

**CARACTERIZAÇÃO DA REGIÃO 22q13.31
E SUA ASSOCIAÇÃO COM GENES
SUPRESSORES DE TUMOR EM CARCINOMAS
DE CABEÇA E PESCOÇO**

FERNANDA BERNARDI BERTONHA

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Prof^a Dra. Silvia Regina Rogatto

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Bertonha, Fernanda Bernardi

Caracterização da região 22q13.31 e sua associação com genes supressores de tumor em carcinomas de cabeça e pescoço /

Fernanda Bernardi Bertonha – São Paulo, 2012.

204p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Silvia Regina Rogatto

Descritores: 1. NEOPLASIAS DE CABEÇA E PESCOÇO. 2. GENES SUPRESSORES. 3. PROGNÓSTICO 4. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais **Ana Maria Bernardi Bertonha** e **Rubens Bertonha**, a minha avó-mãe **Conceição Matteuzzo Bernardi** e a minha avó **Maria Nardin Bertonha** (*in memoriam*), pelo apoio e amor incondicionais e exemplos de vida e superação. Saber que posso contar com vocês por toda a minha vida é o que me dá força e coragem para continuar. E onde quer que a vida me leve vocês estarão comigo, em meu coração e em meus pensamentos. Amo muito vocês!

“Para viver experiências, sempre estamos nos despedindo de alguma coisa que gostamos”.

(Gilberto Dimenstein)

“Sorria, brinque, chore, beije, morra de amor, sinta, sonhe, grite e, acima de tudo, viva. O fim nem sempre é o final. A vida nem sempre é real. O passado nem sempre passou. O presente nem sempre ficou e o hoje nem sempre é agora. Tudo o que vai, volta. E se voltar é porque é feito de amor”.

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente aos ***pacientes e seus familiares*** pela coragem, iniciativa e doação. Sem vocês esse trabalho seria inviável. Desejo que os resultados desse e de outros estudos possam retornar a vocês de forma produtiva e integral, e que toda dor e sofrimento possam ser amenizados. “*O sofrimento físico tem o dom de igualar estudiosos e iletrados*” (Drauzio Varella).

A minha orientadora, ***Dr^a Silvia Regina Rogatto***, pela oportunidade oferecida, experiências vividas em laboratório e fora dele e pela conduta ética e profissional. Seu exemplo de vida será sempre uma referência. Obrigada pelos valiosos nove anos de ensinamentos e por acreditar em mim e no meu potencial profissional. “*Na surpresa do aprendizado coexiste o real valor da gratidão pelo conhecimento ensinado*” (NaNa Caê).

À ***Dr^a Claudia Aparecida Rainho***, pela ajuda e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao ***Dr. Luiz Paulo Kowalski***, pelas amostras cedidas e pela atenção dispensada. Ao ***Thiago Celestino Chulam*** e ***Júlia M. F. Toyota***, por toda a ajuda.

À ***Dr^a Dirce Maria Carraro*** e ao ***Dr. Fernando Augusto Soares***, por cederem seus laboratórios e equipamentos, e a seus alunos que me auxiliaram nas análises e realizações de alguns experimentos.

À **Dr^a. Ana Cristina Victorino Krepschi** e à **Dr^a. Amanda Gonçalves da Silva**, pelos ensinamentos e auxílios em várias análises de dados.

À **Dr^a. Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz**, ao **Dr. Benedito Mauro Rossi** e à **Dr^a. Erika Maria Monteiro Santos** pelos ensinamentos, paciência e ajuda com os prontuários e heredogramas dos pacientes.

Aos **membros da banca examinadora**, por aceitarem o convite e contribuírem com seus conhecimentos científicos e experiências profissionais.

As minhas amigas distantes, mas sempre presentes: **Tatiana, Juliana, Heide** (prima-irmã), **Franca, Graziela, Bruna** e **Cibele**. "*A amizade, é um amor que nunca morre*".

Aos amigos que já foram companheiros de trabalho e tornaram a minha vida ainda melhor: **Cássia, Eliane, Eloisa, Fabíola, Geórgia, Haydée, Livia, Luciana, Miriam, Priscila, Renata C., Rodrigo**. "*Mesmo que as pessoas mudem e suas vidas se reorganizem, os amigos devem ser amigos para sempre, mesmo que não tenham nada em comum, somente compartilhem das mesmas recordações*" (Vinícius de Moraes).

Aos amigos de laboratório que fazem o dia a dia ser melhor e menos árduo: **Ana, Ana Carolina, Anderson, André, Ariane, Deborah, Fábio, Fernanda F., Francine, Graziela, Hellen, Juan, Julia, Karina, Maísa, Márcia, Marco, Mateus, Renata B., Rogério, Sandra D., Sandra V., Sara,**

Tatiane e Vanessa. *“Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha, mas não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso”* (Charles Chaplin).

Aos **pesquisadores** e **funcionários** do CIPE, Biblioteca, Pós-Graduação e Hospital A.C.Camargo.

À **FAPESP** (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo), pelo suporte financeiro.

RESUMO

Bertonha FB. **Caracterização da região 22q13.31 e sua associação com genes supressores de tumor em carcinomas de cabeça e pescoço.** São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Os fatores de risco mais importantes descritos para os carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) são o consumo de álcool e o uso de tabaco, além da infecção pelo vírus do papiloma humano. Entretanto, os agentes etiológicos conhecidos não explicam uma parcela significativa de casos. O objetivo deste estudo foi caracterizar a região 22q13.31 como contendo um candidato a supressor tumoral associado com os CCECP. Para isso foi inicialmente selecionado o gene *PHF21B* para avaliação do número de cópias gênicas e do perfil de metilação em amostras pareadas de DNA tumoral e do sangue periférico, assim como em linhagens celulares de CCECP. Além disso, foi analisada a expressão dos miRNAs *hsa-let-7a-3* e *hsa-let-7b*. Foram detectadas perdas do *PHF21B* em 43/75 amostras tumorais: 36/43 casos apresentavam história de câncer na família, sendo que 22/36 casos tinham história de câncer em parentes de 1º grau ($P=0,049$). Entre as amostras de sangue periférico, 6/49 casos apresentaram perdas para o *PHF21B*: 2/6 casos relataram história familiar de câncer. O sequenciamento direto das amostras de sangue e tumor de um subgrupo de casos não revelou alterações nos éxons estudados (3, 6, 7-9, 11). Na ausência de mutações, foi questionado o envolvimento de metilação anormal como um mecanismo alternativo de inativação de um supressor tumoral. A ilha CpG presente no promotor do gene também foi avaliada e se mostrou metilada em 13/37 amostras tumorais. Destes 13 casos, cinco apresentavam história de câncer em parentes em 1º grau e oito apresentaram perda do segmento genômico avaliado para o *PHF21B*. Em conjunto, estes dados sugerem que o gene *PHF21B* é um potencial supressor tumoral o qual pode ser inativado por um mecanismo genético

(deleção) e epigenético (silenciado por metilação). Na avaliação dos miRNAs, a expressão do *hsa-let-7a-3* foi menor no sangue ($p=0,002$) e no tumor ($p=0,006$) dos pacientes com história familiar de câncer em relação aos controles. Para o *hsa-let-7b* a expressão também foi significativamente diminuída no sangue dos pacientes, mas apenas marginalmente nos tumores ($p=0,079$). Amostras pareadas de DNA tumoral e de sangue periférico de 18 pacientes também foram avaliadas quando ao perfil genômico como um todo e na caracterização da região 22q13.31, onde encontram-se mapeados o *PHF21B*, *ARHGAP8* e os miRNAs estudados. Uma única amostra apresentou perda para o gene *ARHGAP8* e perda homozigota para o miRNA *hsa-let-7b*. Um subconjunto de casos pareados (sangue e tumor) compartilharam as mesmas alterações, sendo 11 classificadas como raras ou novas raras, sugerindo um papel potencial destas alterações na etiologia destes tumores. Em conjunto, os dados obtidos sugerem que os eventos de perda e metilação aberrante qualificam o gene *PHF21B* como um novo gene supressor tumoral envolvido em CCECP. As análises globais do genoma de indivíduos com CCECP abrem novos caminhos para a descoberta de genes que possam estar envolvidos em cânceres de cabeça e pescoço.

SUMMARY

Bertonha FB. **[Characterization of 22q13.31 region and its association with tumor suppressor genes in head and neck carcinomas]**. São Paulo; 2012. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

The most important risk factors for HNSCC are alcohol consumption and tobacco usage, besides human papilloma virus (HPV) infection. However, the known etiologic agents do not explain adequately a significant number of cases. The aim of this study was to characterize the 22q13.31 region as containing a candidate tumor suppressor gene. Initially, it was selected the *PHF21B* gene to assess both gene copy number and methylation profile in paired DNA samples from tumor and peripheral blood as well as in HNSCC cell lines. In addition, *hsa-let-7a-3* and *hsa-let-7b* miRNAs expression levels were evaluated. *PHF21B* losses were detected in 43/75 tumor samples: 36/43 cases presented family history of cancer, and 22/36 cases showed a first-degree family history ($P = 0.049$). Among peripheral blood samples, 6/49 cases showed *PHF21B*: 2/6 cases reported family history of cancer. In a subset of cases, direct sequencing was performed in paired tumor and blood samples revealing no alterations in the exons evaluated (3, 6, 7-9, 11). In the absence of mutations, the involvement of abnormal methylation was questioned as an alternative mechanism of tumor suppressor inactivation. The CpG island located at this gene promoter was also evaluated and has shown to be methylated in 13/37 tumor samples. Five out of 13 cases presented first-degree family history and 8/13 showed *PHF21B* losses. These data suggest that the *PHF21B* gene is a potential tumor suppressor that can be inactivated by genetic (deletion) and epigenetic (silenced by methylation) mechanism. The *hsa-let-7a-3* downexpression was detected in both blood ($P = 0.002$) and tumor ($P = 0.006$) samples of patients with family history of cancer compared with the controls. The *hsa-let-7b* downexpression was significantly associated with patients' blood, but only marginally in

tumors ($P = 0.079$). Paired blood and tumor DNA samples from 18 patients were also evaluated by genomic profile and to characterize the 22q13.31 region, where are mapped *PHF21B*, *ARHGAP8* genes and two miRNAs here evaluated. One case has shown *ARHGAP8* and *hsa-let-7b* miRNA losses. A subset of paired cases (blood and tumor) shared the same alterations, with 11 classified as rare or new rare, suggesting a potential role of these genes in the etiology of HNSCC. Overall, the data obtained suggest that the events of loss and aberrant methylation qualify the *PHF21B* as a new tumor suppressor gene involved in HNSCC. The genomic alterations in HNSCC patients play a fundamental role for the discovery of genes that may be involved in head and neck cancers etiology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Diagrama mostrando a localização e a estrutura do gene <i>PHF21B</i> , que possui 13 éxons e 128.539pb, no cromossomo 22q13.31.....	33
Figura 2	Diagrama mostrando o gene <i>PHF21B</i> com seus 13 éxons e suas ilhas CpG de números 21 e 273.....	37
Figura 3	Diagrama da ilha CpG associada ao promotor do gene <i>PHF21B</i> , de acordo com a localização física em 22q13.31 (UCSC <i>Genome Browser on Human, assembly GRCh37/hg19</i> , http://genome.ucsc.edu).....	82
Figura 4	Gráficos obtidos após a amplificação do DNA pela PCR em tempo real com oligonucleotídeos iniciadores direcionados para as regiões 1 (I), 2 (II) e 3 (III).....	83
Figura 5	Gráficos obtidos após a análise de HRM da região 1.....	84
Figura 6	Comparação em pares entre os grupos amostrais para os miRNAs <i>hsa-let-7a-3</i> (A) e <i>hsa-let-7b</i> (B).....	93
Figura 7	Comparação entre as amostras pareadas de sangue e tumor de um mesmo paciente para os miRNAs <i>hsa-let-7a-3</i> (A) e <i>hsa-let-7b</i> (B).....	95

Figura 8	Representação gráfica do número de alterações nas 19 amostras pertencentes ao grupo 1 (sangue periférico), por cromossomo. B) Representação gráfica do número de alterações nas 18 amostras pertencentes ao grupo 2 (amostras tumorais), por cromossomo. Imagens obtidas no programa Graphpad Prism 5.....	97
Figura 9	Ideogramas ilustrando as alterações genômicas encontradas nos 37 casos de CCECP avaliados pela técnica de aCGH.....	99
Figura 10	Representação gráfica das alterações presentes no grupo 1 (N) e 2 (T).....	100
Figura 11	Representação gráfica das 12 sondas intrônicas para o gene <i>PHF21B</i> presentes na plataforma 4x180K da Agilent Technologies e da sonda para o miRNA <i>hsa-let-7b</i> , para cada um dos 18 casos N e T.....	108
Figura 12	Representação gráfica das 13 sondas para os genes <i>PRR5-ARHGAP8</i> presentes na plataforma 4x180K da Agilent Technologies, para cada um dos 18 casos N e T.....	111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estadiamento clínico da AJCC para os cânceres da cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe. qq: qualquer.....	4
Tabela 2	Descrição de todas as linhagens celulares de CCECP utilizadas no presente estudo.....	41
Tabela 3	Relação dos casos avaliados para cada uma das metodologias aplicadas no estudo.....	42
Tabela 4	Dados clínicos dos 102 pacientes com CCECP incluídos no estudo.....	47
Tabela 5	Descrição dos genes e das sequências dos iniciadores utilizados para avaliação das amostras de DNA.....	52
Tabela 6	Sequências dos iniciadores utilizados no sequenciamento direto (F, iniciadores <i>forward</i> ; R, iniciadores <i>reverse</i>).....	55
Tabela 7	Casos de CCECP avaliados pela metodologia de aCGH.....	63
Tabela 8	Distribuição das amostras tumorais e de sangue periférico de acordo com os resultados de qPCR para o gene <i>PHF21B</i>	72
Tabela 9	Caracterização das amostras avaliadas por sequenciamento direto.....	76
Tabela 10	Amostras avaliadas pelo sequenciamento direto do gene <i>PHF21B</i> e a relação com a análise pela qPCR no sangue e tumor e presença de história familiar.....	78

Tabela 11	Análise da metilação do DNA por HRM nas linhagens celulares, amostras de sangue periférico e amostras tumorais, de acordo com a região 1 referente à ilha CpG 273.....	86
Tabela 12	Distribuição das amostras tumorais quanto a presença de metilação na região 1 da ilha CpG273.....	89
Tabela 13	Comparações entre a expressão de <i>hsa-let-7a-3</i> e <i>hsa-let-7b</i> em sangue de indivíduos saudáveis sem histórico de câncer pessoal ou em parentes de primeiro grau (grupo 1), sangue de indivíduos com CCECP (grupo 2) e seus respectivos tumores (grupo 3).....	94
Tabela 14	Resultados comparativos para três das metodologias.....	95
Tabela 15	Alterações estatisticamente significantes encontradas no grupo 1 (amostras de DNA de sangue periférico dos pacientes com CCECP), após comparação com o DGV e o banco de indivíduos saudáveis.....	103
Tabela 16	Alterações estatisticamente significantes encontradas no grupo 2 (amostras de DNA de tumor dos pacientes com CCECP), após comparação com o DGV e o banco de indivíduos saudáveis (REF).....	105
Tabela 17	Perdas genômicas homozigotas encontradas nas amostras tumorais.....	113
Tabela 18	Resultado da comparação das alterações genômicas nas amostras pareadas normais e tumorais do mesmo paciente.....	116

