging analizzate direttamente dal tool di Oramod. Questi dati necessitano pertanto di convalida da parte del radiologo prima di essere accettati.

Lo strumento di estrazione delle immagini di Oramod estrae le caratteristiche dalle immagini e le propone al radiologo, che deve controllarle (e eventualmente correggerle) prima di registrarle nella cartelle cliniche di OraMod.

Per quanto riguarda l'acquisizione delle immagini devono essere soddisfatti i

seguenti requisiti minimi :

TAC

Requisiti strutturali:

multislice CT scan (MDCT) ;

workstation e software per la ricostruzione 2D e 3D;

possibilità di esportare dati DICOM su CD o su file da trasferire a OraMod;

possibilità di estrarre e scaricare i referti in formato elettronico (file txt, pdf).

Requisiti di qualità dell'immagine:

nessun movimento o artefatti metallici nel piano del carcinoma;

buon miglioramento del contrasto;

Imaging ad alta risoluzione con spessore di 5 mm o inferiore e ricostruzione

multiplanare (MPR): ricostruzione assiale, coronale e sagittale.

Tutti gli esami devono essere eseguiti senza e con mezzo di contrasto.

MRI

Requisiti strutturali:

- high field MR imaging : 1.5 Tesla o più;

- bobina del collo;

- workstation per la valutazione dei dati;

- possibilità di esportazione di dati DICOM su CD o su file da trasferire su

OraMod

- possibilità di estrarre e scaricare i referti in formato elettronico (file txt, pdf).

Requisiti di qualità dell'immagine:

- assenza di movimento o artefatti metallici nei piani pertinenti;
- buon miglioramento del contrasto;
- Protocollo di scansione ad alta matrice (512) e basso spessore (3 mm):
 1. T1 e T2 (TSE) - assiali,
 2. T2 (TSE) - coronale,
 3. T1 fat-sat dopo somministrazione di mezzo di contrasto - ricostruzione assiale, coronale e sagittale.

Tutti gli esami devono essere eseguiti senza e con mezzo di contrasto

La serie di sequenze RM completa che abbiamo utilizzato per questo studio è la seguente:

- o T2 TSE SPAIR coronale
- o T1 TSE assiale
- o T2 TSE assiale
- o T1 SE SPIR + contrasto assiale
- o T1 SE SPIR + contrasto coronale
- o T1 SE SPIR + contrasto sagittale

(in casi selezionati aggiungiamo un'altra sequenza chiamata tecnica Diffusion MRI).

Protocollo di raccolta dei dati anatomopatologici

I requisiti minimi del laboratorio per analisi anatomopatologiche ed immunoistochimiche sono le seguenti specifiche:

- Laboratorio di istopatologia standard disponibile
- Strutture per la documentazione fotografica di campioni chirurgici
- Strutture per analisi immunoistochimiche inclusi coloranti automatici
- Strutture per la conservazione di campioni biologici a -80 ° C o inferiori

Le analisi anatomopatologiche si basano sulle seguenti fasi operative:

- dissezione grossolana e campionamento di campioni chirurgici,
- esame istopatologico,
- analisi immunoistochimica,
- Rilevamento e digitazione del DNA HPV

Il patologo deve inserire questo tipo di dati nella tabella elettronica.

Dissezione e campionamento dei campioni chirurgici

I margini chirurgici vengono inchiostriati e accuratamente esaminati insieme a campioni rappresentativi di mucosa non neoplastica.

I campioni per la crioconservazione sono prelevati dal patologo dopo l'esame iniziale dell'intero campione chirurgico (pezzo operatorio) assicurandosi di incorporare campioni significativi del tumore analisi.

Il materiale di svuotamento laterocervicale del collo viene suddiviso in livelli (I-

V) in base ai limiti anatomici e ai segni chirurgici. Verranno registrati il numero di linfonodi per ciascun livello.

La stadiazione patologica verrà eseguita secondo il sistema di stadiazione TNM.

Esame istopatologico

Le variabili anatomopatologiche ed istopatologiche specifiche saranno valutate secondo i seguenti criteri:

- Diametro massimo del tumore (in mm)
- Spessore del tumore (in mm)
- Profondità di invasione (in mm)
- Livello di invasione (in mm)
- Pattern di invasione (spinta, bande, corde o isole, celle singole, basaloidi Caratteristiche)
- Reazione linfo-plasmacitaria (nessuna, lieve, moderata, marcata)
- Invasione linfovaskolare
- Invasione perineurale
- Grado di cheratinizzazione cellulare
- Pleomorfismo nucleare
- Numero di mitosi per 10 HPF

Sistemi di punteggio semiquantitativo come quelli proposti da Martinez-Gimeno e Anneroth vengono utilizzati per stratificare i tumori in classi di rischio.

Per le metastasi linfonodali, il numero di linfonodi metastatici per ciascuna

stazione viene registrato insieme alla dimensione dei principali linfonodi metastatici. L'analisi immunoistochimica con un panel di reagent anti pancitocheratina viene utilizzata per rilevare la presenza di eventuali micrometastasi e metastasi a singola cellula (ICT).

Protocollo genomico

Per le analisi genomiche volte a identificare i geni correlati alle metastasi linfonodali e all'Overall Survival sono state utilizzate quattro coorti indipendenti di pazienti HPV negative affetti da OSCC per i quali erano disponibili campioni di tessuto biotico congelato così suddivise: (1) coorte di 150 pazienti reclutati presso l'University Medical Center di Utrecht (UMCU) e il VU University Medical Center di Amsterdam (VUMC) (array cohort 1, AC1) e (2) coorte di 99 pazienti reclutati presso l'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma (AOUP) (array cohort 2, AC2) utilizzate per l'analisi del profilo di espressione genica mediante microarray; (3) coorte di 125 pazienti provenienti da VUMC, UHPMC e dall'University Hospital di Düsseldorf (UHD) per la determinazione dell'espressione genica mediante qPCR (coorte qPCR); (4) dataset di RNAseq di tumori OSCC HPV negativi depositato nella banca dati Cancer Genome Atlas Network ¹⁷.

I criteri di inclusione ed esclusione sono stati: I. diagnosi di carcinoma a cellule squamose della cavità orale con data di diagnosi prima del 1 luglio 2012 e trattati chirurgicamente con intento curativo; II. pazienti di almeno 18 anni compiuti e non avevano sviluppato precedenti neoplasie; III. Esclusione da ulteriori analisi se tumori risultati positivi al virus umano del papilloma (HPV). Il consenso informato è stato ottenuto dai pazienti inclusi seguendo, se richiesto, le vigenti leggi di ogni singolo paese della Comunità Europea coinvolto; ad esempio, nel caso specifico di pazienti arruolati nei Paesi Bassi, l'uso di tessuti residui da campioni chirurgici è conforme al Codice di condotta della Federation of Dutch Medical Scientific Societies (FDMSS). Questo studio ha seguito le

linee guida previste per gli studi sui marker tumorali REMARK (Reporting of tumor MARKer Studies) ¹⁸.

Le biopsie tumorali sono state prelevate dal campione chirurgico (pezzo operatorio) al momento dell'intervento, immediatamente congelate e successivamente conservate in azoto liquido. Sono state utilizzate da cinque a dieci sezioni da 20 µm per l'isolamento dell'RNA. Prima e dopo il campionamento delle sezioni da 20 µm, sezioni da 5 µm sono state selezionate e colorate mediante ematossilina ed eosina per assicurare che almeno il 50% delle cellule tumorali fosse presente. L'isolamento dell'RNA è stato eseguito utilizzando il reagent TRIzol (Cat. 15596026, Life Technologies, Breda, Paesi Bassi; AC1) o mediante colonnine di estrazione utilizzando l'RNeasy Mini Kit (Cat. 74104, Qiagen, Hilden, Germania; coorte AC2 e qPCR) secondo i rispettivi protocolli dei fornitori. La positività o meno all'HPV nella coorte AC1 è stato determinato con immunocolorazione p16 seguita da PCR su DNA sui campioni p16-positivi in AC1 o con HPV16 E6 *I RT-PCR sulla coorte qPCR. In AC2, lo stato HPV non è stato determinato. In AC1 è risultato positivo 1 campione su 151 e 1 su 126 per la coorte qPCR, quindi, il contributo dei tumori HPV positivi in AC2 è stato assunto basso e nessun ulteriore campione è stato escluso. La quantità e la qualità dell'RNA sono state testate mediante Nanodrop (Cat. ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Amsterdam, Paesi Bassi) e Bioanalyzer 2100 (Cat. G2939AA, Agilent Technologies, Amstelveen, Paesi Bassi) utilizzando l'RNA Nanokit (cat. 5067-1511, Agilent). I numeri di integrità dell'RNA (valore RIN) sono risultati compresi tra 6,3 e 10,0.

Analisi d'espressione mediante Array

Per le analisi di espressione genica mediante tecniche microarray sono state utilizzate le due coorti indipendenti di pazienti affetti da OSCC AC1 e AC2. In AC1, è stata eseguita l'ibridazione dell'array con 0,5 µg di RNA totale utilizzando Low RNA Input Linear Amplification Kit (Cat. 5184-3523, Agilent) e gli array 4x44K Whole Human Genome (Agilent) utilizzando la tecnica della doppia colorazione. In AC2, 0,2 µg di RNA totale è stato colorato e contemporaneamente amplificato seguendo il "Protocollo di analisi di espressione genica basata su microarray a due colori (Quick Amp Labelling)" (Agilent Technologies). I campioni di RNA marcati sono stati quindi ibridizzati su vetrini per microarray come per AC1 secondo le istruzioni del produttore. Per la lettura degli array e seguente estrazione dei dati, è stato utilizzato lo scanner G2505B US45102976 (Agilent Technologies) con il software Feature Extraction (FE) v 9.5.1.1 e protocollo Gene Expression GE2- v5_95_Feb07 sono stati utilizzati per analizzare i vetrini di microarray rispettivamente.

Preelaborazione dei dati dei microarray

I dati di espressione genica AC1 (generati presso VUmc) sono stati preelaborati in modo identico a quelli precedentemente preelaborati presso UMCU ¹⁹. Questo ha previsto: 1) l'estrazione del segnale mediano dai file di dati grezzi senza correzione di fondo e 2) la normalizzazione di matrice entro lo spettro come implementata nel pacchetto Limma (<http://www.bioconductor.org>). I set di dati VUmc e UMCU preelaborati sono stati combinati limitando sonde che si sono sovrapposte (usando i loro identificatori di sonda Agilent). Infine, la comparabilità dei dati di espressione di entrambi i centri è stata assicurata da a)

normalizzazione della matrice tra gli array (Aquantile come implementata nel pacchetto Limma) e b) rimozione di eventuali effetti batch (cioè centrali) utilizzando il Combatch-package²⁰. I dati grezzi e quelli elaborati sono disponibili pubblicamente nel database GEO (gene expression omnibus) (GSE85446).

I dati di AC2 non sono stati combinati con gli altri set di dati, a causa di un diverso campione di riferimento: Universal Human Reference RNA (Cat. 740000, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) in AC1 e RNA proveniente da un pool di linee cellulari di OSCC umano in AC2 (CAL 27, ATCC CRL-2095, American Type Culture Collection, Manassas, VA). I dati AC2 sono stati preelaborati come per il set di dati AC1. Sono state eliminate le sonde con oltre il 20% di valori mancanti. AC2 consisteva di 106 campioni, ma 7 sono stati esclusi a causa di grafici MA di scarsa qualità. Per l'analisi LNM, altri due pazienti sono stati esclusi perché mancava la stadiazione linfonodale. I dati grezzi e processati sono registrati nel database GEO (gene expression omnibus) (GSE84846).

Selezione genica

Per la selezione dei geni sono stati esclusivamente utilizzati dataset con risultati significativi ($p < 0,05$). Abbiamo così ottenuto risultati statisticamente significativi sia per AC1 sia per AC2 (AC1, $p = 9.3E-06$; AC2, $p = 9.9E-03$), che sono stati utilizzati per la selezione dei geni predittivi. Per la previsione della sopravvivenza, solo la coorte AC1 ha fornito un valore predittivo statisticamente significativo (AC1, $p = 7.8E-3$; AC2, $p = 0.73$) ed è stato utilizzato per ulteriori analisi. Questa differenza tra AC1 e AC2 è probabilmente spiegabile tenendo conto del periodo di follow-up più breve in AC2 rispetto a AC1 (tempo medio

complessivo di follow-up AC1:4,7 anni (SD = 3,2) e AC2:3,0 anni (SD = 1,5)).

La selezione dei geni si è basata su analisi univariate e multivariate con uguale contributo all'esito finale (50% dei geni dall'analisi univariabile, il 50% dall'analisi multivariata). Per la selezione multivariata il nostro scopo è stato quello di giungere a un insieme ottimale di geni. Considerando che la fase di selezione utilizza un gran numero di geni provenienti da una serie limitata di campioni, è prevedibile che alcuni geni non possano essere validati. Inoltre, la transizione di piattaforma da noi eseguita aumenta la probabilità che i geni non possano essere convalidati, anche se questo è in qualche modo controbilanciato dalla convalida tecnica. Per questo motivo abbiamo previsto una certa ridondanza nei geni selezionati. Questo si ottiene meglio selezionando quei geni che hanno il più alto rapporto segnale / rumore (ad esempio basso p-value). Il numero totale di geni selezionati era limitato a 60 geni di interesse a causa del design della scheda per l'analisi qPCR mediante array adottata (60 geni bersaglio + 4 geni housekeeping, con 3 replicati e 2 campioni per array). L'analisi univariata includeva i t-test (LNM) e la regressione di Cox (sopravvivenza globale). I valori p LNM di AC1 e AC2 sono stati combinati con il valore p combinato di Fisher. I valori di P sono stati aggiustati con la procedura di Benjamini-Hochberg per controllare i tassi di falsi scoperti (FDR) ²¹. L'analisi multivariata si è basata sulla regressione logistica (LNM) e regressione di Cox (sopravvivenza globale). Per LNM, le frequenze di selezione di AC1 e AC2 sono state sommate. Successivamente abbiamo selezionato quei geni che sono stati utilizzati più spesso nei modelli. Per la sopravvivenza, i modelli sono stati testati con e senza aggiunta di stadio patologico di malattia (pTNM) e di età come variabile

covariata non sottoposta a test, ma le aggiunte non hanno modificato considerevolmente la lista dei geni selezionati.

Per ridurre la dimensionalità e arricchire il numero di geni predittivi rilevanti, sono state utilizzate le signature genetiche precedentemente pubblicate relative all' HNSCC. Per LNM, abbiamo usato un profilo genico di LNM precedentemente pubblicato [22-23] composto da 732 sonde, che è stato successivamente validato in uno studio multicentrico ¹⁹. Per la sopravvivenza mancavano signature geniche prognostiche accuratamente validate; pertanto, abbiamo combinato una serie di 9 profili di espressione genica prognostica [24-32] (1.426 sonde) e un profilo prognostico di geni per i quali le alterazioni del numero di copie e l'espressione genica mostravano le migliori correlazioni (348 sonde). Questo profilo di sopravvivenza combinato consisteva in 1.762 sonde. 20 geni sono stati selezionati dal profilo di sopravvivenza combinato (1762 sonde) e sono stati selezionati 20 geni da analisi che includevano tutte le sonde (37.622 sonde in AC1).

Quantitative real-time PCR

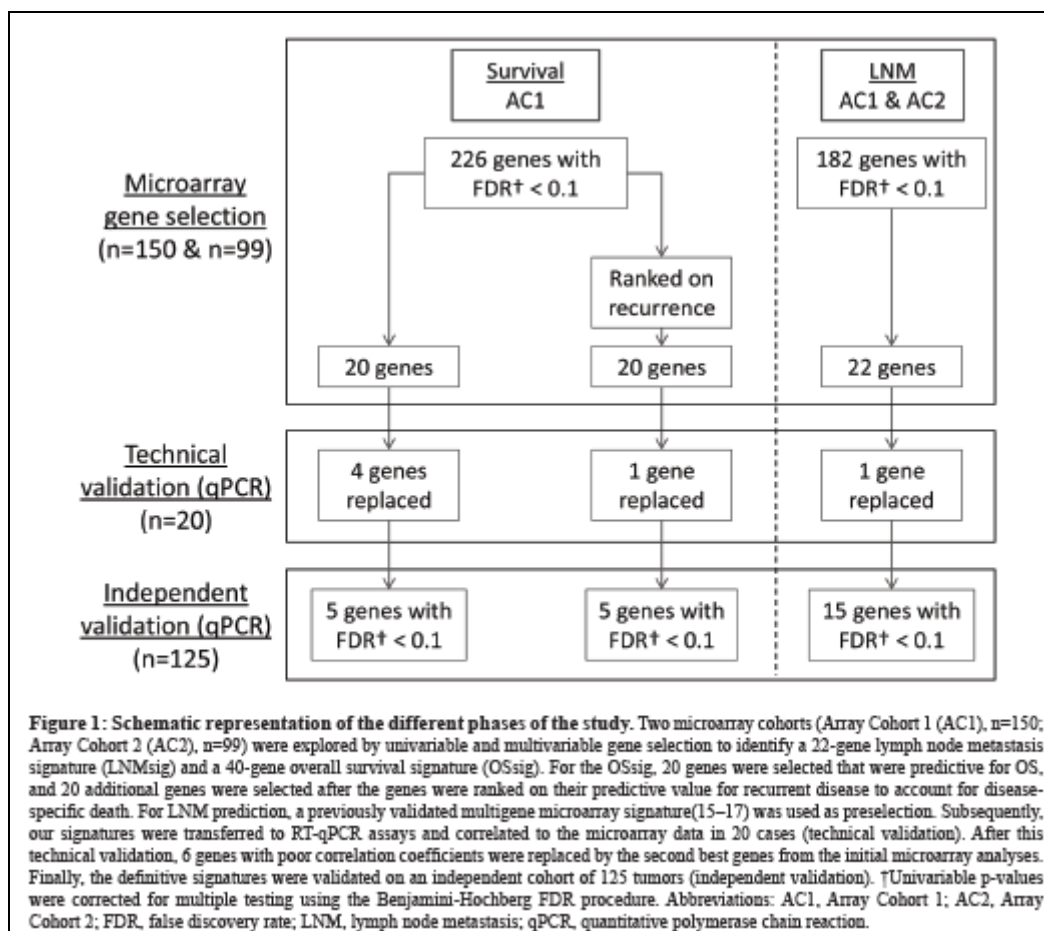
Per la realizzazione delle analisi di real-time PCR è stata progettata una scheda TLDA (Taqman Low-Density Array) a 384 pozzetti con i 60 geni prognostici selezionati + 4 geni di housekeeping (GAPDH, GUSB, RPL4, RPLP0). Ciascun saggio di espressione genica era rappresentato da 3 replicati. Il progetto iniziale (TLDA.v1) e il design ottimizzato (TLDA.v2) dopo la convalida tecnica (vedi sotto) sono mostrati nella Tabella supplementare 2. Un µg di mRNA è stato trattato con DNase I, Amplification Grade (Cat 18068015, Invitrogen; Carlsbad , CA) in un volume di reazione di 10 µl. L'mRNA trattato con DNase è stato

successivamente utilizzato per la sintesi del cDNA con il kit RNA-to-cDNA ad alta capacità (cat 4387406, Applied Biosystems, Foster City, CA) in un volume di reazione di 24,4 microlitri. La miscela di reazione qPCR consisteva in (1) 20 µl di cDNA (819 µg), (2) 190 µl di acqua e (3) 210 µl 2X Master Mix TaqMan (cat 4369016, Applied Biosystems). Successivamente, la miscela di reazione è stata caricata sulle schede TLDA in base al protocollo del fornitore. Sono stati analizzati contemporaneamente 2 campioni per scheda TLDA. Gli esperimenti sono stati eseguiti sul sistema PCR real-time Fast 7900HT ABI Prism (cat. 4329001, Applied Biosystems). Le condizioni del ciclo termico erano: 50 ° C per 2 minuti; 94,5 ° C per 10 minuti; 40 cicli di denaturazione a 97 ° C per 30 secondi con annealing e estensione a 59,7 ° C per 1 minuto.

Analisi dell'espressione genica dai dati qPCR

Per ogni reazione qPCR, il valore Ct è stato determinato come numero di ciclo in corrispondenza del quale il segnale di fluorescenza raggiungeva una soglia fissa utilizzando la versione 1.2.2 di SDS RQ Manager (Applied Biosystems).