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aCGH ou CGH-arrays	Array-CGH; Hibridação Genômica Comparativa Baseada em Microarrays
AF	Anemia de Fanconi
AJCC*	The American Joint Committee on Cancer
AZA-CdR	5-aza-2'-Desoxicitidina
BAC*	Bacterial Artificial Chromosome
BLAST*	Basic Local Alignment Search Tool
CAC	Carcinomas Adrenocorticais
CCECP	Carcinomas de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço
CCEO	Carcinoma de Células Escamosas de Cavidade Oral
CCEOF	Carcinoma de Células Escamosas de Orofaringe
CCP	Câncer de Cabeça e Pescoço
cDNA*	Complementary DNA
CEC	Carcinoma Espinocelular
CGH*	Comparative Genomic Hybridization
CNA*	Copy Number Alteration
CNV*	Copy Number Variation
Cy*	Cyanine
DC	Disqueratose congênita
DGV*	Database of Genomic Variants
DMEM*	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA*	Deoxyribonucleic Acid
dNTP*	Deoxynucleotide Triphosphates
EBV*	Epstein-Barr Virus
EDTA*	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
FAMMM*	Familial Atypical Multiple Mole Melanoma
FAMMM-PC*	Familial Atypical Multiple Mole Melanoma-

	Pancreatic Cancer
FASST2*	Fast Adaptive States Segmentation Technique 2
FISH*	Fluorescence In Situ Hybridization
FN	Fator de Normalização
gDNA	Genomic DNA
HCl	Ácido Clorídrico
HMM*	Hidden Markov Model
HNPCC*	Hereditary Non-Polyposis Colorectal Carcinoma; Síndrome de Lynch
HPV*	Human Papilloma Virus
HR-HPV*	High Risk-Human Papilloma Virus
HRM*	High Resolution Melting
HSV-1*	Herpes Simplex Virus-1
HSV-2*	Herpes Simplex Virus-2
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INHANCE*	International Head And Neck Cancer Epidemiology
LFL	Li-Fraumeni-like
Log	Logaritmo
LOH*	Loss of Heterozigosity
LPFS*	Locoregional Progression-Free Survival
miRNA*	microRNA
MLPA*	Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification
mRNA*	Messenger RNA
NaCl	Cloreto de Sódio
NCBI*	National Center for Biotechnology Information
Nd	Informação Não Determinada
NR	Nova rara
OR*	Odds Ratio
ORF*	Open Reading Frame
OVS*	Overall Survival
PCR*	Polymerase Chain Reaction

PHD*	Plant Homeodomain
PHF21B*	PHD finger protein 21B
qPCR*	Quantitative Real Time - PCR
R	Rara
RNA*	Ribonucleic Acid
RR*	Relative Risk
RT-PCR*	Reverse Transcription - PCR
RT-qPCR*	Reverse Transcription - qPCR
SAP*	Shrimp Alkaline Phosphatase
SDS*	Sodium Dodecyl Sulfate
SLF	Síndrome de Li-Fraumeni
SNP*	Single-Nucleotide Polymorphism
SPSS*	Statistical Package for the Social Sciences
TSA*	Tricostatin A
UCSC*	University of California, Santa Cruz
UNG*	Uracil-N-Glicosilase
URR*	Upstream Regulatory Region
UTR*	Untranslated Region
VHL	Síndrome de von Hippel-Lindau
WHO*	World Health Organization

*siglas ou abreviaturas derivadas do inglês;

A lista de genes foi gerada pelo *software* Nexus 6.0 (*BioDiscovery Inc.*)

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP).....	1
1.2	Fatores de risco e de predisposição ao CCECP	5
1.3	Alterações genéticas em CCECP	12
1.4	Alterações epigenéticas no CCECP	19
1.5	Evidências da predisposição hereditária ao CCECP	25
1.6	O gene <i>PHF21B</i>	32
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo Geral.....	39
2.2	Objetivos Específicos	39
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	Caracterização das amostras	40
3.2	Caracterização dos pacientes	41
3.3	Metodologias	49
3.3.1	PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	50
3.3.2	Sequenciamento direto.....	53
3.3.3	Análise de metilação	57
3.3.4	Análise da expressão dos miRNAs <i>hsa-let-7a-3</i> e <i>hsa-let-7b</i> por RT- qPCR.....	60
3.3.5	Análise das alterações no número de cópias genômicas pela array- CGH	62
3.3.6	Análises estatísticas	67
4	RESULTADOS	69
4.1	Avaliação das características clínico-patológicas.....	69
4.2	Análise do número de cópias do gene <i>PHF21B</i> no DNA tumoral e do sangue periférico de pacientes com CCECP pela qPCR	70

4.3	Análise de mutações no gene <i>PHF21B</i> pelo sequenciamento direto.....	75
4.4	Análise do perfil de metilação por HRM	80
4.5	Análise da expressão dos miRNAs <i>hsa-let-7a-3</i> e <i>hsa-let-7b</i>	91
4.6	Análise genômica pela aCGH.....	96
4.6.1	Investigação do gene <i>PHF21B</i> e seus arredores em 22q13.31	107
4.6.2	Análise das alterações compartilhadas nas amostras pareadas de cada indivíduo	115
5	DISCUSSÃO	124
6	CONCLUSÕES	161
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	163

ANEXOS

- Anexo 1** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)
- Anexo 2** Aprovação do projeto no Comitê de Ética e Pesquisa
- Anexo 3** Dados Clínicos dos 102 pacientes com CCECP estudados.
- Anexo 4** Exemplos de heredogramas de sete famílias com história de câncer de cabeça e pescoço e cânceres relacionados
- Anexo 5** Parâmetros de qualidade (QC Metrics), fornecidos pela Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), a serem seguidos após os experimentos de marcação, hibridação e extração dos dados de aCGH.
- Anexo 6** Parâmetros utilizados na análise dos dados de aCGH pelo Software Nexus 6.0).
- Anexo 7** Variáveis clínico-patológicas avaliadas nos 102 pacientes com CCECP.
- Anexo 8** Resultados da análise de qPCR para o gene *PHF21B* nas 75 amostras tumorais avaliadas.
- Anexo 9** Resultados da análise de qPCR para o gene *PHF21B* nas 49 amostras de sangue periférico dos pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço.

- Anexo 10** Avaliação pelo software GeNorm da estabilidade de expressão dos miRNA testados em um subgrupo de 14 amostras.
- Anexo 11** Avaliação pelo software GeNorm dos miRNAs normalizadores mais estáveis.
- Anexo 12** Análise para determinação de normalizadores
- Anexo 13** Avaliação pelo software GeNorm dos miRNAs normalizadores mais estáveis.
- Anexo 14** Perfis de hibridação de um caso pareado (caso 66) entre a amostra sangue periférico e do tumor
- Anexo 15** Variações no número de cópias para o gene *PHF21B* segundo o banco de dados Database of Genomic Variation (*Human genome build* GRCh 37 – Hg19).

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO (CCECP)

O carcinoma de células escamosas é a doença mais comum da região da cabeça e pescoço, sendo responsável por >90% dos casos (CASSIDY et al. 2010).

Os tumores do trato aerodigestivo superior localizam-se em diferentes sítios anatômicos e apresentam distintos comportamentos tumorais, prognósticos e severidades distintos. Os padrões de crescimento e invasão também podem variar dependendo da barreira anatômica encontrada ou vias que previnem ou permitem a extensão tumoral (HUNTER et al. 2005; KOCH e NANCE 2010), proporcionando, assim, a base para tratamentos específicos (ADELSTEIN e RODRIGUEZ 2008).

Dados em literatura sugerem que os CCECP surgem de um processo de múltiplas etapas, que envolve o acúmulo de alterações genéticas múltiplas moduladas por predisposição genética e ou fatores ambientais (tabaco, álcool, inflamação crônica, infecções virais, entre outros), mudanças no sistema imunológico, indução de vascularização (incluindo angiogênese) e a disseminação das células tumorais (invasão tumoral local e metástases à distância) (JIN et al. 2002; CHOI et al. 2003; WALSH et al. 2007; CHOI e MYERS 2008; PÉREZ-SAYÁNS et al. 2009).

Embora novas estratégias terapêuticas tenham sido desenvolvidas, a incidência destes carcinomas continua alta e é associada a alta mortalidade, devido ao seu potencial infiltrativo (TSANTOULIS et al. 2007; DE HERDT e BAATENBURG DE JONG 2008; GOLD et al. 2009; KOCH e NANCE 2010) ou ao diagnóstico tardio da doença, um achado frequente em países em desenvolvimento (AHMED et al. 2009; BAYKUL et al. 2010).

O carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço é o sexto tipo de câncer de maior incidência mundial (LEEMANS et al. 2011), sendo ainda a oitava causa de morte por câncer no mundo (FUNG e GRANDIS 2010). Mundialmente foram estimados 600.000 novos casos para o ano de 2011, sendo que apenas 40-50% dos pacientes com CCECP teriam uma sobrevida de 5 anos (LEEMANS et al. 2011).

Para o ano de 2012, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) do Brasil estima 9.990 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 4.180 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 10 casos novos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores da pele não melanoma, o câncer da cavidade oral em homens é o quinto mais frequente na região sudeste (15/100 mil). Para as mulheres, é o nono mais frequente também na sudeste (6/100 mil). Para o câncer de laringe, são estimados 6.110 casos novos com um risco estimado de 6 casos a cada 100 mil homens. Sem considerar os tumores da pele não melanoma, o câncer da laringe é o sétimo mais incidente em homens na região sudeste do Brasil (8/100 mil) (Ministério da Saúde 2011).

A doença ainda acomete mais homens do que mulheres, numa razão

de 2:1. Mas a incidência mundial deste tumor está aumentando entre as mulheres e diminuindo entre os homens (CURADO e HASHIBE 2009). Embora a maioria dos CCECP ocorra em indivíduos mais velhos (idade superior a 50 anos, sendo 64 anos a idade média de apresentação da doença), um número aumentado de jovens tem apresentado a doença, com mais de 5,5% deles com idade inferior a 40 anos (OLIVER et al. 2000; TOROSSIAN et al. 2000; JEMAL et al. 2006; TONER e O'REGAN 2009). A exposição a carcinógenos e mutações em *TP53* são menos frequentes em pacientes nesta faixa etária, entretanto este grupo parece ser mais suscetível a múltiplos cânceres (KOCH et al. 1999).

O prognóstico para os pacientes com CCECP é determinado principalmente pelo estadiamento clínico ao diagnóstico. A extensão do tumor, assim como a presença de metástase nos linfonodos e metástase à distância determinam o estadiamento (LEEMANS et al. 2011). O sistema de estadiamento clínico recomendado é o da *The American Joint Committee on Cancer-AJCC* (EDGE et al. 2009) para os cânceres da cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe (Tabela 1).

Tabela 1 - Estadiamento clínico da AJCC para os cânceres da cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe.

Estadiamento Clínico	TNM
0	Tis N0 M0
I	T1 N0 M0
II	T2 N0 M0
III	T3 N0 M0
	T1-3 N1 M0
IVA	T4a N0/1 M0
	T1-4a N2 M0
IVB	T4b qqN M0
	qqT N3 M0
IVC	qqT qqN M1

qq: *qualquer*. T: tamanho do tumor; N: comprometimento de linfonodos; M: presença de metástase à distância.

Fonte: EDGE et al. (2009)

Um terço dos pacientes apresenta a doença em estágio precoce quando comparado aos casos típicos que se apresentam em estágio avançado, já com metástases em linfonodos. Para os casos em que a doença é diagnosticada precocemente, o tratamento indicado é a cirurgia ou a radioterapia, tendo em geral, um prognóstico favorável. Já para os tumores avançados, o tratamento é a cirurgia combinada com a radioterapia pós-operatória. Na última década, protocolos que visam a preservação dos órgãos, com quimioterapia combinada à cirurgia, têm sido utilizados principalmente em pacientes com tumores moderadamente avançados de laringe e faringe, em pacientes com idade inferior a 70 anos (LEEMANS et al. 2011).

Aproximadamente 20-50% dos pacientes apresenta recidiva locorregional, a qual contribui para a maioria das mortes por carcinomas de cabeça e pescoço. Para os cânceres de laringe, 90% das recorrências

ocorrem em três anos (CASSIDY et al. 2010).

1.2 FATORES DE RISCO E DE PREDISPOSIÇÃO AO CCECP

Entre os principais fatores de risco (80-90% dos casos) associados aos CCECP está o consumo de álcool e o de tabaco (RODRIGUEZ et al. 2004; KIM et al. 2010; LEEMANS et al. 2011). Estudos apontam que o hábito de fumar e beber estabelece um sinergismo entre esses dois fatores de risco, aumentando 30 vezes o risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer (CASSIDY et al. 2010). Esses dois fatores associados somam mais de 75% dos casos de câncer de cabeça e pescoço. O fumo está associado com um aumento de mais de 10 vezes no risco de desenvolvimento de todos os cânceres de cabeça e pescoço e é responsável por cerca de 42% das mortes pela doença. Já o etilismo pesado corresponde a, aproximadamente, 16% dos óbitos (Ministério da Saúde 2011; CASSIDY et al. 2010). Etilistas “pesados” são considerados aqueles que consomem 3,5 drinques/dia e etilistas “abusivos” aqueles que consomem 5,4 drinques/dia (ABEL et al. 1998), sendo que um drinque corresponde a uma taça de vinho ou 355mL de cerveja ou 45mL de uísque.

Dados epidemiológicos recentes indicam que o papilomavírus humano de alto risco (do inglês, *high risk-human papilloma virus*, HR-HPV), similar ao envolvido no surgimento e no desenvolvimento do câncer cervical, também está associado a um subconjunto de CCECP (GILLISON et al. 2000; ZUR HAUSEN 2002), principalmente o de orofaringe. Em adição ao

número estimado de 492.800 cânceres cervicais causados por HPV em todo o mundo, aproximadamente 30.000 casos de câncer de orofaringe são causados pelo mesmo vírus (D'SOUZA e DEMPSEY 2011).