Successivamente, i valori Ct sono stati normalizzati al livello di espressione di GUSB, che era il gene housekeeping più stabile tra quelli analizzati. Per selezionare il gene housekeeping più stabile, abbiamo determinato la deviazione standard dell'espressione genica in tutti i campioni e la correlazione del gene housekeeping con l'espressione genica media di tutti i geni target: GUSB aveva sia la SD più bassa (SD = 0.94) sia la più alta correlazione all'espressione media di tutti i geni target ($r = 0.77$).



Validazione tecnica qPCR

I 60 geni target selezionati sono stati validati tecnicamente utilizzando un sottoinsieme di 20 casi ottenuti da AC2 per valutare la transizione della piattaforma. I dati sono stati pertanto correlati ai dati dell'array degli stessi campioni. Questi 20 casi sono stati selezionati per garantire un rapporto 1: 1 di casi N0 / N + e pazienti sopravvissuti / deceduti. Per questi 20 casi, i coefficienti di correlazione di Pearson sono stati calcolati tra microarray e corrispondenti dati qPCR (Tabella Supplementare 3). La scarsa correlazione è stata definita come una r di >1 SD al di sotto della media e un valore $p > 0,1$ (a causa della piccola dimensione del campione). Le analisi di regressione Logistica e Cox sono state impiegate per determinare le prestazioni predittive dei geni in questa

coorte.

In totale, 52 di 60 geni sono stati validati correttamente, poiché hanno mostrato una buona correlazione tra microarray e dati RT-qPCR (media $r = 0,64$, $SD = 0,26$). I restanti 8 geni erano scarsamente performanti, mostrando un coefficiente di correlazione > 1 SD al di sotto della media. Tuttavia, la regressione di Cox ha indicato che due di questi otto geni erano correlati alla sopravvivenza, cioè EIF5 ($P = 0,011$) e ATP6V0A1 ($P = 0,057$), e questi sono stati quindi mantenuti nel pannello. I restanti 6 geni sono stati sostituiti dai secondi migliori geni dell'analisi iniziale dei microarray e successivamente analizzati.

Validazione indipendente dei geni selezionati mediante RT-qPCR

La coorte di convalida RT-qPCR ha compreso 125 casi OSCC che erano indipendenti rispetto alle due coorti di pazienti utilizzate per le analisi microarray. In questa coorte di validazione, le metastasi linfonodali sono state rilevate nel 51,2% dei pazienti e il tempo di follow-up complessivo mediano è stato di 5,1 anni (IC 95% = 4,4 - 6,3) (Tabella 1). I geni selezionati sono stati testati su schede RT-qPCR personalizzate e i risultati sono stati testati mediante analisi univariabili e corretti per test multipli. Dalla LNMsig 15 di 22 geni avevano un $FDR < 0,1$ (Tabella supplementare 4). Da OSSig 10 di 40 geni avevano un $FDR < 0,1$ per OS, sette dei quali anche significativamente associati alla sopravvivenza libera da malattia (DFS). Pertanto, dopo la correzione per test multipli, in totale 25 dei 60 geni selezionati dai dataset di microarray potevano a questo punto essere validati con saggi RT-qPCR in una coorte di pazienti

indipendenti.

Characteristic	Array Cohort 1 (n = 150)	Array Cohort 2 (n = 99)	qPCR Cohort (n = 125)	TCGA Cohort (n = 160)	P ^b Value
Age, mean (SD)	62 (10.7)	66 (10.3)	63 (12.6)	62 (13.6)	P=0.06
Gender					
Male (%)	90 (60.0)	54 (54.5)	72 (57.6)	105 (65.6)	P=0.30
Female (%)	60 (40.0)	45 (45.5)	53 (42.2)	55 (34.4)	
Smoking (PY)					
0-10 (%)	36 (24.0)	51 (51.5)	41 (32.8)	47 (29.4)	P<0.001
11-24 (%)	19 (12.7)	10 (10.1)	13 (10.4)	13 (8.1)	
>24 (%)	95 (63.3)	38 (38.4)	71 (56.8)	60 (37.5)	
Unknown (%)	-	-	-	40 (25.0)	
Subsite					
Oral tongue (%)	53 (35.3)	41 (41.4)	48 (38.4)	-	P=0.62
Other oral cavity (%)	97 (64.7)	58 (58.6)	77 (61.6)	-	
TNM stage					
I (%)	18 (12.0)	22 (22.2)	16 (12.8)	10 (6.3)	P=0.02
II (%)	22 (14.7)	12 (12.1)	27 (21.6)	32 (20.0)	
III (%)	31 (20.7)	21 (21.2)	26 (20.8)	25 (15.6)	
IV (%)	79 (52.7)	44 (44.4)	56 (44.8)	82 (51.3)	
Unknown (%)	-	-	-	11 (6.9)	
N-stage					
Negative (%)	60 (40)	48 (48.5)	61 (48.8)	57 (35.6)	P=0.35
Positive (%)	90 (60)	49 (49.5)	64 (51.2)	76 (47.5)	
Unknown	-	2 (2.0)	-	27 (16.9)	
pCompVar ^c					
Negative (%)	-	-	79 (63.2)	-	
Positive (%)	-	-	38 (30.4)	-	
Unknown (%)	-	-	8 (6.4)	-	

Abbreviation: pCompVar, pathological composite variable; PY, packyears; SD, standard deviation.
a. Percentages may not total 100 because of rounding.
b. P values were calculated with the use of One-Way ANOVA for continuous variables and χ^2 test for categorical variables.
c. Scored positive if extracapsular spread or positive resection margins or >1 lymph node metastasis was present.

Validazione esterna con dataset RNAseq TCGA

Solo i 279 pazienti tratti dalla pubblicazione Cancer Genome Atlas Network ¹⁷ sono stati utilizzati per questa analisi, poiché lo stato HPV derivato da RNAseq, considerato il più accurato, non era disponibile per l'altra coorte di pazienti. Di questi casi, i dati RNASeqv2 TCGA normalizzati sono stati scaricati con il pacchetto R TCGA2STAT. Sono stati considerati solo i tumori negativi per HPV della cavità orale (n = 160). Per le metastasi linfonodali, sono stati esclusi i

pazienti con stadio patologico NX; i pazienti arruolabili per metastasi linfonodali (LNM) sono quindi risultati 133. Per OS il tempo di sopravvivenza era disponibile in 159 pazienti eligibili per l'analisi. L' outcome di LNM è stato definito come con uno stadio N patologico maggiore di 0. Dei 60 geni selezionati sui dati di microarray, 1 gene non poteva essere confrontato con i dati TCGA (LRCOL1). Prima dell'analisi i dati sono stati convertiti prendendo la radice quadrata e ridimensionandoli (ad esempio tutti i geni trasformati a zero per media e varianza). Sia per OS che per LNM, il test globale è stato utilizzato per valutare l'associazione con le firme genomiche. Ulteriori prestazioni predittive sono state valutate adattando e iniziando il modello di regressione logistica (per LNM) e Cox (per OS) con ridge regression.

Istopatologia

I vetrini FFPE dei campioni chirurgici sono stati esaminati da due patologi specializzati sull'OSCC, secondo le linee guida del Royal College of Pathologists UK (<https://www.rcpath.org/resourceLibrary/dataset-for-histopathology-reporting-of-mucose-tumori-of-the-oralcavity.html>). I tumori sono stati stadiati secondo la classificazione TNM dei tumori maligni, 7a edizione, pubblicata in affiliazione alla Union for International Cancer Control (UICC). Lo stato dei margini è stato valutato e suddiviso in tre gruppi: (1) margini coinvolti quando il carcinoma era presente entro 1 mm dal margine, (2) margini negativi quando il carcinoma asportato era > 5 mm dal margine chirurgico e (3) margini vicini quando il tumore era a 1-5 mm dal margine chirurgico ³³. Per la costruzione del modello, lo stato del margine è stato successivamente

suddiviso in due gruppi: margini coinvolti quando il carcinoma era presente entro 1 mm dal margine (R +); o margini negativi, quando il carcinoma asportato era > 1 mm dal margine chirurgico (R0). La presenza di metastasi linfonodali (LNM) è stata determinata mediante esame istopatologico su materiale di dissezione del collo se presente. Nelle diverse coorti, in 128 casi su 150 (85,3%, AC1), 89 su 99 (89,9%, AC2) e 103 su 125 (82,4%, coorte qPCR) il collo è stato trattato con una dissezione primaria del collo. La diffusione extracapsulare (ECS) è stata considerata positiva se il tumore si estendeva oltre la capsula del linfonodo. In caso di dubbio, il caso è stato classificato come avente ECS secondo le linee guida del Royal College of Pathologists UK ³⁴. Abbiamo infine creato una variabile composita patologica (pCompVar) che è stata valutata positiva se era presente ECS o R + o > 1 LNM.

Dati clinici

Sono state utilizzate diverse variabili cliniche per la costruzione del modello prognostico. Tra questi l'età alla diagnosi, il sesso, il tabagismo (1 packyears = 20 sigarette al giorno per 1 anno), ECOG Performance Status ³⁵ e comorbidità. La comorbidità è stata classificata utilizzando l'ACE-27 ³⁶ che prevede quattro livelli: nessuno, lieve, moderato o grave. Per il tabagismo, rispetto ai comuni metodi classificativi, il packyears è risultato il metodo che meglio rappresentava questa abitudine voluttaria ed è anche stata la variabile più significativa per il sistema operativo.

Risultati

La sopravvivenza globale (OS) è stata definita come il tempo tra la diagnosi di malattia e la morte avvenuta per qualsiasi causa. La sopravvivenza libera da malattia (DFS) è stata definita come il tempo intercorso tra la diagnosi di malattia e lo sviluppo di una recidiva locoregionale, metastasi a distanza o secondo HNSCC primario. I tempi medi di sopravvivenza per i vari dataset sono stati calcolati mediante la curva di KaplanMeier come suggerito da Schemper et al.³⁷ I pazienti deceduti per altre cause o che hanno sviluppavano secondi tumori primari al di fuori della regione della testa e del collo (SPT), sono stati esclusi alla data di morte o alla data di incidenza del SPT. Le recidive locali sono state considerate tali quando si sono sviluppate entro due centimetri dal tumore primario e nei tre anni successivi alla terapia, mentre una recidiva regionale è stata definita così quando si è sviluppata in un collo trattato entro tre anni dal trattamento.

Analisi statistica

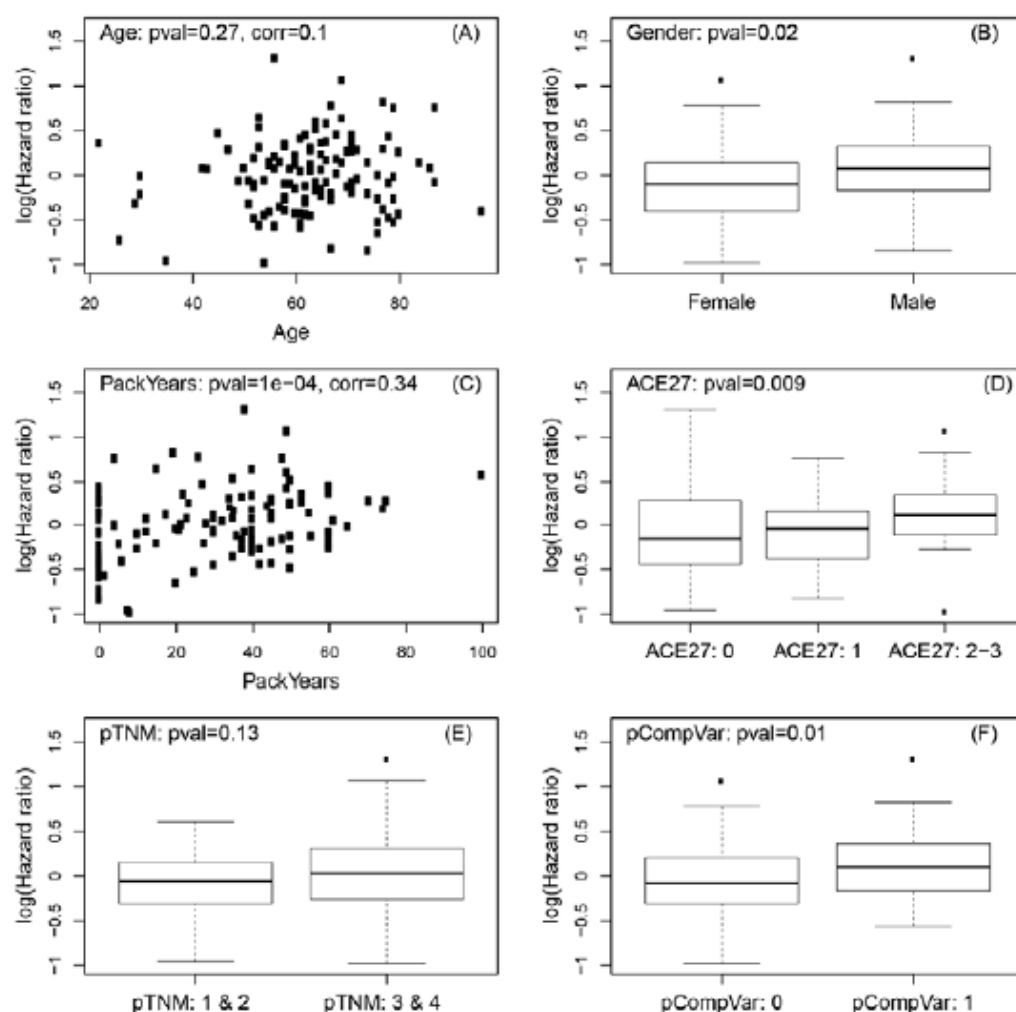
Per i dati qPCR, la correlazione univariata dei valori delta Ct dei geni selezionati con LNM o OS / DFS è stata determinata rispettivamente con la regressione logistica o Cox,. I modelli multivariati con i geni selezionati sono stati realizzati con regressione logistica (LNM) o regressione di Cox (OS / DFS). Per le variabili cliniche, i valori p univariati sono stati determinati dalla regressione dei rischi proporzionali di Cox (OS, DFS) o dalla regressione logistica (LNM). I pazienti con comorbidità moderata e grave (ACE-27) sono stati considerati come un gruppo unico nell'analisi, poiché il gruppo con grave comorbidità (ACE-27) era molto piccolo. La stadiazione TNM è stata suddivisa come malattia in stadio precoce (pTNM I + II) e malattia in stadio avanzato (pTNM III + IV). Le variabili con valore $p < 0,15$ sono state considerate candidate per un modello multivariato. Per la previsione LNM, nessuna variabile clinica ha soddisfatto questo criterio. Successivamente, è stata eseguita una regressione graduale per identificare un modello multivariato con variabili cliniche. La selezione graduale con Akaike Information Criterion (AIC) è stata eseguita e in ciascuna fase è stata aggiunta o eliminata una variabile, che ha identificato il modello migliore. Per OS, la procedura di selezione stepwise ha individuato età e packyears. I modelli di predizione per il risultato consistevano di (1) solo geni prognostici, (2) variabili cliniche e patologiche TNM-stage (pTNM), (3) variabili cliniche e una variabile patologica composita (positivo se ECS o R + o > 1 LNM era presente) e le combinazioni (4) 1 + 2 e (5) 1 + 3. Nei modelli combinati clinici e genomici, le variabili cliniche non sono state penalizzate e i geni sono stati incorporati con una penalità per evitare il sovradattamento. La prestazione

predittiva è stata misurata mediante curva AUC (area-under-the-ROC) e AUC integrata (iAUC) ³⁸ a 5 anni di follow-up per LNM e OS / DFS, rispettivamente, completate per il solo caso di LNM dal NPV , cioè la proporzione di veri negativi tra tutti i test negativi. Le prestazioni del modello sono state valutate mediante bootstrap, intervalli di confidenza attorno all'AUC, sensibilità, specificità, PPV e l'NPV sono stati calcolati in base ai metodi descritti da Jiang et al. ^[39-41]). La performance del modello prende in considerazione solo l'incertezza dei coefficienti genomici, clinici e patologici. Per le variabili genomiche non abbiamo eseguito ulteriori selezioni sui dati RT-qPCR. Per OS e DFS l'analisi del sottogruppo è stata eseguita rimontando il modello ai casi di quel sottogruppo. Per l'analisi del sottogruppo LNM, il refitting non era possibile a causa della piccola dimensione del campione (n = 54) con un basso numero di casi (15). Pertanto, l'AUC per il sottogruppo è stata calcolata dapprima adattando il modello a tutti i casi (n = 125) e quindi considerando il sottogruppo. Il valore additivo della firma del gene è stato valutato con il test globale ^[42-43]. Tutti i test statistici eseguiti erano bilaterali. In più impostazioni di test, i valori P univariabili sono stati corretti utilizzando la procedura FD Benjamini-Hochberg ²¹.

Relazione delle firme genomiche con altri marcatori prognostici

Abbiamo anche analizzato l'associazione tra i marcatori prognostici e il OSsig (qui preso come il predittore lineare della regressione di Cox, cioè il log dell'Hazard Ratio), come raccomandato nel criterio REMARK 14. In questa analisi abbiamo considerato le variabili utilizzate nei modelli prognostici (cioè età, fumo, pTNMStage, pCompVar) e in aggiunta considerati genere e comorbidità (ACE27). Per l'età e il packyears, sono stati calcolati un coefficiente

di correlazione di Pearson e un p-value aggiuntivo. Per sesso, pTNMStage e pCompVar abbiamo eseguito un t-test e per ACE27 abbiamo eseguito un ANOVA. Sono state trovate correlazioni significative tra OSsig e genere, fumo, ACE27 e pCompVar (Figura 7 supplementare). Tuttavia, come si può vedere in questa figura, la dimensione degli effetti era piccola. In secondo luogo, abbiamo valutato l'AUC del predittore genomico in diversi sottogruppi (Tabella 8 supplementare). Sottogruppi inclusi erano: (1) pCompVar negativo e positivo; (2) Età <70 e ≥70 anni alla diagnosi; (3) Fumo: packyears <valore mediano e ≥mediano in questo set di dati; (4) Comorbidità (ACE27): ACE27 0-1 e ACE27 2-3; (5) Sesso maschile e femminile; e (6) stadio patologico I + II e III + IV. Questa analisi ha mostrato che OSsig ha un buon potere discriminante nei vari sottogruppi.



Supplemental Figure 7. Relation of Overall Survival signature (OSsig) to other prognostic markers.

(A-F) Relation of the OSsig linear predictor of the Cox ridge regression, i.e., the log of the hazard ratios (y-axis), and other prognostic variables (x-axis). A Pearson's correlation coefficient and an additional p-value were calculated for numerical variables, for ACE27 we performed an ANOVA, and for the remaining categorical variables, a t-test was performed. Relation between OSsig and (A) age (in years, $r=0.1$, $P=0.27$), (B) gender ($P=0.02$), (C) smoking (in packyears; $r=0.34$, $P=0.0001$), (D) comorbidity (ACE27; $P=0.009$), (E) pathological TNM stage (pTNMStage; $P=0.13$), and (F) a composite pathology variable (pCompVar) that was positive if extracapsular spread or tumor-positive resection margins or >1 lymph node metastasis was present ($P=0.01$). For each marker the size of the effects was small, even when a significant relation was found.

Abbreviations: corr, Pearson's correlation coefficient; pCompVar, pathological composite variable; pTNMStage, pathological TNM stage.

Supplemental Table 8 - Assessment of performance of the gene signature in relevant subgroups by integrated area-under-the-curve (iAUC)							
	OS			DFS			
Subgroup	iAUC	95% CI		iAUC	95% CI		n
CompVar: 0	0.71	0.65	0.76	0.65	0.61	0.68	79
CompVar: 1	0.58	0.51	0.65	0.62	0.55	0.70	38
Age<70	0.64	0.59	0.70	0.62	0.57	0.68	88
Age>=70	0.56	0.48	0.66	0.76	0.70	0.82	37
PackYears < median	0.61	0.54	0.69	0.70	0.65	0.75	59
PackYears >= median	0.54	0.48	0.62	0.54	0.47	0.63	66
Female	0.58	0.51	0.67	0.56	0.49	0.63	53
Male	0.63	0.56	0.69	0.64	0.58	0.72	72
pTNMStage: 1 or 2	0.60	0.52	0.68	0.53	0.45	0.64	43
pTNMStage: 3 or 4	0.63	0.57	0.69	0.63	0.57	0.70	82
ACE27: 0-1	0.66	0.60	0.73	0.68	0.63	0.75	77
ACE27: 2-3	0.65	0.57	0.74	0.56	0.49	0.63	48
Treatment surgery onlyT=1	0.51	0.43	0.61	0.69	0.65	0.71	60
Treatment surgery + adjuvantT=1-2 TreatT=3	0.67	0.61	0.73	0.65	0.58	0.73	65

Un modello basato sull'espressione genica per predire le metastasi linfonodali in OSCC

Le prestazioni della firma predittiva LNM sono riassunte in Tabella 2. Quando vengono considerati tutti gli stadi clinici della malattia, l'AUC di questo modello è stata di 0,69 (Tabella 2), con un NPV del 66% (Tabella 2).