O carcinoma de células escamosas de orofaringe (CCEOF), quando positivo para HPV, é considerado como uma entidade clinico-patológica distinta associada a um melhor prognóstico (DAHLSTRAND et al. 2008; VIDAL e GILLISON 2008). Os casos positivos estão vinculados a fatores de risco relacionados ao comportamento sexual e estão associados aos carcinomas cervicais e a um aumento na probabilidade de atividade orogenital. Por outro lado, os casos negativos estariam principalmente relacionados aos principais fatores de risco, incluindo o consumo de álcool e tabaco (LOWY e MUNGER 2010).

As taxas de incidência para o câncer da cavidade oral relacionado à infecção pelo HPV, como amígdala, base da língua e orofaringe, aumentam entre adultos jovens em ambos os sexos (Ministério da Saúde 2011; AULUCK et al. 2010; HOCKING et al. 2011) Parte desse aumento pode ser atribuído a mudanças no comportamento sexual (Ministério da Saúde 2011; D'SOUZA et al. 2009; JEMAL et al. 2011).

Os HPVs são vírus de DNA em dupla fita que pertencem à família *Papillomaviridae* (DE VILLIERS et al. 2004). Seu ciclo de vida difere do de todas as outras famílias de vírus: a infecção requer a disponibilidade de células epiteliais da mucosa ou epiderme, que sejam hábeis à proliferação (células da camada basal) (ZUR HAUSEN 1996).

Os tipos de HPV preferencialmente encontrados nos cânceres

cervicais e em outros anogenitais foram designados como de “alto risco”. De forma oposta, aqueles encontrados primariamente em verrugas genitais e lesões não malignas foram nomeados como tipos de “baixo risco” (ZUR HAUSEN 1986). Os tipos de alto risco são: HPV 16, 18, 31, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 59, 66, 68, 69, 73 e 82. Os tipos de baixo risco são: HPV 6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 61, 70, 72, 81 e CP6108 (SHUKLA et al. 2009). O HPV16 é o responsável por mais de 85% de todos os CCECP associados à infecção pelo HPV e é encontrado em 1,3% dos adultos saudáveis (KREIMER et al. 2010).

O genoma do HPV apresenta três domínios: uma URR (do inglês, *upstream regulatory region*) não codificadora, uma região de função precoce (*early*, em inglês) com seis ORFs (do inglês, *open reading frames*) — *E6*, *E7*, *E1*, *E2*, *E4* e *E5* e uma região de função tardia (*late*, em inglês) contendo os genes *L1* e *L2*, responsáveis por codificar proteínas do capsídeo. A molécula viral frequentemente se integra ao DNA da célula hospedeira (WERNESSE et al. 1990) levando ao aumento de expressão dos genes *E6* e *E7* (ZUR HAUSEN 2002).

Quase todos os casos HPV positivos expressam as oncoproteínas virais *E6* e *E7*. Cada uma dessas proteínas perturba uma variedade de mecanismos celulares regulatórios predominantemente antiproliferativos, como os que envolvem as proteínas *p53* e *pRb* (McLAUGHLIN-DRUBIN e MÜNGER 2009). O gene *TP53*, o qual é inativado em nível proteico pela *E6*, permanece com seus alelos do tipo selvagem em quase todos os tumores HPV positivos, enquanto nos tumores negativos o gene apresenta-se

frequentemente mutado. Os casos HPV positivos, apresentam inativação da proteína pRb pela E7 e expressam a proteína p16, embora sua atividade supressora de tumor seja perdida por ser mediada pela pRB (inativa) (LOWY e MUNGER 2010).

Assim, os pacientes com carcinomas de orofaringe podem se beneficiar quanto à prevenção e ao tratamento considerando as diferenças existentes entre os dois tipos (HPV positivos ou negativos). Por exemplo, nos cânceres positivos esforços na tentativa de inibir a expressão ou atividade de E6 e E7 podem resultar em um tratamento mais efetivo (RAMPIAS et al. 2009). Além disso, a sobrevida dos pacientes com CCECP positivo para HPV é notavelmente maior do que a de pacientes com tumores negativos para o HPV (sobrevida em três anos de 84% vs. 57%, respectivamente) (ANG et al. 2010).

A função normal da proteína p53 é perdida em uma grande parcela dos tumores, inclusive nos carcinomas de cabeça e pescoço, devido a mutações ou deleções no gene *TP53* ou devido a um aumento na expressão de reguladores negativos da função do *TP53*. Mutações no gene *TP53* foram relatadas em mais de 50% dos casos de CCECP (DESHPANDE e WONG 2008).

A perda de heterozigose (do inglês, *loss of heterozigosity*, LOH) para o locus do *TP53* foi relatada em aproximadamente 60% dos carcinomas de células escamosas orais (ERBER et al. 1998; GOTTE et al. 2001; RODRIGO et al. 2001). O perfil de expressão da p53 é alterado em tumores, nos quais as formas mutantes, que são altamente estáveis, são facilmente detectadas

por análises de expressão proteica por imunistoquímica. A expressão aumentada da p53 é observada em aproximadamente 65% dos CCECP (DE OLIVEIRA et al. 2007; KARSAI et al. 2007).

As mutações são frequentemente encontradas nos éxons 5 a 9 e as transversões nos códons 157, 173 e 273 são consideradas características da exposição ao tabaco (CARDESA e NADAL 2011). A infecção pelo HPV e as mutações em *TP53* podem algumas vezes ocorrer de forma conjunta nos CCECP (HAFKAMP et al. 2003), mas mutações genéticas destrutivas em *TP53* não são encontradas nos casos HPV positivos (WESTRA et al. 2008).

Mutações germinativas em *TP53* são associadas com a síndrome de Li-Fraumeni (OMIM# 151623), uma doença herdada caracterizada por um agrupamento familiar de sarcomas, cânceres de mama, tumores cerebrais e carcinomas adrenocorticais (MALKIN et al. 1990). No Brasil, uma mutação germinativa específica caracterizada pela troca de arginina por histidina no códon 337 (c.1010G>A, p.R337H) têm sido relacionada à tumorigênese (RIBEIRO et al. 2001; PIOVEZAN 2006; OLIVIER et al. 2010), embora o espectro de tumores associados ainda não esteja bem estabelecido (SEIDINGER et al. 2011).

Essa mutação foi primeiramente identificada em crianças com carcinomas adrenocorticais (CAC) sem história familiar de câncer (RIBEIRO et al. 2001). Posteriormente, a mutação foi identificada em famílias brasileiras com a síndrome de Li-Fraumeni ou Li-Fraumeni-*like* (SLF ou LFL, respectivamente) (ACHATZ et al. 2007). A frequência alélica de p.R337H na população do sul do Brasil é aproximadamente 300 vezes maior do que

qualquer outra mutação em *TP53* associada a SLF (ACHATZ et al. 2009).

Até o presente, não há relatos em literatura do estudo dessa mutação em famílias que apresentam carcinomas de cabeça e pescoço.

A inativação de *CDKN2A* é uma alteração relevante em CCECP queratinizados. É caracterizada pela perda da regulação da atividade catalítica do complexo CDK4/ciclina D1 que induz a progressão do ciclo celular. Alterações genéticas em *CDKN2A* foram encontradas em 57% dos carcinomas de laringe (CARDESA e NADAL 2011). Destas, 27% eram mutações, 23% eram deleções homozigotas e 7% eram hipermetilações. O gene *CDKN2A* codifica dois transcritos, o p14^{ARF} e o p16^{INK4a}. A perda de heterozigose em 9p21-23 (locus do *CDKN2A*) está fortemente correlacionada ao aumento de expressão da ciclina D1 em CCECP em estágios avançados (JARES et al. 1999). A amplificação da *CCND1* foi observada em 37% dos tumores e a expressão aumentada da proteína foi observada em 35% desses casos. Essa associação foi particularmente relevante nos tumores avançados onde a amplificação gênica e o aumento da expressão do mRNA foram relatados em 60% dos casos (NADAL et al. 2007).

Outros vírus, como o vírus simples da herpes 1 (do inglês, *herpes simplex virus-1*, *HSV-1*) e 2 (do inglês, *herpes simplex virus-2*, *HSV-2*), estão associados ao carcinoma oral. A infecção pelo vírus *Epstein-Barr* (do inglês, *Epstein-Barr virus*, *EBV*) foi associada com carcinomas de nasofaringe e tumores de glândulas salivares. Já a infecção crônica pela sífilis parece estar relacionada ao câncer da cavidade oral, particularmente da língua

(CASSIDY et al. 2010).

Além desses fatores de risco clássicos e das infecções por vírus, certas doenças como a anemia de Fanconi (AF) e a displasia congênita (DC) também predisõem ao CCECP. Ambas, a AF e a DC são síndromes hereditárias que causam falência da medula óssea e estão associadas com o desenvolvimento precoce do CCECP na ausência dos fatores de risco comuns, como o consumo de tabaco e álcool. Pacientes com AF têm um risco aumentado em 700 vezes de apresentar CCECP do que a população em geral e tendem a desenvolver a doença em idade jovem (ROSENBERG et al. 2003; ALTER et al. 2005).

Outras doenças como o Xeroderma Pigmentoso, a Ataxia Telangiectasia e a Síndrome de Bloom, que se caracterizam por mutações em genes *caretakers* (assim definidos por manterem a integridade do genoma por mecanismos de reparo de DNA), apresentam um aumento na incidência de segundos tumores primários, incluindo câncer oral (PRIME et al. 2001; SMITH et al. 2010). Em contraste, excluindo a síndrome de Li-Fraumeni, anormalidades em genes *gatekeepers* (ou seja, aqueles que atuam no controle do crescimento celular de forma direta, pela inibição da proliferação celular e/ou promovendo a morte celular) não predisõem ao carcinoma oral (PRIME et al. 2001).

A presença de mutações em genes de alta penetrância na linhagem germinativa confere um risco aumentado de desenvolvimento a determinados tipos de tumores, levando ao aparecimento da doença em idade precoce quando comparados aos cânceres esporádicos do mesmo

tipo (HITCHINS 2010).

1.3 ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM CCECP

Múltiplos eventos genéticos e epigenéticos, incluindo a expressão e função aberrantes de moléculas reguladoras da sinalização celular, crescimento, sobrevivência, motilidade, angiogênese e do controle do ciclo celular, são responsáveis pela aquisição progressiva do fenótipo maligno em CCECP (MOLINOLO et al. 2009; KLEIN e GRANDIS 2010). Mutações em oncogenes e genes supressores de tumor podem levar a alterações em fatores de crescimento, em receptores na superfície celular, fatores de transcrição ou mensageiros de sinalização intracelular (CAMPO-TRAPERO et al. 2008) atuando de forma crítica no processo tumoral.

Os genes supressores de tumor podem ser inativados por eventos como mutações, perda de heterozigose, deleção, ou modificações epigenéticas como a metilação do DNA (WEINBERG 1991; CAVENEE e WHITE 1995; VERMA e TRIANTAFILLOU 1998; FUKAZAWA et al. 2007; CHOI e MYERS 2008; PÉREZ-SAYÁNS et al. 2009). Juntamente com a perda da atividade de supressão tumoral, essas alterações podem levar a um fenótipo caracterizado por aumento da proliferação, perda de coesão celular e infiltração de tecidos adjacentes causando metástases à distância (CAMPO-TRAPERO et al. 2008).

Análises citogenéticas moleculares e clássicas, incluindo FISH (do inglês, *Fluorescence In Situ Hybridization*) e CGH (do inglês, *Comparative*

Genomic Hybridization) têm permitido a identificação de alterações genômicas envolvidas no processo de gênese e progressão dos carcinomas de cabeça e pescoço (MARTIN et al. 2008). Em uma meta-análise dos relatos publicados em literatura e dados disponíveis em bancos de dados contendo análises de CGH em CCECP, CANEVARI e ROGATTO (2004) relataram que as regiões mais frequentemente envolvidas em ganhos foram 1q, 3q, 5p, 7, 8q, 9q, 11q, 16p, 17q, 19, 20 e 22q, enquanto as perdas foram em 1p, 2q, 3p, 4, 5q, 6q, 8p, 9p, 10q, 11, 13, 17p, 18q, 19, 21q e 22q. As regiões preferencialmente envolvidas em rearranjos não balanceados permitem a inferência de regiões potencialmente candidatas para a localização de oncogenes e genes supressores tumorais. Ganhos em 3q26 e 11q13 e deleções em 8p23 e 22q foram sugeridos como regiões contendo potenciais marcadores da agressividade da doença (BOCKMÜHL et al. 2000; ASHMAN et al. 2003).

MARTIN et al. (2008) avaliaram 31 linhagens celulares de carcinomas orais e demonstraram que as alterações estruturais mais frequentes envolviam os cromossomos 3, 7, 8, 9 e 11. Em 11 linhagens avaliadas pela CGH, os autores encontraram perda de 3p e ganhos em 3q, 8q e 20q em mais da metade dessas linhagens.

A hibridação genômica comparativa baseada em *microarrays* (CGH-*array*) é uma tecnologia que permite a identificação de alterações no número de cópias genômicas, tornando possível a detecção em alta resolução de microdeleções e microamplificações (GARNIS et al. 2003; PINKEL e ALBERTSON 2005; VISSERS et al. 2005; LOCKWOOD et al. 2006; HALL et

al. 2010; RUANO et al. 2010).

Essas alterações genômicas são denominadas variações no número de cópias (do inglês, *copy number variation*, *CNV*) e são definidas como deleções e duplicações de segmentos de DNA maiores que 1Kb, até vários Mb, presentes em número de cópias variáveis quando comparado com um genoma de referência (FREEMAN et al. 2006; FEUK et al. 2006; KEHRER-SAWATZKI 2007). Estas alterações são herdadas. Ao contrário, as CNAs (do inglês, *copy number alterations*, *CNAs*) são alterações somáticas adquiridas mais frequentemente observadas em tecidos tumorais (SUN et al. 2009; CURTIS et al. 2012).

Muitos dos modelos propostos para explicar esses rearranjos complexos envolvem a quebra do DNA e a ação coordenada entre duplicação do DNA e mecanismos de reparo e recombinação. Entre eles estão a recombinação homóloga não alélica (do inglês, *NAHR*), *Fork Stalling Template Switching (FoSTeS)*, *Microhomology Mediated Break-Induced Repair (MMBIR)* e *Breakage–Fusion–Bridge cycle (BFB)* (COLNAGHI et al. 2011), resultando em duplicação, inversão ou deleção de sequências intermediárias. Dessa maneira, como são variações estruturais do genoma, elas potencialmente podem alterar a dosagem gênica interferindo na estrutura e na regulação da expressão de genes supressores de tumor e ou oncogenes (ESTIVILL e ARMENGOL 2007; HENRICHSEN et al. 2009; IONITA-LAZA et al. 2009).