Table 2: Performance metrics of gene signature in N-stage prediction

	qPCR validation, all (n = 125)	qPCR validation, cT1-2N0 (n = 54)
NPV (95% CI ^a)	66 (57.1-74.7)	84 (71.7-95.2)
TN	40	26
TN + FN	61	31
PPV (95% CI ^a)	67 (59.1-76.6)	43 (21.5-64.5)
TP	43	10
TP + FP	64	23
Sensitivity (95% CI ^a)	67 (42.3-83.5)	67 (29.6-93.2)
TP	43	10
TP + FN	64	15
Specificity (95% CI ^a)	66 (39.3-83.2)	67 (39.7-86.2)
TN	40	26
TN + FP	61	39
AUC (95% CI ^a)	0.69 (0.63-0.75)	0.66 (0.52-0.78)

Abbreviations: AUC, Area Under the ROC Curve; CI, confidence interval; FN, false negative; FP, false positive; NPV, negative predictive value; PPV, positive predictive value; TN, true negative; TP, true positive.

a. Confidence intervals were assessed by bootstrapping.

Successivamente, abbiamo eseguito un'analisi sul solo sottogruppo clinicamente rilevante di tumori con gli stadi clinici I e II (n = 54), tumori che vengono trattati mediante resezioni transorali senza trattamento del collo. In questo sottogruppo, l'AUC (0.66, Tabella 2) e la sensibilità del LNMsig (67%, Tabella 2) erano comparabili con le statistiche delle prestazioni in tutte le fasi. Il NPV, tuttavia, è aumentato dal 66% all'84% (Tabella 2). Non c'erano variabili cliniche correlate a LNM (dati non mostrati) e i dati istopatologici non sono ovviamente disponibili prima della pianificazione chirurgica. Inoltre, la

percentuale di metastasi linfonodali occulte era paragonabile nei tumori cT1 e cT2 (cioè il 25% e il 29% rispettivamente). In precedenza, Van Hooff et al. ⁴⁴ ha proposto un modello di decisione clinica che raccomanda una dissezione elettiva del collo quando la previsione della firma dell'espressione genica indica N + o sorveglianza attiva quando la previsione è N0. Seguendo questo modello decisionale, il LNMsig mostra un'efficacia simile: si sarebbe potuto evitare il sovra-trattamento in oltre il 66% dei casi di pN0 (72% o 24% di sovra-trattamento senza o con il modello di decisione clinica, vedere Figura 2).

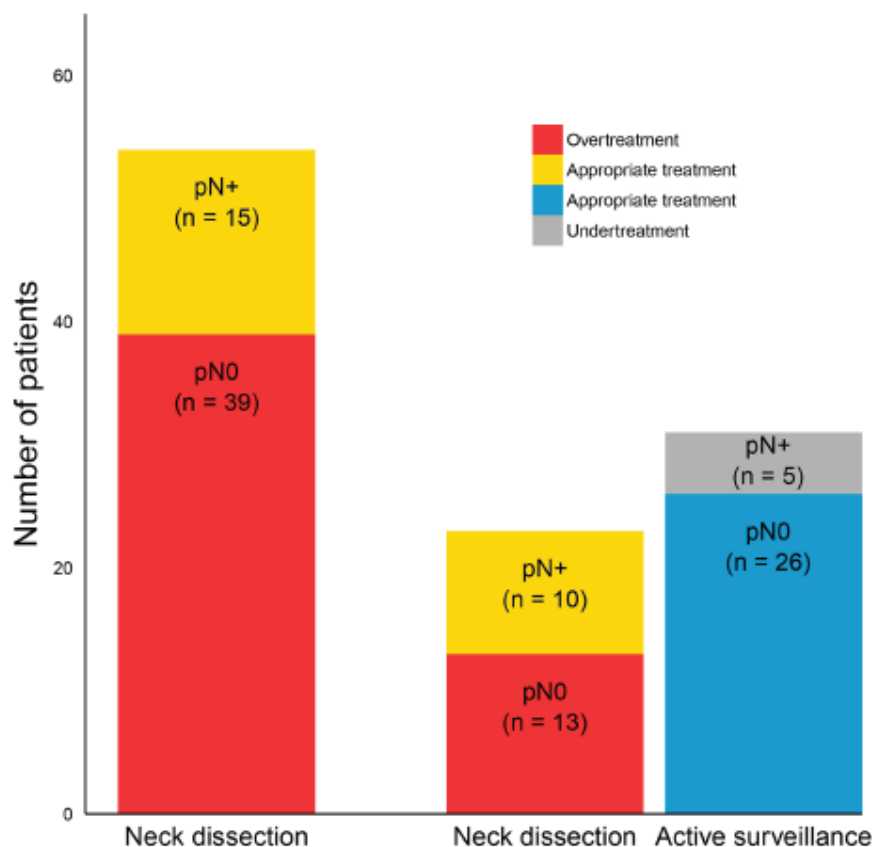


Figure 2: Incorporation of the LNMsig in a clinical decision model that was previously proposed for patients with clinically early stage (cT1-T2N0) oral squamous cell carcinoma (OSCC). At present, early-stage OSCCs are treated with an elective neck dissection (END, levels I-III or I-IV depending on location) in most centers. This would cause overtreatment in 39 patients (first bar, indicated in red). The clinical decision model recommends performing an END when the gene expression signature prediction is N+ or active surveillance when the prediction is N0. The hypothetical situation when using this decision model is represented in the second and third bar. Following the decision model, only 23 patients are directly treated with an elective neck dissection (second bar), overtreatment is restricted to 13 cases, and 26 patients receive appropriate treatment (third bar). The patients who are pN+ and receive an END are labeled as receiving appropriate treatment (indicated by yellow color).

Un modello prognostico basato sull'espressione genica per OSCC con valore prognostico indipendente

I 40 geni di sopravvivenza hanno discriminato significativamente tra casi ad alto e basso rischio (OS: iAUC = 0.63, $P = 1.6E-3$ (test globale), Tabella 3 e Figura 3A-sinistra ; DFS: iAUC = 0.65, $P = 6.8E-3$ (test globale), Tabella 3 e Figura 3A-destra;. In un contesto clinico i geni dovrebbero aggiungere informazioni prognostiche ai parametri stabiliti. Quindi, la firma del gene è stata analizzata nel contesto di dati clinici e istopatologici.

Table 3: Univariable and multivariable analysis of genomic, clinical, pathological and combined models in validation cohort

	Overall survival	P ^c value	Disease free survival	P ^c value
	iAUC ^a (95% CI ^b)		iAUC ^a (95% CI ^b)	
Unitype				
OSsig	0.63 (0.57-0.68)	0.002	0.65 (0.60-0.70)	0.007
Clinical	0.66 (0.59-0.73)		0.54 (0.49-0.61)	
pTNM	0.51 (0.47-0.57)		0.51 (0.47-0.57)	
pCompVar ^d	0.64 (0.56-0.71)		0.63 (0.56-0.71)	
Multitype				
Clinical+pTNM	0.66 (0.60-0.73)		0.53 (0.47-0.60)	
OSsig+clinical+pTNM	0.68 (0.64-0.73)	0.03	0.60 (0.55-0.64)	0.01
Clinical+pCompVar ^d	0.73 (0.67-0.80)		0.62 (0.54-0.70)	
OSsig+clinical+pCompVar ^d	0.74 (0.69-0.79)	0.02	0.68 (0.63-0.73)	0.01
pCompVar ^d negative subgroup				
OSsig	0.71 (0.65-0.76)	0.01	0.65 (0.61-0.68)	0.28
Clinical	0.70 (0.61-0.79)		0.53 (0.43-0.68)	
OSsig+clinical	0.73 (0.68-0.78)	0.02	0.52 (0.46-0.65)	0.47

Abbreviations: iAUC, integrated Area Under the Curve; OSsig, Overall Survival signature; pCompVar, pathological composite variable; pTNM, pathological TNM stage

a. Area under the curve was integrated over 5 year follow-up time.

b. CIs were assessed by bootstrapping on out-of-bag samples.

c. Significance of the OSsig was assessed with the global test^{22,23}.

d. Scored positive if extracapsular spread or positive resection margins or >1 lymph node metastasis was present.