Com o aumento da correlação genótipo-fenótipo as CNVs que um dia foram consideradas benignas ou de significado clínico desconhecido (BENN

e HSU 2004; WYANDT e TONK 2004) são agora conhecidas por estarem associadas a síndromes genéticas específicas (KOOLEN et al. 2006; SHAW-SMITH et al. 2006; REDON et al. 2006; HENRICHSEN et al. 2009; IONITA-LAZA et al. 2009), doenças cardiovasculares (McCARROLL et al. 2006), neoplasias (KLEINJAN e VAN HEYNINGEN 2005; STRANGER et al. 2007), doenças autoimunes e doenças do sistema nervoso (FANCIULLI et al. 2010). Tais associações são interessantes quando uma CNV particular é observada entre indivíduos não relacionados com sintomas clínicos similares e/ou quando alterações genômicas co-segregam em famílias com múltiplos indivíduos afetados (RODRIGUEZ-REVENGA et al. 2007).

Os resultados das análises de CGH-arrays nem sempre são concordantes, mas ganhos em 8q, 3q, 20q, 11q e 9q, e perdas em 4q, 3p, 5q, 15q e 18q são alterações genéticas prevalentes em CECs orais (LEEMANS et al. 2011).

BALDWIN et al. (2005) utilizando a plataforma *Whole Genome Tiling-Path* (contendo 32433 BACs) em 20 amostras de CECs orais, demonstraram que a perda em 3p era a alteração mais frequente, seguida das perdas envolvendo os cromossomos 4, 5q, 8p, 9p, 10q, 11, 18q e 21q. Ganhos em 8q, seguido de 3q e em 9q, 11q (*CCND1*), 14q, e 20q, assim como 7p11.2 (*EGFR*) estavam presentes em 40% dos casos avaliados. Os autores relataram alterações não previamente descritas (presentes em 7-15 dos 20 casos avaliados) incluindo ganhos em 3q23, 5p15.2 (*TRIO*), 7p12.3-13, 7q21.2 (*CDK6*), 7q35 e 11q22.2-22.3 (cluster *MMP*) e perdas em 2p15, 4q34.3 e 16q23.2.

LIU et al. (2006) avaliaram oito casos de carcinomas orais pela CGH-*array* e relataram ganhos nos genes *LMYC*, *REL*, *TERC*, *PIK3CA*, *MYB*, *MDR1*, *HRAS*, *GARP*, *CCND2*, *FES*, *HER2*, *SIS*, e *SRY* e perdas em *p44S10*, *TIF1*, *LPL*, *MTAP*, *BMI1*, *EGR2*, e *MAP2K5*. Os autores também identificaram genes classificadores (*TGFB2*, *CRBP1*, *PIK3CA*, *HTR1B*, *HRAS*, *ERBB3* e *STK6*) numa análise comparativa entre o tumor primário e a metástase, assim como genes que se mostraram associados à sobrevida global (*PRKCZ*, *ABL1* e *FGF4*).

O'REGAN et al. (2006) avaliaram alterações genômicas em carcinomas orais, pela metodologia de CGH-*arrays*. Os autores demonstraram que os tumores de pacientes jovens (≤ 40 anos), particularmente não fumantes, apresentavam perfis genômicos com menor número de alterações quando comparados aos demais cânceres orais. Os genes alterados nos tumores de pacientes jovens eram os mesmos do grupo de pacientes com idade superior a 40 anos, não havendo alterações genômicas exclusivas do primeiro grupo. Porém, no grupo de pacientes jovens, não foram detectadas alterações tidas como de grande importância para o desenvolvimento do carcinoma oral, como deleções em *CDKN2A* (*p16^{INK4}*) e *APC*.

SPARANO et al. (2006) também utilizaram a metodologia de CGH-*array* (plataforma com 4134 clones de BAC) em 21 CECs orais. As regiões genômicas frequentemente amplificadas ($>35\%$) estavam localizadas em 3q, 5p, 8q, 9q e 20q, enquanto as deleções ($>40\%$) estavam mapeadas em 3p, 8p, 13q e 18q. Genes associados à via de resposta a danos no DNA estavam

frequentemente alterados, incluindo *BRCA1*, *BRCA2*, *FANCD2* e *FANCG*. Outros genes relacionados a síndromes de câncer hereditário foram relatados como alterados, incluindo o gene supressor tumoral *VHL* (associado à síndrome de von Hippel-Lindau), o gene de reparo a danos no DNA, *MLH1* (associado ao HNPCC – carcinoma de cólon não polipose hereditário), o gene *XPC* (associado à síndrome Xeroderma Pigmentoso) e o gene supressor tumoral *RB1* (associado ao retinoblastoma). Os autores sugeriram que a frequência aumentada de CNVs em genes já associados a síndromes de câncer hereditário encorajam estudos e especulações adicionais sobre o papel biológico desses genes nos CEC orais.

BAUER et al. (2008) sugeriram, também por CGH-arrays, que ganhos em 1q43 e 16q23-24, assim como a perda em 18q22 são regiões genômicas que podem conter marcadores prognósticos nos CCECP. Segundo os autores, estas alterações podem explicar o desvio da evolução clínica em um subgrupo específico de pacientes, apresentando uma associação estatisticamente significativa com a sobrevida livre de progressão loco regional (do inglês, *locoregional progression-free survival, LPFS*).

FREIER et al. (2010) analisaram 40 amostras de carcinomas orais por CGH-array e relataram ganhos em 1q23 (9 casos), 3q26 (11), 5p15 (13), 7p11 (7), 8q24 (17), 11q13 (15), 14q32 (8), 19p13 (8), 19q12 (7), 19q13 (8) e 20q13 (9). Na região de sobreposição mínima, foi encontrado alto nível de amplificação em: 3q26.33 (1 caso), 5p15.33 (2), 7p11.2 (2), 8q24 (1), 11q13.3 (9), 19p13.3 (1) e 19q12 (2). Em algumas regiões genômicas pequenas, definidas por não mais que três clones consecutivos, foram

encontrados ganhos em 1p36.13 (12 casos), 7p21.3 (9), 7q22.1 (8), 10q26 (8) e 22q13.2 (14). Perdas genômicas envolvendo grandes regiões foram detectadas em 3p21-3p12 (15 casos), 8p32 (11), 10p12 (8) e 18q21-q23 (10). Em regiões genômicas pequenas foram encontradas perdas em 1p21.1 (17 casos), 1q21.1 (13) e 11q22.1 (20). BOCKMÜHL et al. (2000) já haviam mostrado, também pela CGH-array, que ganhos em 3q21-q29 estavam associados com a diminuição da sobrevida global e livre de doença, em CCECP.

CHA et al. (2011) avaliaram amostras de CEC orais, áreas de displasia oral adjacentes e margens cirúrgicas normais de sete pacientes, por CGH-array (plataforma Agilent 44K), e relataram regiões com ampliações em 7/7 carcinomas orais envolvendo os genes *FAM5B*, *TIPARP*, *PIK3CA*, *NLGN1*, *FGF10*, *HDAC9*, *GRM3*, *DDEF1*, *EDNRB*, *CHRD1*, e *HTR2C*, e deleções em *THRAP3*, *CTTNBP2NL*, *GATAD2B*, *REL*, *CKAP2L*, *RHOA*, *EIF4E3*, *PDLIM5*, *FBXO3*, *NEUROD4*, e *ABCA5*. Nas displasias, foi detectado ganho em 7/7 amostras para o gene *RNF36* e deleção em *CKAP2L* e *TCF8*. Essas alterações foram validadas por MLPA (do inglês, *multiplex ligation-dependent probe amplification*). Os achados indicaram que as CNVs detectadas nos três subtipos testados (normal, displasia e CEC oral) podem estar associadas com a gênese e a progressão tumoral.

Recentemente, AMBATIPUDI et al. (2011) investigaram 60 tumores de língua e gengiva por CGH-array. As alterações mais prevalentes foram ganhos em 3q (60%), 5p (50%), 7p (50%), 8q (73%), 11q13 (47%), 14q11.2

(47%), e 19p13.3 (58%) e perdas em 3p14.2 (55%) e 8p (83%). A análise univariada revelou que ganhos em 11q22.1-q22.2 e perdas em 17p13.3 e 11q23-q25 estavam associadas a recorrência loco regional e menor sobrevida, respectivamente. Os achados foram confirmados por FISH em núcleos interfásicos. O estudo demonstrou potenciais marcadores prognósticos em carcinomas orais.

1.4 ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NO CCECP

Aproximadamente metade dos genes humanos apresentam trechos de pares CG nos promotores, conhecidos como “ilhas CpG” (BAYLIN e HERMAN 2000). Recentemente, as alterações epigenéticas que ocorrem constitutivamente e conferem um fenótipo similar àquele observado pelas mutações genéticas foram nomeadas de “epimutações constitutivas”. Esses erros epigenéticos são caracterizados pela metilação do promotor gênico e pelo silenciamento transcricional de um único alelo do gene em tecidos somáticos normais, na ausência de mutações no locus afetado (HITCHINS 2010).

A metilação pode afetar vários processos celulares como o *checkpoint* do ciclo celular, a apoptose, a transdução de sinal, a adesão celular e a angiogênese. A metilação também afeta a expressão de genes envolvidos na manutenção da integridade do genoma, como os responsáveis pelo reparo a danos no DNA e pela detoxificação das espécies reativas de oxigênio. Além da hipermetilação da região promotora dos genes, a

hipometilação global também é uma característica comum aos tumores (TOYOTA e SUZUKI 2010).

A hipermetilação de vários genes (*TP16/INK4A*, *TP15/INK4B*, *TP14/ARF*, *DCC*, *DAP kinase*, *MINT1*, *MINT2*, *MINT27* e *MINT31*) foi relatada em carcinomas esporádicos de células escamosas orais (CCEO) (OGI et al. 2002; HA e CALIFANO 2006). CZERNINSKI et al. (2009) detectaram hipermetilação do promotor de *hMLH1* e *hMSH2* em 50% dos casos (14/28) avaliados, sendo que a hipermetilação do promotor de *hMSH2* estava presente em 36% dos casos e a de *hMLH1* em 17% dos casos (um caso apresentou hipermetilação em ambos os genes). Outros estudos demonstraram a hipermetilação do gene *hMLH1* em 0-47% dos CCECP e de *hMSH2* em 0-30% de CCECP (OGI et al. 2002; LIU et al. 2003; VISWANATHAN et al. 2003; PURI et al. 2005; SENGUPTA et al. 2007; TAWFIK et al. 2011).

Embora 65% do genoma sejam transcritos, os transcritos que codificam proteínas são derivados de menos de 2% do genoma humano (CARNINCI et al. 2005). Na categoria dessas sequências transcritas, mas não codificadoras, estão os microRNAs (miRNAs), que atuam na regulação de processos celulares fundamentais (CLAVERIE 2005; ECKSTEIN 2005; MATTICK e MAKUNIN 2005).

Os miRNAs são uma família de pequenos RNAs não codificantes de 21 a 25 nucleotídeos que regulam negativamente a expressão gênica em nível pós-transcricional (AMBROS 2003; LAI 2003; BARTEL 2009). A biogênese dos miRNAs envolve um sistema complexo que inclui membros

da família Argonauta, a transcrição dependente da polimerase II e as RNases III, Drosha e Dicer (KIM e NAM 2006).

As isoformas de miRNA podem ser de dois tipos. O primeiro tipo apresenta-se quando os RNAs maduros têm sequências aproximadamente idênticas, geralmente diferindo em 1–3 nucleotídeos. Estas famílias são designadas com uma letra (por exemplo, *let-7a* e *let-7b*). A segunda designação é dada aos genes precursores de miRNAs minimamente diferentes que produzem miRNAs maduros idênticos (por exemplo, *let-7a-1* e *let-7a-2*). Estes são designados com um número, implicando que ambos os genes produzem microRNAs maduros idênticos (*let-7a*) (JIANG et al. 2005).

O primeiro membro da família de miRNA, *lin-4*, foi identificado em *C.elegans* a partir de um teste genético para defeitos no controle temporal do desenvolvimento pós-embrionário (CHALFIE et al. 1981; AMBROS 1989). Em 2000, quase sete anos após a descoberta do *lin-4*, um segundo miRNA, o *let-7*, também foi descrito em estudos com vermes. O *let-7* codifica um RNA pequeno de 21 nucleotídeos que controla a transição do estágio larval L4 para o estágio adulto no desenvolvimento do *C. elegans* (REINHART et al. 2000; LIN et al. 2003; ABRAHANTE et al. 2003).

Até a presente data, há aproximadamente 18.226 entradas no registro de miRNA do Sanger Center (*miRBase sequence database*-<http://www.mirbase.org>) sendo 1527 registros de precursores de miRNAs e 1921 registros de miRNAs maduros para o genoma humano.

Com a descoberta de milhares de genes que produzem transcritos de

RNA não codificadores, tornou-se evidente que a complexidade do câncer é maior do que se esperava (CALIN e CROCE 2006a). Nesse contexto, os miRNAs parecem contribuir para a oncogênese, podendo funcionar como supressores de tumor (como no caso do *miR-15* e do *miR-16-1*) ou como oncogenes (como no caso do *miR-155* e do *cluster miR-17-92*). As alterações que influenciam a atividade dos miRNAs são as mesmas descritas para os genes codificadores de proteínas, tais quais rearranjos cromossômicos, ampliações e deleções genômicas e mutações. Em um tumor específico, podem ser identificadas ambas as alterações em genes codificadores e em miRNAs (CALIN e CROCE 2006b). O mecanismo principal que altera a função dos miRNA em células cancerosas parece ser a expressão gênica aberrante, caracterizada por níveis anormais da expressão de miRNA precursores e maduros quando comparados ao encontrados em tecidos normais correspondentes (CALIN e CROCE 2006a).

Devido ao modo particular pelo qual agem os miRNAs – tendo importantes genes codificadores de proteínas como alvo – CALIN e CROCE (2006a) propuseram que as variações na expressão ou na sequência dos miRNAs, se herdadas pela linhagem germinativa, podem ser importantes na predisposição ao câncer por afetar os níveis de expressão de genes supressores de tumor ou oncogenes. Uma proporção significativa de pacientes com câncer são membros de famílias que desenvolvem o mesmo tipo de câncer sem haver uma herança Mendeliana específica, ou que desenvolvem diferentes tipos de tumor. Este tipo de predisposição familiar representa um importante problema clínico e a identificação de genes de

predisposição pode oferecer um diagnóstico precoce, além da prevenção do câncer.

Em um estudo caso-controle (484 casos e 555 controles), CHRISTENSEN et al. (2010) relataram que portadores de uma variante alélica (rs11614913, C/T) no miR-196A2 têm uma significativa redução no risco de desenvolvimentos de CCECP. Essa associação foi vista em sítios tumorais individuais, mas apresentou significância estatística apenas entre os casos de câncer de faringe (OR, 0,6; IC95%; 0,4-0,96). Em uma análise conjunta, portadores homozigotos do polimorfismo e com câncer de faringe tiveram uma menor sobrevida quando comparados com os indivíduos heterozigotos ou com genótipo do tipo selvagem (*hazard ratio*: 7,4; IC 95%; 1,9-28,2).

A heterozigose do SNP G/C (rs2910164) no pre-miR-146A mostrou ser um fator de predisposição para o câncer papilífero de tireoide. Os heterozigotos diferem dos homozigotos pela produção de três tipos de miRNAs maduros (um da fita ativa e outros dois da fita inativa) que se correlacionam com diferentes perfis transcricionais, o que pode explicar as diferenças na suscetibilidade ao câncer de tireoide (JAZDZEWSKI et al. 2009).

Vários miRNAs da família *let-7* têm sido mapeados em regiões deletadas em cânceres humanos (CALIN et al. 2004; TAKAMIZAWA et al. 2004; JOHNSON et al. 2005). LU et al. (2007) demonstraram que o gene *let-7a-3* é metilado e que a sua metilação pode afetar a expressão de *IGF-II* (*insulin like growth factor II*) e a sobrevida em pacientes com câncer de

ovário. BRUECKNER et al. (2007) relataram que a metilação do *let-7a-3* é prevalente em tecidos humanos normais, mas pode estar ausente em câncer de pulmão. Em células derivadas de câncer de cólon, a ativação epigenética do locus do *let-7a-3* resultou em aumento da expressão de microRNA e em alterações oncogênicas nos perfis de transcrição. Esse estudo demonstrou ainda atividade consistente do miRNA *let-7a-3* como oncogene, enquanto outros estudos descrevem atividades supressoras tumorais para outros miRNAs *let-7* (CALIN et al. 2004; TAKAMIZAWA et al. 2004; JOHNSON et al. 2005).

Reforçando o papel do *let-7* como supressor de tumor, SCHULTZ et al. (2008) relataram que os membros da família *let-7* apresentaram expressão diminuída em melanomas primários quando comparados aos nevos benignos. ZHANG et al. (2007) relataram perdas no número de cópias para os miRNAs *let-7a* e *let-7b* em uma série de 40 linhagens celulares de melanoma avaliadas para alterações em loci genômicos de miRNAs. A expressão aumentada de *let-7b* em células de melanomas *in vitro* diminuiu a expressão das ciclinas (D1, D3 e A) e da quinase dependente de ciclina 4 (Cdk4), todas descritas como atuantes no desenvolvimento de melanomas (MILLER e MIHN 2006). O *let-7b* (22q13.31) inibiu a progressão e o crescimento independente de ancoragem das células de melanoma. Esses achados não apenas apontam para novos mecanismos reguladores do desenvolvimento precoce dos melanomas, mas também tornam possível o desenvolvimento de terapias futuras para este tumor.

1.5 EVIDÊNCIAS DA PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CCECP

O papel dos fatores hereditários em cânceres de cabeça e pescoço foi inicialmente sugerido a partir de relatos clínicos de casos de pacientes com história familiar de câncer (TASHIRO et al. 1986; HARA et al. 1988). Subsequentemente, estudos caso-controle apoiaram esta associação inicial. Vários relatos demonstraram uma proporção significativa de cânceres em famílias de pacientes com CCECP, apresentando um risco aumentado de desenvolvimento destes tumores quando comparados a famílias-controle sem história de câncer.

GOLDSTEIN et al. (1994) observaram que o risco para indivíduos com história positiva de câncer na família era de 1,4 para câncer oral e de 2,3 para carcinoma da faringe entre pais e irmãos. COPPER et al. (1995) estimaram o risco relativo para CCECP de 3,5 em associação com câncer de cabeça e pescoço ou pulmão entre os parentes de primeiro grau de pacientes com CCECP. Entretanto, este risco elevou-se para 14,6 quando foi considerada somente a irmandade. De forma semelhante, FOULKES et al. (1995) demonstraram uma forte associação entre o risco aumentado de câncer de cabeça e pescoço entre parentes de pacientes com este tipo de câncer: 1,97 entre parentes de primeiro grau com qualquer tipo de câncer, aumentando para 3,65 (95% CI, 1.97-6.76) se o parente também apresentasse câncer de cabeça e pescoço. Neste estudo, riscos significativamente maiores foram associados principalmente com a presença

de irmãos (RR= 8.57) e pais (RR= 2.49) com CCECP. Acredita-se que os fatores ambientais compartilhados entre indivíduos de uma mesma família não seriam suficientes para explicar estes dados, pois há diferenças claras entre o risco apresentado entre irmãos e os outros parentes de primeiro grau. Devido aos fatores genéticos herdados, irmãos apresentam um alto risco para o desenvolvimento de neoplasias (YU et al. 1999).

JEFFERIES et al. (2001) avaliaram mutações na linhagem germinativa do gene *TP16* em 40 pacientes que desenvolveram CCECP e posteriormente, um segundo tumor primário. A ausência de mutações no gene *TP16* levou à conclusão de que este gene não possui um papel preponderante na predisposição ao CCECP. Posteriormente, LANGE et al. (2002) detectaram um caso com mutação na linhagem germinativa no gene *TP16*. YU et al. (2002) identificaram uma família com alta incidência de CCECP e melanoma associado com uma mutação na linhagem germinativa no éxon 2 do *TP16*. Os autores sugeriram que, nesta família, houve uma relação causal entre a mutação e a presença dos CCECP e que, portanto, o CCECP familiar deveria ser incluído como uma nova entidade dentro do conjunto de cânceres hereditários relacionados às mutações no gene *CDKN2A*.

Mutações germinativas em *CDKN2A* são relatadas em várias síndromes de cânceres humanos, incluindo a síndrome de melanoma múltiplo atípico familiar (FAMMM), a síndrome de câncer pancreático-FAMMM (FAMMM-PC) e a possível síndrome de câncer de cabeça e pescoço (YARBROUGH 2002; LYNCH et al. 2002; CZAJKOWSKI et al.

2004; CABANILLAS et al. 2011). Para a FAMMM, as mutações em *CDKN2A* foram relatadas em menos de 10 famílias com um agrupamento de CCECP. VINARSKY et al. (2009) relataram o caso de um indivíduo com história familiar de câncer pancreático e melanoma, que apresentou nevos displásicos múltiplos, carcinoma de células escamosas da língua aos 22 anos de idade, múltiplos melanomas, um segundo câncer de células escamosas de língua aos 40 anos, e por último um câncer pancreático. O grupo relatou uma mutação germinativa no gene *CDKN2A* e LOH neste loco em tecidos de CCECP, sugerindo que esta mutação germinativa em pacientes jovens com história familiar pode predizer o aparecimento de outros cânceres, incluindo câncer de cabeça e pescoço, melanomas e cânceres pancreáticos.

CABANILLAS et al. (2011) avaliaram a história familiar de um paciente e mostraram uma incidência aumentada e não frequente de CCECP e melanomas. O probando apresentou uma mutação germinativa c.106delG (p.Ala36ArgfsX17) em *CDKN2A* afetando a ORF (do inglês, *open read frame*) do *CDKN2A*.

GARAVELLO et al. (2008) avaliaram o risco familiar em cânceres orais e da faringe. O estudo incluiu 956 casos de carcinomas orais e da faringe e 2362 controles. Neste estudo caso-controle, a história familiar de cânceres orais e da faringe e/ou cânceres da laringe em parentes de primeiro grau foi diretamente e fortemente associada com o risco de câncer oral e da faringe, e o risco foi maior quando dois ou mais parentes eram afetados. Este risco era independente do consumo de álcool e tabaco. O

risco de câncer oral e da faringe também aumentou em pacientes com história familiar de cânceres do pulmão e melanomas da pele.

O consórcio de análise epidemiológica internacional de câncer da cabeça e pescoço (INHANCE) foi estabelecido em 2004, baseado na colaboração de grupos de pesquisa abordando estudos epidemiológico-moleculares de câncer da cabeça e pescoço que se encontram em andamento ou foram recentemente concluídos. O banco de dados INHANCE contém um grande número de casos e controles, proporcionando uma oportunidade única de investigar o papel da história familiar no risco de desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço (CCP). Usando os dados deste consórcio, NEGRI et al. (2009) investigaram a associação entre vários aspectos da história familiar de CCP e outros cânceres e o risco do CCP, também em combinação com o consumo de álcool e tabaco. Usando a versão 1.0 do INHANCE, foram incluídos nesta análise 12 estudos caso-controle com 8967 casos de CCP e 13627 controles.

História familiar de CCP em parentes de 1º grau aumenta o risco de desenvolvimento da doença (OR=1,7, IC 95%, 1,2-2,3). O risco é maior quando o parente afetado é um irmão (OR=2,2, IC 95%, 1,6-3,1) e para sítios anatômicos distais (hipofaringe e laringe). O risco também é maior, ou limítrofe, para indivíduos expostos ao tabaco. O OR aumenta para 7,2 (IC 95%, 5,5-9,5) entre indivíduos com história familiar e usuários de álcool e tabaco. Uma associação fraca, mas significativa (OR=1,1, IC 95%, 1,0-1,2), é encontrada para história familiar de outras neoplasias relacionadas ao tabaco, particularmente o câncer de laringe (OR=1,3, IC 95%, 1,1-1,5)

(NEGRI et al. 2009).

Um estudo citogenético prévio realizado por nosso grupo (BÉRGAMO et al. 2005) em 64 CCECP primários de pacientes não tratados por quimioterapia e/ou radioterapia demonstrou a presença de várias alterações numéricas envolvendo, com frequência, a monossomia total ou parcial do cromossomo 22 [del(22)(q13.1)]. As perdas em 22q13.1-qter correlacionavam-se com sobrevida diminuída e história familiar de câncer. O padrão de alterações cromossômicas observadas nesse estudo e a identificação das alterações cromossômicas mais frequentes foram consistentes com outros relatos em CCECP (MERTENS et al. 1997; SCULLY et al. 2000; GOLLIN 2001; JIN et al. 2002; MITELMAN et al. 2008). ASHMAN et al. (2003), relataram que a deleção 22q estava associada a sobrevida reduzida em pacientes com CCECP, sugerindo que esta anormalidade é um marcador prognóstico independente. Segundo o banco de dados de MITELMAN et al. (2012), o qual inclui 59.954 casos catalogados contendo cariótipos de tumores humanos, 12 casos apresentaram alterações em 22q13 [del(22)q(13)], incluindo dois carcinomas da cavidade oral, cinco de língua e cinco de laringe.

Estudos de LOH envolvendo o cromossomo 22 e CCECP são raros em literatura. MIYAKAWA et al. (1998) avaliaram 33 carcinomas orais primários, cinco amostras metastáticas e tecidos normais correspondentes e observaram uma maior frequência de LOH (11/27 casos informativos) para o marcador D22S274 (22q13.31). Um estudo recente demonstrou que LOH em 3p e em 10p12 parecem estar envolvidas na gênese e progressão dos

CCECP (KOY et al. 2008). A análise de LOH em 14q em 50 casos de CCECP revelou alta frequência de perdas em 14q31 (55%), 14q21.2-22.3 (42.5%) e 14q32.1 (37%) (PEHLIVAN et al. 2008). Estas alterações estavam significativamente associadas a uma maior sobrevida livre da doença, sugerindo a presença de genes supressores tumorais em 14q.

Em outro estudo da nossa equipe foi selecionada a região 22q11.2-13 para análise de LOH usando quatro marcadores polimórficos em 50 amostras de CCECP (POLI-FREDERICO et al. 2000). Neste estudo, 19/50 (38%) amostras informativas revelaram LOH em uma ou mais regiões em 22q: 28% (14/50 casos) mostraram perdas para o marcador D22S421, 10% (5/50 casos) para o marcador D22S277, 8% (4/50 casos) para o marcador D22S446 e de 4% (2/50 casos) para o marcador D22S280. Os tumores de laringe apresentaram uma das maiores frequências de LOH em comparação com os tumores orais.

Subsequentemente, REIS et al. (2002a) identificaram duas regiões independentes de LOH em tumores de laringe (22q11.2-12.1) e da cavidade oral (22q13.1-13.31) e relataram que os tumores orais mostraram uma região preferencial de perda em 22q13.31 para o marcador D22S274. Estes resultados foram concordantes aos dados de MIYAKAWA et al. (1998) que sugeriram a existência de um provável gene supressor tumoral em 22q13.3.

Para confirmar estes achados, REIS et al. (2002b) analisaram por PCR quantitativa em tempo real (qPCR), 40 carcinomas primários de células escamosas da cavidade oral com o objetivo de determinar o número relativo de cópias dos genes *DIA1*, *BIK*, *ECGF1* e *PDGFB* e dos marcadores

D22S277 e D22S274 mapeados em 22q13. Para todas as regiões amplificadas, 16/40 pacientes apresentaram perda da região 22q13.3, sendo que 10 casos apresentaram perda do marcador D22S274 (22q13.31). Todos os casos com perda para o marcador D22S274 apresentaram história familiar de câncer, sendo que, três casos tinham história de câncer de cólon na irmandade. Estes resultados sugeriram que a região 22q13 poderia conter um gene supressor de tumor envolvido na suscetibilidade herdada a carcinomas da cavidade oral.

Poucos estudos epidemiológicos têm discutido a influência familiar herdada como fator de risco para o CCECP (MARSH e ZORI 2002). Os fatores de risco comumente relacionados ao CCECP (álcool e tabaco, entre outros) não explicam adequadamente 5 a 10% dos casos de CCECP (KOCH et al. 1999; ZHANG et al. 2000). Esta disparidade sugere a existência de suscetibilidade genética herdada como associada ao desenvolvimento destes tumores (HARTY et al. 1997; DE ANDRADE et al. 1998; OLSHAN et al. 2000). Além disso, há evidências que reforçam a ideia da predisposição genética incluindo o risco aumentado de CCECP entre parentes de primeiro grau de pacientes portadores destes tumores, presença da doença em pacientes jovens e de pacientes com CCECP sem história de exposição a agentes carcinogênicos conhecidos (CANEVARI e ROGATTO 2004). Em adição, a presença de múltiplos tumores primários em um indivíduo é um indicador de predisposição hereditária ao câncer.

Os dados em literatura e os estudos prévios do grupo (POLI-FREDERICO et al. 2000; REIS et al. 2002a e b; BÉRGAMO et al. 2005)

sugerem a possibilidade de que as alterações herdadas observadas nos CCECP estejam associadas com alterações em um gene principal de predisposição hereditária.

1.6 O GENE *PHF21B*

Evidências relatadas em estudos prévios do grupo (POLI-FREDERICO et al. 2000; REIS et al. 2002a e b; BÉRGAMO et al. 2005) sugerem que a perda ou inativação do gene *PHF21B* (*PHD finger protein 21B*) esteja relacionado à predisposição familiar ao câncer de cabeça e pescoço.

Esse gene encontra-se mapeado em 22q13.31 e está a uma distância de 7,6 Kb do marcador D22S274. É composto por 13 éxons, totalizando 128.539 pb (UCSC *Genome Browser*, <http://genome.ucsc.edu/>, acesso em 09/03/2012), como mostrado na Figura 1. Sua região codificadora possui 1596 pb e codifica uma proteína de 531 aa, que contém um motivo *PHD* (*Plant Homeodomain*) *zinc finger* de ligação ao DNA.