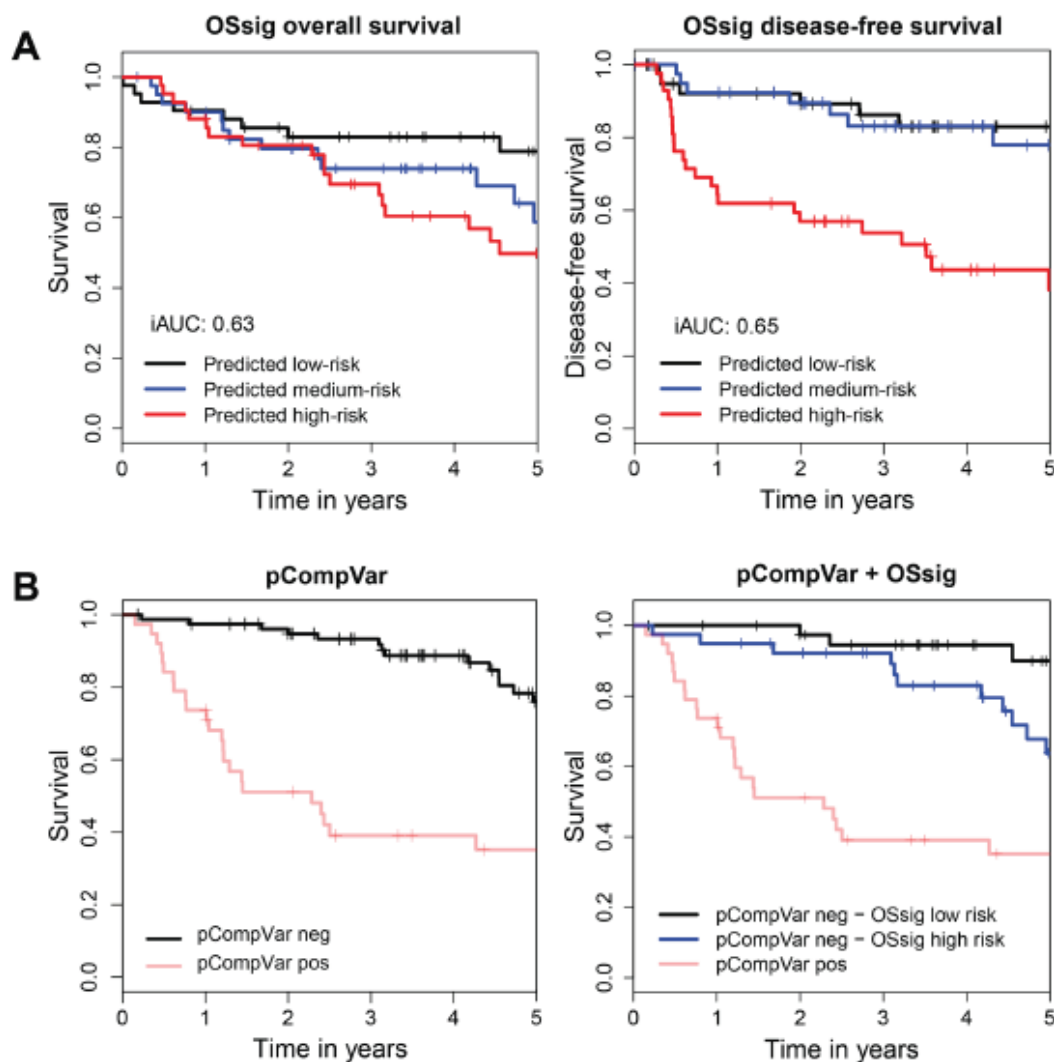


Figure 3: The overall survival signature (OSsig) predicts overall survival and disease-free survival, also in low-risk patients. (A) Kaplan-Meier analysis of overall survival (left) and disease-free survival (right) with risk groups defined by tertile predicted hazards by the OSsig analyzed with qPCR in the independent validation cohort of 125 OSCC patients. We also considered threshold optimization for creating the three groups; resulting KM curves were very similar and are hence not displayed. (B) On the left, a Kaplan-Meier analysis is shown for overall survival in the independent validation group with risk groups defined by pCompVar, which is scored positive when during histopathological examination either extracapsular spread (ECS) or involved resection margins (R+) or >1 lymph node metastasis was identified. These are routinely used histopathological criteria for adjuvant treatment. On the right the result of a subgroup analysis is shown to improve the stratification of the pCompVar-negative patients ($n=79$). TNM-staging was not informative to stratify this group (data not shown), but the OSsig was able to identify a subgroup of patients (blue line) with relatively poor prognosis who might have benefited from adjuvant treatment (OS: iAUC=0.71; OSsig: $P=0.01$ (global test)). The performances of all predicting models are listed in Table 3. Area under the curve was integrated over 5 year follow-up time. Tick marks on curves indicate censoring. Abbreviations: iAUC, integrated Area Under the Curve; OSsig, Overall Survival signature; pCompVar, pathological composite variable.

Diversi fattori clinici sono stati associati al sistema operativo e nessuno con DFS. Un modello è stato addestrato con i più importanti fattori clinici per questo set di dati e stadio patologico TNM (pTNM). I fattori clinici selezionati e inclusi nel modello sono stati: età alla diagnosi e fumo (cioè packyears, PY), vedere la Tabella 5 supplementare per valori p univariabili. Il modello con questi due

fattori clinici e pTNM prediceva con precisione la sopravvivenza globale (iAUC = 0,66, Tabella 3), ma non DFS (iAUC = 0,53, Tabella 3). L'aggiunta di OSSig a questo modello ha migliorato la precisione (OS: iAUC = 0,68, OSSig: P = 0,03 (test globale), Tabella 3 e Figura 2A supplementare). Per DFS, un modello basato sulle due variabili cliniche + pTNM e OSSig ha dato un iAUC di 0,60. Si noti che questo è inferiore a un modello basato solo su OSSig (iAUC 0.65). Oltre a pTNM, altre variabili istopatologiche sono risultate importanti per dare indicazioni sulla necessità di un trattamento adiuvante. Nelle linee guida olandesi, i criteri decisionali su cui si dà indicazione all' esecuzione di una terapia postoperatoria adiuvante sono la diffusione extracapsulare (ECS), i margini positivi al tumore (R +) e i linfonodi metastatici multipli (> 1 LNM). Abbiamo creato una variabile composita (pCompVar) che è stata valutata positiva se era presente ECS o R + o > 1 LNM. Questa variabile composita è stata combinata con fattori clinici (cioè età, PY) in un modello prognostico (OS: iAUC = 0,73, DFS: iAUC = 0,62, vedere Tabella 3). OSSig ha migliorato la precisione del modello (OS: iAUC = 0.74, OSSig: P = 0.02 (test globale), Tabella 3 e Figura complementare 2B; DFS: iAUC = 0.68, OSSig: P = 0.01 (test globale), Tabella 3). DFS è stato previsto con la massima precisione da un modello che combinava OSSig e pCompVar, senza includere pTNM (iAUC = 0.70; OSSig: P = 5.6E-3 (test globale)). E' stata inoltre eseguita un'analisi nel sottogruppo di pazienti senza necessità di radioterapia postoperatoria, vale a dire casi pCompVar-negativi (n = 79, Figura 3B-sinistra). In questi casi è stato realizzato un modello prognostico di tipo multivariato che includeva fattori clinici (età e fumo) e OSSig. L'iAUC è aumentato da 0,70 a 0,73 aggiungendo i geni

prognostici (Tabella 3 e Figura 3B-destra. Questi risultati mostrano che il valore prognostico di OSsig rappresenta un valore aggiunto associato alle variabili prognostiche cliniche e patologiche consolidate.

Validazione tecnica di transizione di piattaforma da qPCR tradizionale a Sistema Lab-On-Chip-Q3-Plus

Il passaggio da una strumentazione tradizionale di RT-qPCR come (ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems) ad un sistema innovativo Lab-On-Chip ha necessitato di uno step di validazione tecnica della transizione di piattaforma finalizzata a confermare che i risultati ottenuti con la strumentazione innovativa e settata *ad hoc* per lo studio siano confrontabili e statisticamente non dissimili da quelli derivanti dall'uso di una strumentazione di tipo tradizionale.

RT-PCR e qPCR mediante sistema Q3-Plus

Per la validazione della transizione di piattaforma è stata utilizzata la chimica TaqMan, la stessa impiegata per l'analisi qPCR (precisamente TaqMan TLDA) presentata al termine del primo anno di dottorato descrivendo la validazione dei geni provenienti dall'analisi di DNA Microarray. Sono state impiegate le stesse sonde di amplificazione, in questo caso però le sonde dei geni target sono state marcate FAM™, mentre la sonda del gene housekeeping GUSB, risultato il più affidabile in termini di mantenimento e di livello di espressione tra i campioni precedentemente esaminati rispetto agli altri 3 amplificati nelle TLDA, marcato VIC®; l'uso di due differenti fluorofori si è rivelato utile in quanto l'amplificazione genica è stata eseguita in multiplex (più di una reazione di amplificazioni contemporaneamente sullo stessa aliquota di RNA).

L'RNA totale dei singoli pazienti precedentemente estratto è stato retrotrascritto e amplificato utilizzando il sistema "One-step" che comprende i passaggi di amplificazione in un'unica reazione molecolare. La reazione di retrotrascrizione-

amplificazione è stata condotta utilizzando i seguenti reagenti (Tabella 1):

Reagent	Volume (µl)
<i>RNA in RNase-free H₂O – concentrazione finale 2.5 ng/µl per 1 reazione</i>	<u>2</u>
TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix	15
FAM™ TaqMan Gene Expression Assay, 20X (gene target)	3
VIC® TaqMan Gene Expression Assay, 20X (<i>GUSB</i> , gene housekeeping)	1
RNase-free H ₂ O	17

Tabella 1: mix per la preparazione di 11 reazioni di qRT-PCR da 3 µl ciascuna (più una % di scarto sul totale della mix).

L'RNA totale dei singoli pazienti nella quantità di 2µl è stato mescolato a 3 µl di mix ed il tutto aggiunto a ciascun pozzetto del chip.

Il software dedicato OraMod (STM), ha guidato l'operatore in tutti i passaggi indicando anche come caricare i chip per ciascun set di geni (Survival oppure N-Stage).una volta scelti il paziente e l'analisi da eseguire.



Figura 1: schema di caricamento per i due chip; nella terza immagine il gene LRCOL1 è stato sostituito dal gene SELP nella seconda fase della validazione.

Al termine della reazione di amplificazione secondo i parametri (temperature e cicli di PCR) pre-determinati dal software stesso, è stato visualizzato il risultato dell'amplificazione genica sia mediante curve di dati grezzi sia mediante valori

di ΔC_t (differenza in cicli tra l'amplificazione del gene target rispetto al gene house keeping). Questi dati sono stati immediatamente trasferiti nel sistema di raccolta dati OraMod e utilizzati dai bioinformatici per l'analisi della performance di amplificazione dei geni testati sulla casistica selezionata.

Dal confronto tra i cicli di amplificazione e i valori dei ΔC_t dei geni in analisi ottenuti mediante sistema tradizionale e con l'uso del sistema Q3-Plus è risultato che uno solo dei geni target (LRCOL1) non confermasse i risultati di espressione genica e per questo motivo è stato sostituito con un altro gene (SELP) anch'esso altamente correlato alla sopravvivenza (Tabella 2).