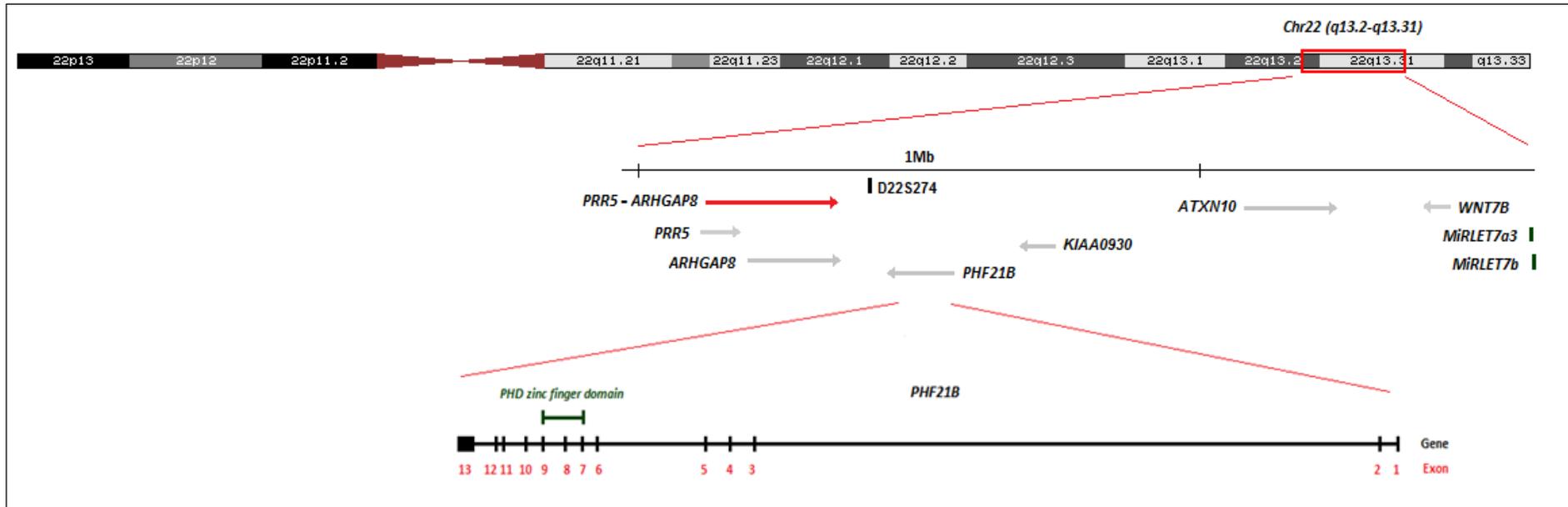


Figura 1 - Diagrama mostrando a localização e a estrutura do gene *PHF21B*, que possui 13 éxons e 128.539pb, no cromossomo 22q13.31. Além dele são mostrados os miRNAs *let-7a-3* e *let-7b*, mapeados a aproximadamente 1,1Mb do gene, e o marcador D22S274, mapeado a 7,6Kb do gene.

O domínio *PHD finger* foi descoberto há mais de uma década na proteína HAT3.1 de *Arabidopsis* (SCHINDLER et al. 1993). O motivo *zinc finger* envolve a ligação do íon zinco a quatro aminoácidos conservados, para formar uma alça, estrutura frequentemente repetida em *tandem*. A sequência de aminoácidos situada entre a hélice de reconhecimento é responsável pelo estabelecimento de contatos específicos com o DNA contribuindo para sua função da transativação ligante-dependente que orienta a atividade de transcrição (<http://www.hprd.org/protein/>) acesso em 02/05/2012).

Vários domínios PHD foram associados a proteínas contendo módulos de ligação a histona H3 metiladas nos resíduos de lisina (BIENZ 2006; MELLOR 2006; LI B et al. 2007). A proteína BHC80 foi identificada como parte de um complexo BRAF-HDAC (BHC) que possui um importante papel na repressão de genes tecido-específico, pela remoção de grupos metil de histonas H3 metiladas nos resíduos de lisina 4 (IWASE et al. 2004; LAN et al. 2007).

Inicialmente foi sugerido que o PHD *finger* interage com a cromatina, pelo fato de muitas proteínas que contém um motivo PHD *finger* se associarem à cromatina e regularem sua atividade (SCHINDLER et al. 1993; BIENZ 2006). Atualmente, acredita-se que os domínios PHD *fingers* podem interagir simultaneamente com os nucleossomos e proteínas específicas em multi-complexos, efetuando a leitura do código das histonas. Desta forma, teriam um papel fundamental na regulação epigenética da expressão gênica. Uma variedade de doenças incluindo síndromes de imunodeficiências,

cânceres e doenças neurológicas foram associadas à alteração da regulação de fatores que reconhecem a cromatina, notavelmente PHD *fingers* (BAKER et al. 2008).

Mutações ou translocações envolvendo esses genes PHD *fingers* resultam na perda da regulação de vias de sinalizações críticas, contribuindo para o desenvolvimento e progressão da doença (MUSSELMAN e KUTATELADZE 2009). Enquanto as evidências suportam um papel causal da mutação em PHD *finger* na patogênese das síndromes de imunodeficiência, em outras doenças, como o câncer, ainda precisam ser estabelecidas e melhor investigadas as relações diretas de causa-efeito (MATTHEWS et al. 2007).

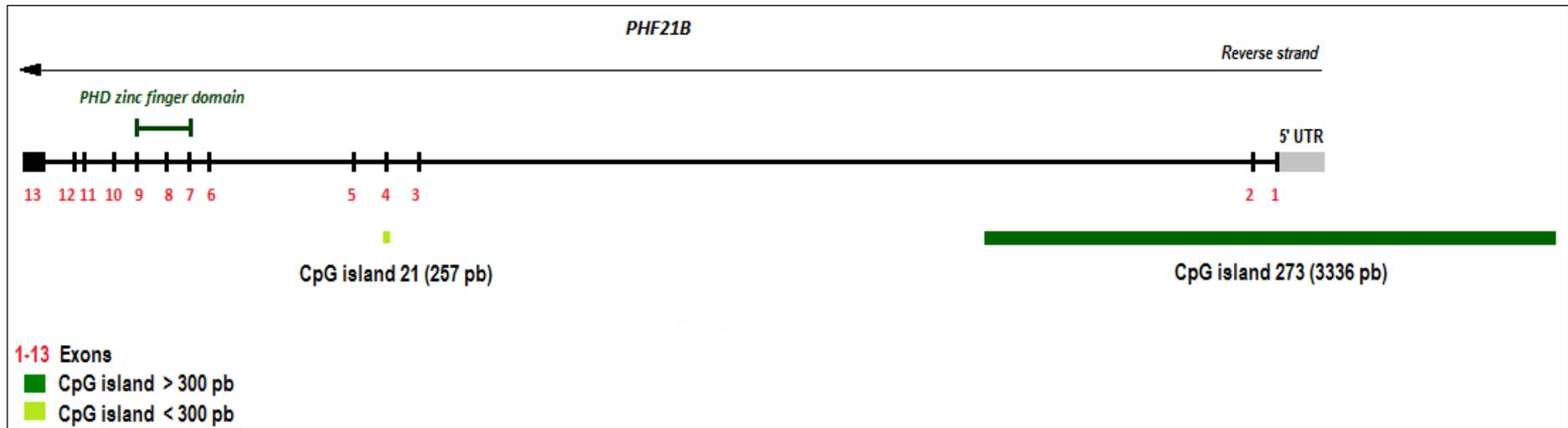
Quando dinucleotídeos CpG estão presentes em um nível significativamente maior do que aquele típico para o genoma como um todo, dizemos que a região onde se encontram é uma ilha CpG. Essas ilhas são tipicamente comuns próximas a sítios de início de transcrição e podem estar associadas a regiões promotoras. Normalmente uma base citosina (C) seguida imediatamente por uma base guanina (G) é rara no DNA de vertebrados, pois a base C nessa condição costuma ser metilada. Essa metilação ajuda na distinção da nova fita de DNA sintetizada e auxilia as etapas de correção, após a duplicação da fita de DNA. Porém, com o tempo, as citosinas metiladas tendem a se tornar timinas devido à deaminação espontânea. Assim, os dinucleotídeos CpG são relativamente raros, a menos que haja uma pressão seletiva para sua manutenção. Uma região também pode não ser metilada por alguma razão, como para a regulação da

expressão gênica (UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/>).

Os critérios aceitos para uma ilha CpG são: conteúdo de CG >50%; tamanho do fragmento maior do que 200 pb; e razão entre CpG observada/CpG esperada >0,6, com base na quantidade de citosinas e guaninas presentes no fragmento (GARDINER-GARDEN e FROMMER 1987).

O gene *PHF21B* possui uma ilha de CpG com 3336 pb (CpG 273), que se inicia na região promotora do gene e se estende pela 5'UTR, éxons 1, 2 e 2853 nucleotídeos *downstream* (Figura 2). Esse fragmento contém 273 dinucleotídeos CpG, conteúdo de C ou G de 55,4% e uma razão CpG observada/CpG esperada de 1,07, o que a qualifica como uma ilha de CpG segundo os critérios acima citados (GARDINER-GARDEN e FROMMER 1987).

Assim, é possível que um evento de silenciamento deste gene esteja relacionado à metilação de ilhas de CpG.



Fonte: Adaptado de: UCSC Genome Browser, <http://genome.ucsc.edu/>.

Figura 2 - Diagrama mostrando o gene *PHF21B* com seus 13 éxons e suas ilhas CpG de números 21 e 273. A ilha 273 engloba a região promotora do gene e os éxons 1 e 2. Além disso, os éxon 7, 8 e 9 englobam o domínio *PHD zinc finger* de ligação ao DNA.

Na mesma região onde está mapeado o gene *PHF21B* também se encontram mapeados os microRNAs (miRNAs) *hsa-let-7a-3* e *hsa-let-7b*, pertencentes à família de genes de miRNAs *let-7* (do inglês, *lethal-7*) que englobam ao menos 12 genes que codificam para 9 miRNAs distintos (*let-7a* a *let-7i*), com contribuições diversas à tumorigênese (BRUECKNER et al. 2007; TORRISANI et al. 2009). Esses miRNAs distam entre si em 864 pb e em 1.102.820 pb (*hsa-let-7a-3*) e 1.103.757 pb (*hsa-let-7b*) em relação ao gene *PHF21B*. A localização desses miRNAs pode ser observada na Figura 1.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a região 22q13.31 e, mais especificamente, o gene *PHF21B* e os miRNAs *hsa-let-7a-3* e *hsa-let-7b*, em amostras de CCECP esporádicos e em casos familiares com o objetivo de caracterizar um possível supressor tumoral associado à predisposição destes tumores.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as perdas no gene *PHF21B* em amostras de DNA provenientes de linfócitos de sangue periférico e tumores de pacientes com CCECP esporádicos ou de casos familiares por qPCR;
- Investigar a presença de mutações ou alterações na sequência do gene *PHF21B* por sequenciamento direto nos éxons 3, 6, 7, 8, 9 e 11;
- Analisar o perfil de metilação do promotor do gene *PHF21B*;
- Caracterizar o perfil de expressão dos miRNAs *hsa-let-7a-3* e *hsa-let-7b*, mapeados próximos ao gene *PHF21B*, nas amostras de CCECP obtidos de pacientes com história familiar de câncer;
- Avaliar alterações no número de cópias genômicas no DNA do sangue periférico e dos CCECP em casos com história familiar de câncer.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço sem tratamento quimio e/ou radioterápico prévios são provenientes do Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP. Os controles biológicos foram obtidos de indivíduos saudáveis sem história familiar de câncer em 1º grau. Todas as amostras foram coletadas após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), o qual se encontra nos arquivos do referido hospital. Os registros médicos de todos os pacientes foram examinados para a obtenção de informações clínicas e histopatológicas. A classificação histopatológica seguiu as recomendações da *WHO International Classification of Diseases for Oncology* (LOUIS et al. 2007) e o estadiamento clínico foi determinado pelo sistema TNM, que baseia-se na extensão do tumor (T), envolvimento linfonodal (N) e presença de metástase à distância (M) (EDGE et al. 2009). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do referido hospital (CEP 792/2006B) (Anexo 2).

Imediatamente após a coleta, todos os fragmentos tumorais foram transferidos para nitrogênio líquido e mantidos a -70°C até o momento da extração dos ácidos nucleicos. Para os 52 casos em que foram coletadas amostras de sangue periférico, a papa leucocitária foi separada e também mantida a -70°C até o momento da extração de ácidos nucleicos. As

amostras dos pacientes deste estudo encontram-se no banco de tumores do NeoGene Laboratório e do Biobanco do Hospital A.C. Camargo, São Paulo.

Também foram utilizadas linhagens celulares provenientes de carcinomas de CCECP. A descrição de todas as linhagens é apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição de todas as linhagens celulares de CCECP utilizadas no presente estudo.

Código ATCC	Descrição da linhagem
CRL-1624	SCC-4, língua, carcinoma de células escamosas
CRL-1629	SCC-9, língua, carcinoma de células escamosas
CRL-1623	SCC-15, língua, carcinoma de células escamosas
HTB-43	FaDu, faringe, carcinoma de células escamosas
HTB-41	A-253, carcinoma epidermóide de glândula salivar submaxilar
CCL- 138	Detroit 562, faringe, carcinoma (derivado de metástase)

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES

Foram incluídos neste estudo 102 amostras de pacientes com CCECP, entretanto, nem todos os casos foram analisados pelas diferentes metodologias. Estes casos foram selecionados de um grande número de pacientes tratados no período de 20 anos (1991 a 2011) junto ao Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital AC Camargo, SP, principalmente aqueles com história de câncer na família. Os tumores apresentados foram agrupados em quatro diferentes localizações: cavidade oral (mucosa bucal, triângulo retromolar, alvéolo, palato duro, 2/3 anteriores da língua, soalho de boca, mucosa do lábio e região jugal); orofaringe (base

20	343	-	●	-	-	-	●	-	-	-	-
21	349	-	●	●	●	●	●	-	-	-	-
22	398	●	●	●	●	●	●	-	-	-	-
23	547	●	●	-	-	-	-	-	-	-	-
24	564	●	●	-	-	●	●	-	-	-	-
25	565	●	●	-	-	●	●	-	-	-	-
26	578	●	●	-	-	●	●	-	-	-	-
27	581	●	●	●	●	●	●	-	-	-	-
28	586	●	●	●	●	●	●	-	-	-	-
29	588	●	●	●	●	●	●	-	-	-	-
30	600	●	●	●	●	●	●	-	-	-	-
31	BT 881	-	●	-	-	-	-	-	-	-	-
32	BT1215	-	●	-	-	-	-	-	-	-	-
33	BT1287	●	●	●	●	●	●	-	-	-	-
34	BT1426	●	●	●	●	●	●	-	-	-	-
35	BT878	●	●	-	-	-	●	-	-	-	-
36	27.1	●	●	-	-	●	●	●	●	-	-
37	58.1	-	●	-	-	●	●	●	●	●	●
38	61.1	●	●	-	-	●	●	●	●	-	●
39	74	-	●	-	-	-	-	-	-	-	-
40	92	●	●	-	-	-	-	-	-	-	-
41	114	●	●	●	●	●	●	-	-	-	-
42	168	●	●	●	●	●	●	●	●	-	-
43	169	-	●	-	-	-	-	-	-	-	-
44	328	-	●	-	-	-	-	-	-	-	-
45	334	-	●	-	-	-	-	-	-	-	-
46	338	-	●	-	-	-	●	-	-	-	-
47	348	-	●	●	●	●	●	-	-	-	-
48	576	●	●	-	-	-	-	-	-	-	-
49	584	●	●	-	-	-	-	-	-	-	-
50	BT1475	●	●	●	●	●	●	-	-	-	-

82	51.1	-	-	-	-	-	-	-	●	●	●	●
83	54.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●
84	59.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●
85	60.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●
86	73.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	-
87	100.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●
88	103.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●
89	66	-	-	●	●	-	-	●	●	-	-	-
90	436	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
91	8.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●
92	15.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●
93	43.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●
94	84.1	-	-	-	-	-	-	●	●	●	●	-
95	11.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●
96	13.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●
97	65.1	-	-	-	-	-	-	●	●	-	●	●
98	1.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●
99	28.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●
100	70.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●
101	71.1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	●	●
102	583	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- teste não realizado - Sg: amostra de sangue periférico; T; amostra tumoral.

Sessenta e seis dos 102 pacientes (64,7%) apresentavam história positiva de câncer na família, que incluíam CCECP além de cânceres de estômago, esôfago, mama, cólon, pulmão, pâncreas, entre outros. Cinquenta e um dos 102 pacientes apresentavam história de câncer em parentes de 1º grau (50%). A idade dos pacientes variou de 28 a 90 anos, apresentando mediana de 58 anos, média de 57,5 (desvio-padrão de 12,5

anos). O sexo masculino foi o preferencialmente afetado numa razão de 3,6 homens para 1 mulher. Os dados clínicos dos casos incluídos no estudo estão resumidos na Tabela 4 e detalhados no Anexo 3.

Sessenta e quatro pacientes foram genotipados para o HPV (papilomavírus humano) utilizando-se o *Linear Array HPV Genotyping Test* kit (Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, NJ, USA). Este kit permite a identificação de 37 tipos de HPV (6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 58, 59, 61, 62, 64, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73 (MM9), 81, 82 (MM4), 83 (MM7), 84 (MM8), IS39 e CP6108), incluindo os 13 genótipos de alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 e 68). Cinco dos 64 pacientes (7,8%) apresentaram infecção pelo HPV16, quatro carcinomas de orofaringe (casos 348, BT1475, 67.1 e 72.1) e um de cavidade oral (caso 349). Três dos cinco pacientes (60%) não apresentavam história familiar de câncer (casos 349, 348 e BT1475), sendo que dois destes três pacientes também não fumavam ou consumiam álcool (casos 348 e BT1475). O caso 349 apresentava hábitos etilista e tabagista.

Tabela 4 - Dados clínicos dos 102 pacientes com CCECP incluídos no estudo.

Características		Nº casos	%
Idade	≤ 45 anos	18	17,6
	> 45 anos	84	82,4
Gênero	Masculino	80	78,4
	Feminino	22	21,6
Localização	Cavidade Oral	53	52,0
	Orofaringe	20	19,6
	Hipofaringe	11	10,8
	Laringe	18	17,6
Tabaco	Sim	57	55,9
	Não	18	17,6
	Nd	27	26,5
Álcool	Sim	59	57,8
	Não	15	14,7
	Nd	28	27,5
Álcool + Tabaco	Sim	51	50,0
	Não	24	23,5
	Nd	27	26,5
Estádio T	T1+T2	37	36,3
	T3+T4	63	61,8
	Nd	2	2,0
Estádio N	N0	52	51,0
	N+	49	48,0
	Nd	1	1,0
História Familiar	1º grau	51	50,0
	Não	34	33,3
	Nd	17	16,7
Evolução Clínica	Morto (pela doença ou não)	46	45,1
	Vivo	40	39,2
	Perda de seguimento	16	15,7

Nd: Informação não disponível

Na tentativa de se estabelecer critérios para a identificação de pacientes pertencentes a famílias com alto risco de desenvolvimento de cânceres, associado a predisposição ao CCECP, este estudo adotou os seguintes requisitos para a inclusão dos pacientes, utilizando como modelo os critérios já adotados em literatura para a síndrome de Lynch (*Amsterdam*

I - VASEN et al. 1991; *Amsterdam II* - VASEN et al. 1999 e *Bethesda* - RODRIGUEZ-BIGAS et al. 1997; UMAR et al. 2004):

- Pelo menos um parente em primeiro grau com câncer de cabeça e pescoço (CCP) e/ou outro câncer associado (câncer mama, pulmão, esôfago, estômago, pâncreas, cólon ou útero) como descrito por NEGRI et al. (2009);
- Idade de aparecimento do câncer inferior a 45 anos, em pelo menos um dos afetados da família, incluindo o probando;
- Qualquer idade de aparecimento quando o afetado por CCP (probando) não apresentar exposição ao tabaco, álcool ou outro fator etiológico bem conhecido.

Entre os 102 pacientes, 70 preenchem pelo menos um dos critérios e nove preenchem pelo menos dois dos critérios adotados.

Os critérios de exclusão de história familiar seriam:

- Pacientes com história positiva de tumores, mas oriundos de regiões geográficas afetadas por radiação;
- História de câncer de pulmão em tabagistas de longo período (>10 anos);
- Tumores de cabeça e pescoço em tabagistas de longo período (>10 anos).

3.3 METODOLOGIAS

O isolamento de DNA de leucócitos do sangue periférico e dos tecidos tumorais foi realizado após a digestão da amostra com proteinase K a 20 mg/uL em uma solução detergente (de duodecil sulfato de sódio) para remoção das proteínas ligadas ao DNA. Posteriormente, as amostras foram tratadas com solventes orgânicos (fenol/clorofórmio). A precipitação foi realizada com etanol 100% (2 repetições). Após obtenção do sedimento, o DNA foi ressuspendido em 25 uL de água ultra pura estéril e a amostra foi quantificada em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) e armazenada a -20°C.

Para o isolamento de RNA total de tecido foi utilizado o *RNeasy*[®] mini kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), conforme as recomendações do fabricante. Para a extração de RNA total e miRNA de sangue periférico foi utilizado o PAXgene Blood miRNA kit (PreAnalytix GmbH, Hombrechtikon, Switzerland). O RNA total foi ressuspendido em 30 µL de tampão de eluição e acondicionado a -80° C.

O RNA de cada amostra foi tratado com DNase I (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) antes da fase de síntese de cDNA. O tratamento foi feito com 2 ug de RNA em um volume final de reação de 10 µL, contendo 1x DNase I *reaction buffer* e 1 U da enzima DNase I. Após 15 minutos a temperatura ambiente, 2,5 mM de EDTA foi adicionado à reação para inativação da enzima. O RNA foi então incubado a 65°C por 10 minutos para finalização do tratamento.

Para a síntese do cDNA utilizou-se o *High Capacity cDNA Reverse Transcription* kit (Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA). A reação foi realizada com 2 µg de RNA (após tratamento com DNase I) em um volume final de 20 µL, contendo 1X RT *buffer*, 4 mM de dNTPs, 1x RT *random primers*, 50 unidades (U) de *MultiScribe Reverse Transcriptase* e 20 U de RNase Inhibitor no termociclador PTC-200 (MJ Research, Massachusetts, MA, USA). As condições da reação foram: uma etapa de 25°C durante 10 minutos, seguida de 2 horas a 37°C e 5 minutos a 85°C.

Para a síntese de cDNA de miRNAs específicos utilizou-se o *miRNA Reverse Transcription* kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A reação foi conduzida com 2 ng/µL de RNA em um volume final de 12 µL, contendo 1,25x RT *buffer*, 1,25 mM dNTPs, 3,8 U de RNase *Inhibitor* e 50 U da enzima *MultiScribe Reverse Transcriptase*. Essa reação foi realizada em termociclador PTC-200 (MJ Research, Massachusetts, MA, USA) sob as seguintes condições: uma etapa de 16°C por 30 minutos, uma etapa de 42°C por 30 minutos e uma última etapa de 85°C por 5 minutos. Os produtos obtidos foram utilizados diretamente na reação em cadeia da polimerase (PCR) ou conservados a -20°C.

3.3.1 PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A quantificação relativa das amostras de DNA para o gene *PHF21B* foi realizada no termociclador automático ABI Prism 7500 *Sequence Detection System* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Para a detecção da fluorescência foi utilizado o corante *Power*[®]

SYBR[®] *Green* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), que apresenta alta especificidade de ligação à dupla fita de DNA.

As amplificações pela qPCR foram realizadas em 75 CCECP e em 49 amostras de sangue periférico de pacientes com CCECP, pareadas com os respectivos tumores (amostra de sangue e tumor do mesmo indivíduo), com 25ng de DNA para um volume final de 12,5 µL, contendo 5 µL de *Power[®] SYBR[®] Green master mix* e 400mM de cada um dos iniciadores. As condições de ciclagem foram: 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C a 1 minuto.

Para uma maior precisão, as placas foram pipetadas no pipetador automático QiAgility (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) e todas as amostras foram feitas em duplicatas. Foram repetidos os casos em que a diferença entre as réplicas foi maior que 0,5 Cq (do inglês, *cycle quantification value*).

O *software Primer Express* (versão 2.0) (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foi utilizado para o desenho dos iniciadores, no éxon 13. O gene *GAPDH* (gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase) foi escolhido como endógeno (referência) para a avaliação de alterações do número de cópias do gene *PHF21B*. A Tabela 5 mostra as sequências dos iniciadores utilizados. Para cada um dos iniciadores (*GAPDH* e *PHF21B*) foi realizada uma curva-padrão com diluição seriada 1:4, partindo de 100ng até 0,39ng. As curvas foram construídas para se garantir uma eficiência ótima de amplificação (90% a 110%).

Tabela 5 - Descrição dos genes e das sequências dos iniciadores utilizados para avaliação das amostras de DNA.

Gene	Localização	Sequência (5'-3')	Tamanho (pb)
<i>PHF21B</i> (DNA)	22q13.31	F: aaagacactgtcggagggtgagc	151
		R: aaacgccatcaacggcaaact	
<i>GAPDH</i> (DNA)	12p13	F: gcaaccgggaaggaaatga	67
		R: caggagcgcagggttagtca	

As linhagens celulares KG-1a (#CCL 246-1), derivada de leucemia mielóide crônica, contendo a monossomia do cromossomo 22 e Hs578T (#HTB 126), derivada de câncer de mama humano, contendo a trissomia do cromossomo 22 (*American Type Culture Collection* - ATCC- Rockville, MD, USA) foram utilizadas para a determinação do intervalo de perdas ou ganhos cromossômicos. As linhagens celulares foram cultivadas de acordo com as recomendações do ATCC para a confirmação de seus cariótipos.

O número relativo de cópias foi obtido de acordo com o modelo de Pfaffl (PFAFFL 2001), baseado na razão *PHF21B/GAPDH*. Todos os valores do número relativo de cópias de *PHF21B* foram divididos pela mediana dos valores obtidos para os controles biológicos, com o objetivo de calibrar as amostras alvo pelas referências normais.

Inicialmente, as razões foram determinadas para todas as linhagens celulares e controles normais (saudáveis) após oito repetições. Estes valores não mostraram diferença estatisticamente significativa entre as amostras. O intervalo de confiança obtido para os tecidos normais (dissomia) foi calculado utilizando-se a média e o desvio-padrão do número relativo de cópias e variou de 0,78 a 1,28. Para a linhagem celular KG-1a (monossomia), o intervalo variou de 0,52 a 0,69 e para a linhagem celular Hs

578T (trissomia), o intervalo determinado variou de 1,46 a 1,73. Assim, perdas foram consideradas quando o número relativo de cópias foi $< 0,69$ e ganhos quando o número de cópias foi $> 1,46$.

3.3.2 Sequenciamento direto

A reação de sequenciamento direto foi realizada pelo método de Sanger (SANGER et al. 1977). As análises foram feitas no sequenciador automático de DNA ABI3130 (sequenciador de capilar, 4 injeções, 36cm – Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Os éxons 3, 6, 7, 8, 9 e 11 foram investigados para mutações no gene *PHF21B*, em 26 amostras normais e tumorais dos pacientes com CCECP. Dez das 26 pacientes apresentavam história familiar de câncer, sendo que 9/10 apresentavam história familiar em 1º grau. Outros pacientes também foram avaliados para alguns dos 6 éxons, mas não para todos.

Os éxons 7, 8, 9 mostraram-se importantes para essa análise por conterem o domínio *PHD zinc finger* de ligação ao DNA. Os éxons 1, 2, 4, 5, 10,12 e 13 não foram sequenciados após inúmeros testes. Estas regiões têm grande quantidade de CG dificultando a reação de sequenciamento e gerando dados não reprodutíveis.

O desenho dos iniciadores para cada um dos éxons propostos para estudo foi feito utilizando-se o *software Primer3* (<http://frodo.wi.mit.edu/>). A sequência do gene foi coletada e investigada em bancos de dados como o NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>) e UCSC Genome Browser (<http://>

genome.ucsc.edu/). Após o desenho dos iniciadores, cada sequência selecionada foi avaliada pela ferramenta BLAST ([http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/.](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)) contra a sequência do gene para confirmação de identidade e alinhamento. Para o desenho dos iniciadores também foi descartada a presença de SNPs (polimorfismos de base única) na região de anelamento. As sequências dos iniciadores utilizados para as amplificações estão indicadas na Tabela 6.

Para a amplificação pela PCR foi utilizada a enzima *Pfu Ultra™ II Fusion HS DNA Polymerase* (Stratagene, Agilent Technologies, USA) que apresenta alta fidelidade durante o processo de extensão. A reação foi feita com 100ng de DNA em um volume final de 25µL, contendo 1x *Pfu Ultra™ II reaction buffer* (já com o MgCl₂), 1 mM de dNTPs, 200 mM de cada um dos iniciadores e 0,5 µL da *Pfu Ultra™ II Fusion HS DNA Polymerase*. As condições gerais de reação foram: 95°C por 2 minutos; 30 ciclos a 95°C por 20 segundos, T°C por 20 segundos (T= temperatura de anelamento específica para cada iniciador), 72°C por 15 segundos e uma etapa de extensão final a 72°C por 3 minutos. Após a reação de amplificação, a quantidade e a qualidade dos produtos amplificados foram analisadas em gel de agarose a 1,5%, corados com SYBR Safe DNA Gel Stain (0,5 ug/ml) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) após eletroforese.