GENE	NOME COMPLETO	GENE SET
PGM5	Phosphoglucomutase 5	SURVIVAL /RECURRENT
VEGFA	Vascular Endothelial Growth Factor A	SURVIVAL
TCL1A	T-Cell Leukemia/Lymphoma 1A	SURVIVAL
CXCL13	Chemokine (C-X-C Motif) Ligand 13	SURVIVAL
SELP	Selectin P (Granule Membrane Protein 140kDa, Antigen CD62)	SURVIVAL
<i>LRCOL1</i>	<i>Leucine Rich Colipase Like 1</i>	<i>SURVIVAL</i>
TSPAN11	Tetraspanin 11	SURVIVAL
KRT23	Keratin 23, Type I	N-STAGE
KLRC1	Killer Cell Lectin-Like Receptor Subfamily C, Member 1	N-STAGE
CLEC3B	C-Type Lectin Domain Family 3, Member B	N-STAGE
EXPH5	Exophilin 5	N-STAGE
TPM1	Tropomyosin 1 (Alpha)	N-STAGE
FN1	Fibronectin 1	N-STAGE

Tabella 2: OraMod geni target; in rosso il gene sostituito nella seconda fase della validazione

Analisi dell'espressione genica dei pazienti reclutati nel progetto OraMod

Validato il sistema di RT-qPCR Lab-On-Chip-Q3-Plus (STM) si è analizzata l'espressione genica per i 12 geni testati (derivanti dalla seconda fase della validazione della nuova piattaforma) sull'intera coorte dei pazienti Oramod arruolati nei 3 centri clinici del consorzio (Azienda Ospedaliero Universitaria di Parma, VU University Medical Center di Amsterdam e Heinrich-Heine-Universität di Düsseldorf).

DISCUSSIONE

Come mostrato nei precedenti paragrafi, in letteratura emerge una significativa eterogeneità dei meccanismi patogenetici dell'OSCC rafforzando l'idea che oggi i protocolli diagnostici / terapeutici non sono sufficientemente accurati per consentire una completa valutazione del tumore.

Da questo punto di vista, il progetto OraMod promette di colmare questa lacuna apportando significativi progressi nel campo sia nella medicina che nella tecnologia.

Precisamente:

L'integrazione di dati clinici e genomici costituisce ancora oggi una sfida nella biologia computazionale e nella medicina genomica. Il progetto Oramod affronterà questo problema implementando un sistema di repository di dati che evita di classificare le informazioni cliniche tradizionali come metadati, consentendo così l'associazione e l'analisi integrate di diversi tipi di dati nello stesso modello predittivo.

In questo progetto abbiamo identificato firme prognostiche di espressione genica che sono risultate predittive sia per LNM che per OS in pazienti affetti da OSCC. Innanzitutto, abbiamo selezionato 60 geni utilizzando i dati di DNA microarray e questi geni sono stati validati in una coorte indipendente di pazienti OSCC mediante l'uso di saggi RTqPCR. Infine, abbiamo costruito 2 modelli genomici multivariabili: un modello per determinare il rischio di insorgenza di metastasi linfonodali (LNMSig) e un modello per la sopravvivenza globale (OSSig) e confermato il valore addizionale delle firme geniche alle

variabili esistenti e stabilite. Il LNMSig con 22 geni ha predetto la malattia metastatica nodale con un NPV dell'84% negli stadi clinici I e II. Questi valori statistici di prestazioni diagnostiche sono paragonabili ai risultati di precedenti studi che hanno utilizzato una firma microarray 732-probe ⁴⁴. Tuttavia, la transizione alla RT-qPCR facilita notevolmente l'implementazione clinica, perché è stata raggiunta una prestazione comparabile utilizzando meno geni e una piattaforma più user-friendly. Un NPV alto è condizione necessaria per identificare i pazienti che possono evitare una dissezione elettiva del collo. Lavori recenti hanno mostrato che la biopsia del linfonodo sentinella (SNB), che è una tecnica di stadiazione alternativa, è più accurata con un NPV del 95% [18] a tassi di prevalenza di LNM comparabili. La SNB, tuttavia, è una procedura chirurgica invasiva con rischi e costi associati, e con una sensibilità inferiore nei tumori del pavimento della bocca ⁴⁵⁻⁴⁷. Inoltre, non è stato ancora universalmente adottata nella pratica clinica. È stato suggerito che una combinazione di una firma di espressione e SNB può determinare una più accurata stadiazione del collo clinicamente N0 ⁴⁸. L'OSsig potrebbe invece essere usata per personalizzare il trattamento. Di per sé, OSsig predice la sopravvivenza globale con un iAUC di 0,63, che è già promettente rispetto allo iAUC di 0,51 del pTNM standard. Per la previsione di DFS, OSsig si è rivelata ancora più preziosa, in particolare se combinato con l'istopatologia, poiché le variabili cliniche non sono dimostrate informative per DFS. Questi dati confermano il valore predittivo di OSsig, ma indicano anche che l'integrazione di variabili cliniche, molecolari e istopatologiche fornisce modelli predittivi più precisi. Il disegno di questo studio ha permesso l'identificazione di associazioni

solide in tre modi. Innanzitutto, abbiamo usato diverse piattaforme di espressione genica per cancellare i risultati specifici di una singola piattaforma. In secondo luogo, abbiamo studiato coorti di pazienti omogenei: sono stati inclusi solo gli OSCC HPV- sottoposti a trattamento chirurgico. Infine, abbiamo preso in considerazione pazienti provenienti da 3 paesi europei, scongiurando il rischio di identificare firme geniche specifiche di una singola popolazione. I nostri risultati possono essere limitati da due fattori. Innanzitutto, l'eterogeneità intra-tumorale può causare differenze nei profili di espressione genica all'interno di uno stesso tumore; anche se i risultati precedenti suggeriscono che i profili di espressione sembrano stabili in HNSCC ⁴⁹. Secondo, tutte le coorti indagate erano retrospettive. Va detto, tuttavia, che i dati retrospettivi ottenuti nei Paesi Bassi sono generalmente accurati, poiché il trattamento e il follow-up dei pazienti con HNSCC è stato centralizzato in alcuni centri clinici e la gestione clinica aderisce alle linee guida nazionali standardizzate. I nostri risultati suggeriscono almeno due implicazioni. In primo luogo, il modello prognostico può essere utilizzato per il potenziamento del trattamento in pazienti con tumori che non soddisfano i criteri attuali per la radioterapia postoperatoria, cioè il coinvolgimento del margine, > 1 linfonodo metastatico o ECS. In secondo luogo, un modello che contempla ed integra le variabili cliniche e l'OSSig predice in modo accurato la prognosi senza l'aggiunta di istopatologia. Questo modello può essere particolarmente importante per predire la sopravvivenza in pazienti trattati con radioterapia o chemioradioterapia primaria, poiché l'istopatologia non è disponibile in questi casi. Queste sono indicazioni importanti per il lavoro futuro. Così come la possibilità di ovviare al problema di non disporre sempre di

material fresco congelato prevedendo possibili applicazioni anche per il tessuto FFPE. In definitiva, saranno necessari studi clinici prospettici per determinare se i modelli di rischio integrati possano guidare il processo decisionale clinico e migliorare i risultati del trattamento anche in termini di morbidità.

In questo progetto è stata sviluppata una strategia lab-on-chip on-demand per la convalida su piattaforma RT-PCR dei risultati dell'espressione genica ottenuta con DNA-microarray e per il monitoraggio della specifica biomarcatura genomica durante il followup.

Considerando i risultati già conseguiti possiamo prevedere che entro dieci anni la ricerca avrà raggiunto maggiori conoscenze sulle firme genetiche del cancro orale e che i dati raccolti mediante il sistema OraMod e l'applicazione dello specifico protocollo su un'ampia popolazione di pazienti porteranno alla validazione robusta della metodologia e che i geni rilevanti saranno identificati.

Una volta memorizzato il profilo genetico personale della malattia, la tecnologia lab-on-chip può essere sfruttata per memorizzare il in modo da avvisare immediatamente il paziente e il medico se l'espressione genica corrente indichi un rischio di recidiva del cancro orale.

Allo stesso tempo, le informazioni elettroniche sulla salute dei pazienti raggiungeranno una certa standardizzazione e i pazienti useranno le tessere sanitarie elettroniche con i loro profili specifici. Ciò consentirà un'identificazione immediata del paziente e l'archiviazione dei dati personali nella sua tessera sanitaria elettronica leggibile in qualsiasi struttura / ospedale nazionale.

Tenendo presente questo scenario, possiamo immaginare che anche il medico generico / gli specialisti o il personale del laboratorio diagnostico (biologi clinici)

possano eseguire il rilevamento dell'RNA attraverso il dispositivo lab-on-chip OraMod e rilasciare rapporti specifici per il paziente e i medici curanti.

Inoltre, se il progetto OraMod aumenterà l'accuratezza diagnostica e prognostica individuando i pazienti con rischio maggiore o minore di recidiva, si dovrebbe giungere alla razionalizzazione della decisione di completare il trattamento del paziente con terapia adiuvante (radio / chemioterapia), limitando l'uso di tali terapie complementari solo ai pazienti per i quali una tossicità ancora elevata è controbilanciata da effetti terapeutici di fondamentale importanza.

REFERENCES

1. Ferlay J., et al. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J cancer*. 2010, Vol. 46, p. 765-781., p. 765-781.
2. Mishra RC., Parida G., Mishra TK., Mohanty S. Tumour thickness and relationship to locoregional failure in cancer of the buccal mucosa. *Eur J Surg Oncol.* . 1999, Vol. 25, 2, p. 186-9., p. 186-9.
3. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, Genden E, Urken ML, Wang BY. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol*. Feb. 2005, Vol. 29, 2, p. 167-78., p. 167-78.
4. Slebos et al. Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res*. 2006, 12, p. 701-109., p. 701-109.
5. Herrero R et al. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *J. Natl Cancer Inst*. 2003, 95, p. 1772-1783, p. 1772-1783.
6. Wishart, Gordon C. PREDICT: a new UK prognostic model that predicts survival following surgery for invasive breast cancer. *Breast Cancer Research* 2010, 12:R1 doi:10.1186/bcr2464. 2010, p. 12:R1 doi:10.1186/bcr2464.
7. Bilde A. et al. Molecular markers in the surgical margin of oral carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2009, Vol. 38, Issue 1, p. 72-78.
8. Van Houten VMM et al. Mutated p53 as molecular marker for the diagnosis of head and neck cancer. *J Pathol*. 2002 Dec, Vol. 198, 4:476-86, p. 476-486.
9. Nathan CO et al. Molecular analysis of surgical margins in head and neck squamous cell carcinoma patients. *Laryngoscope*. 2002 Dec., Vol. 112, 12: 2129-40., p. 2129-40.
10. Reis et al. A gene signature in histologically normal surgical margins is predictive of oral carcinoma recurrence. *BMC Cancer*. 11 October 2011, p. 11:437 doi:10.1186/1471-2407-11-437.
11. Baatenburg de Jong R. et al. Prediction of survival in patients with head and neck cancer. *Head and neck*. Sep. 2001, Vol. 23, 9: p. 718-724., p. 718-724.
12. Obulkasim A, Meijer GA, van de Wiel MA., Stepwise classification of cancer samples using clinical and molecular data. *BMC Bioinformatics*. 2011, Vol. 12: p. 422, p. 422.
13. Bondell HD & Reich BJ. Consistent high-dimensional Bayesian variable selection via penalized credible regions. *Journal of the American Statistical Association*. 2012, DOI:10.1080/01621459.2012.716344.
14. Gerds TA & van de Wiel MA. Confidence scores for prediction models. *Biom J*. 2011, Vol. 53, p. 259- 74., p. 259-74.
15. European Commission Council. Council Directive 93/42/EEC of 14 June 1993 concerning medical devices (amended by 2007/47/EC).
16. Exarchos KP et al., Goletsis Y, Fotiadis DI. A Multiscale and Multiparametric Approach for Modeling the Progression of Oral Cancer. *BMC Medical Informatics and Decision Making*. 10 2012.
17. Network CGA. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. *Nature*. 2015; 517: 576–82.

18. McShane LM, Altman DG, Sauerbrei W, Taube SE, Gion M, Clark GM. Reporting Recommendations for Tumor Marker Prognostic Studies. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 9067–72. doi: 10.1200/JCO.2004.01.0454.
19. van Hooff SR, Leusink FK, Roepman P, Baatenburg de Jong RJ, Speel EJ, van den Brekel MW, vanVelthuysen ML, van Diest PJ, van Es RJ, Merkx MA, Kummer JA, Leemans CR, Schuurin E, et al. Validation of a gene expression signature for assessment of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2012; 30: 4104–10.
20. Johnson WE, Li C, Rabinovic A. Adjusting batch effects in microarray expression data using empirical Bayes methods. *Biostatistics.* 2007; 8: 118–27. doi: 10.1093/biostatistics/kxj037.
21. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol.* 1995; 57: 289–300.
22. Roepman P, Wessels LF, Kettelarij N, Kemmeren P, Miles AJ, Lijnzaad P, Tilanus MG, Koole R, Hordijk GJ, van der Vliet PC, Reinders MJ, Slootweg PJ, Holstege FC. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. *Nat Genet.* 2005; 37: 182–6.
23. Roepman P, Kemmeren P, Wessels LF, Slootweg PJ, Holstege FC. Multiple robust signatures for detecting lymph node metastasis in head and neck cancer. *Cancer Res.* 2006; 66: 2361–6.
24. Jung AC, Job S, Ledrappier S, Macabre C, Abecassis J, de Reyniès A, Wasylyk B. A poor prognosis subtype of HNSCC is consistently observed across methylome, transcriptome, and miRNome analysis. *Clin Cancer Res.* 2013; 19: 4174–84.
25. Chung CH, Parker JS, Ely K, Carter J, Yi Y, Murphy BA, Ang KK, El-Naggar AK, Zanation AM, Cmelak AJ, Levy S, Slebos RJ, Yarbrough WG. Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2006; 66: 8210–8.
26. Lohavanichbutr P, Méndez E, Holsinger FC, Rue TC, Zhang Y, Houck J, Upton MP, Futran N, Schwartz SM, Wang P, Chen C. A 13-gene signature prognostic of HPV-negative OSCC: discovery and external validation. *Clin Cancer Res.* 2013; 19: 1197–203.
27. Rickman DS, Millon R, De Reynies A, Thomas E, Wasylyk C, Muller D, Abecassis J, Wasylyk B. Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays. *Oncogene.* 2008; 27: 6607–22.
28. Thurlow JK, Peña Murillo CL, Hunter KD, Buffa FM, Patiar S, Betts G, West CM, Harris AL, Parkinson EK, Harrison PR, Ozanne BW, Partridge M, Kalna G. Spectral clustering of microarray data elucidates the roles of microenvironment remodeling and immune responses in survival of head and neck squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2010; 28: 2881–8.

29. Winter SC, Buffa FM, Silva P, Miller C, Valentine HR, Turley H, Shah KA, Cox GJ, Corbridge RJ, Homer JJ, Musgrove B, Slevin N, Sloan P, et al. Relation of a hypoxia metagene derived from head and neck cancer to prognosis of multiple cancers. *Cancer Res.* 2007; 67: 3441–9.
30. De Cecco L, Bossi P, Locati L, Canevari S, Licitra L. Comprehensive gene expression meta-analysis of head and neck squamous cell carcinoma microarray data defines a robust survival predictor. *Ann Oncol.* 2014; 25: 1628–35.
31. Onken MD, Winkler AE, Kanchi KL, Chalivendra V, Law JH, Rickert CG, Kallogjeri D, Judd NP, Dunn GP, Piccirillo JF, Lewis JS, Mardis ER, Uppaluri R. A surprising cross-species conservation in the genomic landscape of mouse and human oral cancer identifies a transcriptional signature predicting metastatic disease. *Clin Cancer Res.* 2014; 20: 2873–84.
32. Chen C, Méndez E, Houck J, Fan W, Lohavanichbutr P, Doody D, Yueh B, Futran ND, Upton M, Farwell DG, Schwartz SM, Zhao LP. Gene expression profiling identifies genes predictive of oral squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomark Prev.* 2008; 17: 2152–62.
33. Batsakis JG. Surgical excision margins: a pathologist's perspective. *Adv Anat Pathol.* 1999; 6: 140–8.
34. van den Brekel MWM, Lodder WL, Stel HV, Bloemena E, Leemans CR, van der Waal I. Observer variation in the histopathologic assessment of extranodal tumor spread in lymph node metastases in the neck. *Head Neck.* 2012; 34: 840–5. doi: 10.1002/hed.21823.
35. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982; 5: 649–55.
36. Piccirillo JF, Tierney RM, Costas I, Grove L, Spitznagel EL. Prognostic importance of comorbidity in a hospital-based cancer registry. *JAMA.* 2004; 291: 2441–7. doi: 10.1001/jama.291.20.2441.
37. Schemper M, Smith TL. A note on quantifying follow-up in studies of failure time. *Control Clin Trials.* 1996; 17: 343–6. doi: 10.1016/0197-2456(96)00075-X.
38. Heagerty PJ, Lumley T, Pepe MS. Time-Dependent ROC Curves for Censored Survival Data and a Diagnostic Marker. *Biometrics.* 2000; 56: 337–44. doi: 10.1111/j.0006-341X.2000.00337.x.
39. Jiang W, Varma S, Simon R. Calculating confidence intervals for prediction error in microarray classification using resampling. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 2008; 7: Article8. doi: 10.2202/1544-6115.1322.
40. Jiang B, Zhang X, Cai T. Estimating the Confidence Interval for Prediction Errors of Support Vector Machine Classifiers. *J Mach Learn Res.* 2008; 9: 521–540.
41. Wahl S, Boulesteix A-L, Zierer A, Thorand B, van de Wiel MA. Assessment of predictive performance in incomplete data by combining internal validation and multiple imputation. *BMC Med Res Methodol.* 2016; 16: 144. doi: 10.1186/s12874-016-0239-7.

42. Goeman JJ, Geer SA van de, Kort F de, Houwelingen HC van. A global test for groups of genes: testing association with a clinical outcome. *Bioinformatics*. 2004; 20: 93–9. doi: 10.1093/bioinformatics/btg382.
43. Goeman JJ, Oosting J, Cleton-Jansen A-M, Anninga JK, Houwelingen HC van. Testing association of a pathway with survival using gene expression data. *Bioinformatics*. 2005; 21: 1950–7. doi: 10.1093/bioinformatics/bti267.
44. van Hooff SR, Leusink FK, Roepman P, Baatenburg de Jong RJ, Speel EJ, van den Brekel MW, van Velthuysen ML, van Diest PJ, van Es RJ, Merks MA, Kummer JA, Leemans CR, Schuurin E, et al. Validation of a gene expression signature for assessment of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2012; 30: 4104–10.
45. Den Toom IJ, Heuveling DA, Flach GB, van Weert S, Karagozoglu KH, van Schie A, Bloemena E, Leemans CR, de Bree R. Sentinel node biopsy for early-stage oral cavity cancer: the VU University Medical Center experience. *Head Neck*. 2015; 37: 573–8. <https://doi.org/10.1002/hed.23632>.
46. Alkureishi LW, Ross GL, Shoaib T, Soutar DS, Robertson AG, Thompson R, Hunter KD, Sorensen JA, Thomsen J, Kroghdahl A, Alvarez J, Barbier L, Santamaria J, et al. Sentinel node biopsy in head and neck squamous cell cancer: 5-year follow-up of a European multicenter trial. *Ann Surg Oncol*. 2010; 17: 2459–64.
47. Civantos FJ, Zitsch RP, Schuller DE, Agrawal A, Smith RB, Nason R, Petruzelli G, Gourin CG, Wong RJ, Ferris RL, El Naggar A, Ridge JA, Paniello RC, et al. Sentinel Lymph Node Biopsy Accurately Stages the Regional Lymph Nodes for T1-T2 Oral Squamous Cell Carcinomas: Results of a Prospective Multi-Institutional Trial. *J Clin Oncol*. 2010; 28: 1395–400. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.20.8777>.
48. Leusink FK, van Es RJ, de Bree R, Baatenburg de Jong RJ, van Hooff SR, Holstege FC, Slootweg PJ, Brakenhoff RH, Takes RP. Novel diagnostic modalities for assessment of the clinically node-negative neck in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol*. 2012; 13: e554-61.
49. Pramana J, Pimentel N, Hofland I, Wessels LFA, van Velthuysen M-LF, Atsma D, Rasch CRN, van den Brekel MWM, Begg AC. Heterogeneity of gene expression profiles in head and neck cancer. *Head Neck*. 2007; 29: 1083–9. <https://doi.org/10.1002/hed.20621>.