Tabela 6 - Sequências dos iniciadores utilizados no sequenciamento direto (F, iniciadores *forward*; R, iniciadores *reverse*).

Éxons	Iniciadores (5'-3')	Tamanho produto (pb)
1*	F: ggcgaggaggaaatagtc R: agagacccggaagagaggat	379
2*	F: gcggcagccacaggtaag R: agacagaccctctgggagt	383
3	F: ctgagctgctcctctgtct R: gtgctgaggggtaggaaca	214
4*	F: tgctgtctgaccacatacc R: cctcccaaatgattgctct	462
5*	F: ccctcactctccctcctc R: ctacacagcggcctcaga	386
6	F: gttgagcctctgtggta R: caacctgctgtacctggat	210
7	F: gctgagcacacagagaggct R: gggactttcctggaggct	271
8	F: cgtcaccatcgaagagagcc R: gctcctctcagccagcatc	271
9	F: cctctgacggcactaacgt R: gcaatgcccgacttgacg	271
10*	F: ggccacatgtaggtcagaca R: tgaggtgaaaagcctcc	386
11	F: cacttttcatctcccgtct R: aggatcccactttcagtgt	243
12*	F: ttctgcctctcccatttactctac R: acacatctatctgtcccctagacc	254
13*	F: tttgtagtgaggggagagg R: aacccccaggctgtgtaag	382

*Éxons não sequenciados por problemas técnicos

Os produtos da PCR foram purificados, por metodologia enzimática, pelas enzimas Exonuclease I (ExoI - que degrada DNA de fita simples e excesso de iniciadores) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP – que desfosforila os desoxinucleotídeos excedentes) (USB Corporation, Cleveland, USA). A reação de purificação foi realizada em um volume de 10 µL, contendo 8 µL do produto de PCR, 1x SAP *Dilution buffer*, 3 U da enzima ExoI e 1 U da enzima SAP. As condições foram: incubação a 37°C por 30 minutos e posterior inativação das enzimas a 80°C por 15 segundos. O produto final da purificação foi utilizado como molde para as reações de sequenciamento.

A reação de sequenciamento foi realizada com o Big Dye *Terminator* v3.1 *Cycle Sequencing Kit* em um volume de 10 µL, contendo 1 µL do Big Dye Terminator v3.1 (que contém os dideoxinucleotídeos trifosfatados marcados com fluorescência), 500 mM de um dos iniciadores e 5x BDT v3.1 *Sequencing Buffer*.

A reação de precipitação foi realizada a partir do protocolo recomendado, com EDTA 125 mM, pH 8,0, acetato de sódio 3M, pH 5,2 e etanol 100% e 70%.

Os dados do sequenciamento foram avaliados quanto a sua qualidade utilizando o *software* CLC *Main Workbench* 5.0.2 (CLCBio, Aarhus, Denmark). Foram consideradas na análise somente as sequências que apresentaram similaridade com a região gênica esperada, quando analisadas pelo BLAST.

3.3.3 Análise de metilação

- **Avaliação do padrão de metilação do promotor do gene *PHF21B* pela HRM (*High Resolution Melting*)**

Para a análise do padrão de metilação do gene *PHF21B* pela metodologia de HRM (do inglês, *High Resolution Melting*), seis linhagens celulares de carcinomas cabeça e pescoço (SCC4, SCC9, SCC15, FaDu, CCL-138 e HTB-41), 32 amostras de sangue periférico, 37 amostras de CCECP e 12 amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis sem história de câncer em 1º grau foram primeiramente submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio 2,5M (*EpiTect Bisulfite Modification kit* - Qiagen GmbH, Hilden, Germany). O tratamento com bissulfito desamina citosinas não metiladas transformando-as em uracilas. Após o tratamento é possível discriminar as citosinas que possuem um radical metil ligado ao carbono 5' das que não possuem. Assim, a informação epigenética é transformada em informação do tipo de polimorfismo de sequência (HAYATSU 2008).

O tratamento das amostras foi feito pelo *EpiTect Bisulfite Modification kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). Uma alíquota de bissulfito foi dissolvida em 800 µl de água livre de DNase e RNase com homogeneização em vórtex por aproximadamente 5 minutos. Em seguida, foram preparadas as reações de conversão contendo 1 µg de DNA em água livre de DNase e RNase em um volume final de 20 µl, 85 µL de solução de bissulfito recentemente preparada e 35 µL de *DNA Protect Buffer*. Após homogeneização, as reações foram mantidas em temperatura ambiente

para que o pH para a conversão fosse atingido (pH=5,0). Esta etapa foi monitorada visualmente pela mudança de coloração de verde para azul.

Em seguida, a reação de conversão das citosinas não metiladas em uracilas foi conduzida sob as seguintes condições: 99°C por 5 minutos, 60°C por 25 minutos, 99°C por 5 minutos, 60°C por 85 minutos, 99°C por 5 minutos e 60°C por 175 minutos. Após a completa conversão, 560 µL de Buffer BL foram adicionados às amostras, homogeneizadas em vórtex por 15 segundos e brevemente centrifugadas. Uma coluna EpiTect foi colocada em um tubo coletor para cada reação e a elas foram transferidos 700 µL da solução resultante do procedimento anterior. Centrifugou-se a coluna durante 1 minuto a 14000 rpm e o líquido filtrado foi descartado. Adicionou-se 500 µL de *Buffer BW (wash buffer)*, centrifugou-se por 1 minuto e descartou-se o líquido filtrado. Em seguida, 500 µL de *Buffer BD (desulfonation buffer)* foram adicionados na coluna que foi incubada em temperatura ambiente durante 15 minutos, centrifugada por 1 minuto a 14000 rpm e descartado o filtrado. Novamente foram adicionados 500 µL de *Buffer BW* à coluna que foi novamente centrifugada por 1 minuto a 14000 rpm e descartado o filtrado. Essa etapa foi repetida mais uma vez. A coluna foi transferida para um novo tubo coletor e centrifugada por 1 minuto a 14000 rpm para remoção de qualquer resíduo líquido existente. Novamente foi transferida para um tubo estéril e ao centro da coluna foram adicionados 20 µL de *Buffer EB (elution buffer)*.

Para a completa eluição do DNA purificado, a coluna foi centrifugada a 12000 rpm durante 1 minuto; este procedimento foi repetido uma vez. O

DNA modificado, em volume final de 40 μ L, foi armazenado a -80°C até sua utilização.

Após a etapa de conversão foi realizada a análise de HRM propriamente dita, que explora as diferenças no perfil de dissociação do *amplicon* derivado de DNA modificado por bissulfito de sódio (WOJDACZ e DOBROVIC 2007; WOJDACZ et al. 2008). Três regiões da ilha CpG (*CpG island 273*, Figura 2) associada ao gene *PHF21B* foram amplificadas pela PCR nas linhagens celulares (tratadas ou não com 5'-aza-2-deoxicitidina), em triplicatas. O volume final da reação de 20 μ l continha 1X *MeltDoctor HRM Master Mix* (Applied Biosystems), 200nM de cada iniciador e 2 μ L do DNA tratado previamente. A cada placa foi adicionada uma curva-padrão, feita a partir de diluições seriadas do DNA 100% metilado e do DNA não metilado, com os seguintes pontos: 100% metilado, 50%, 25%, 10%, 5%, 2,5% e 0% metilado. A construção da curva foi de extrema importância para a fase posterior de análise dos resultados.

As reações de amplificação e dissociação do *amplicon* foram realizadas no *Step One Plus Real Time PCR System* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As condições de amplificação foram as seguintes: 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, seguidos por 15 segundos a 95°C , 1 minuto a 60°C , 15 segundos a 95°C com aquisição contínua de 60 a 95°C a 0.3%.

Os dados de HRM foram analisados utilizando o *High Resolution Melting Software* versão 3.0 (Applied Biosystems). Os pontos da curva são indicados como controles e servem como padrão para a comparação,

indicando a porcentagem aproximada de metilação para cada amostra de uma maneira semi-quantitativa.

3.3.4 Análise da expressão dos miRNAs hsa-let-7a-3 e hsa-let-7b por RT-qPCR

Outro subconjunto de amostras de pacientes com CCECP e história familiar, composto de 27 casos foram avaliados quanto à expressão relativa dos miRNAs *hsa-let-7a-3* e *hsa-let-7b*, pela metodologia de RT-qPCR, Entre os 27 casos havia 24 amostras pareadas (amostra de sangue e de tumor do mesmo indivíduo) e outras quatro não pareadas (uma de sangue periférico e três de tumor). Na avaliação ainda foram incluídas outras 10 amostras de sangue de indivíduos saudáveis e sem história familiar em primeiro grau, para a comparação com os resultados obtidos para cada paciente.

Esses dois miRNAs foram selecionados para a análise por estarem mapeados em 22q21.31, próximos ao gene *PHF21B* (como mostrado na figura 1). Os RNAs não codificadores *RNU48*, *RNU44*, *U47*, *RNU6B* e *hsa-miR-16* foram selecionados e testados como referência.

Em cada ensaio foi utilizado o TaqMan™ *miRNA assay* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), o qual contém os iniciadores específicos para cada miRNA e a sonda marcada com FAM (repórter), para a detecção da fluorescência. Os miRNAs foram amplificados utilizando-se 0,66 ng do cDNA específico em um volume final de reação de 12 µL, contendo 1x TaqMan™ *small RNA assay* e TaqMan™ *Universal PCR Master Mix - No AmpErase® UNG* (Applied Biosystems). Todas as placas foram pipetadas

com auxílio do pipetador automático *QiAgility* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany). As condições de ciclagem foram: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C a 1 minuto, utilizando-se o termociclador automático *Step One Plus Real Time PCR System* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A estimativa da estabilidade de expressão dos microRNAs candidatos a referência (pré-teste) e a estabilidade real de expressão do conjunto de microRNAs selecionados entre o total de amostras alvo foi realizada pelo programa GeNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>). Esse algoritmo foi desenvolvido por VANDESOMPELE et al. (2002) para determinar os genes de referência mais estáveis para um determinado grupo de amostras. A estabilidade é determinada partindo do princípio de que dois genes normalizadores (ou no caso, dois miRNAs) ideais possuem razões de expressão idênticas em todas as amostras de cDNAs a serem analisadas, independente de quaisquer condições experimentais ou tipos celulares. O GeNorm avalia a razão de expressão de cada gene (ou miRNA) normalizador em relação aos demais, sempre aos pares, permitindo a exclusão dos menos estáveis.

A cada normalizador excluído o programa automaticamente atribui um novo valor referente à estabilidade dos demais normalizadores nas amostras de cDNA. Esse processo é repetido diversas vezes até que permaneçam os genes (ou miRNAs) mais estáveis, determinando-se a combinação adequada de normalizadores a serem utilizados nas análises de expressão relativa. Recomenda-se a utilização de no mínimo três normalizadores

estáveis para a obtenção do fator de normalização confiável. Para a determinação da necessidade de se utilizar mais de três normalizadores na análise, recomenda-se fazer a inclusão sequencial de outros normalizadores e avaliar o impacto de cada inclusão no fator de normalização e o valor final do coeficiente de estabilidade de expressão (M) (BARROS FILHO 2009). A análise dos dados de expressão dos miRNAs *hsa-let-7a-3* e *hsa-let-7b* foi feita de acordo com PFAFFL (2001).

3.3.5 Análise das alterações do número de cópias genômicas pela array-CGH

Dezoito casos pareados de DNA obtido de linfócitos do sangue periférico e do tumor do mesmo paciente com CCECP, com história familiar de câncer em primeiro grau, foram selecionados e avaliados pela metodologia de *array-CGH* (aCGH). Além dos pacientes com CCECP também foi avaliada uma amostra de DNA da irmã (caso 27.2) do caso 27.1, totalizando 37 amostras (Tabela 7). O Anexo 4 contém exemplos representativos das famílias selecionadas para o estudo.

Tabela 7 - Casos de CCECP avaliados pela metodologia de aCGH.

Caso	Gênero	Idade	Sítio Tumoral	Membro da família afetado /localização do câncer
				irmã/mama, tio
2.1	M	47	Região jugal (cavidade oral)	paterno/pâncreas, avô paterno /estômago e próstata, avó paterna esôfago
14.1	M	62	Língua (cavidade oral)	irmão/ cavidade oral
26.1	M	53	Palato mole (orofaringe)	irmão/pulmão, irmã/cólon
27.1	M	56	Gengiva inferior (cavidade oral)	irmã/cólon e irmã/tireoide
51.1	F	61	Área retromolar (cavidade oral)	pai/bexiga, irmão/próstata, irmã/pâncreas
53	M	45	Seio piriforme (hipofaringe)	mãe/mama, tias maternas/mama
58.1	M	55	Lábio inferior (cavidade oral)	pai/língua
61.1	M	68	Soalho de boca (cavidade oral)	mãe/mama, filho/estômago
65.1	F	63	Seio piriforme (hipofaringe)	pai/laringe, irmã/linfoma, tia paterna/cólon
66	M	61	Língua+soalho de boca+mandíbula (cavidade oral)	irmão/sarcoma de rim
67.1	M	69	Tonsila (orofaringe)	irmão/pulmão
72.1	M	73	Base de língua (orofaringe)	irmão/esôfago
74.1	M	51	Base de língua (orofaringe)	irmão e tio materno/CCECP não identificado, mãe/pâncreas, tio materno/cólon
84.1	M	49	Orofaringe	irmão/linfoma, tia materna /mama
168	M	68	Orofaringe	pai/pâncreas, primo paterno/pulmão
207	F	74	Língua (cavidade oral)	pai/melanoma, avó paterna/cólo de útero
229	M	63	Soalho de boca+rebordo gengival (cavidade oral)	irmão/nd
339	M	61	Soalho de boca+língua+gengiva (cavidade oral)	irmão/esôfago
27.2	F	58	Intestino	irmão (caso 27.1)/cavidade oral

nd: não determinado

Os dados de variações no número de cópias foram gerados utilizando-se a plataforma *Human Genome CGH Microarray 4 x 180K* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Esta é uma plataforma de oligonucleotídeos com 60pb (Agilent Technologies) com aproximadamente 180.000 sondas que mapeiam genes bem caracterizados, particularmente envolvidos em câncer e outras sequências codificadoras e não codificadoras, presentes em bancos de dados genômicos.

A seleção e preparação da amostra de DNA genômico incluiu a avaliação da sua concentração e qualidade utilizando o sistema Nanodrop ND-1000 *Spectrophotometer* (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE). A integridade do DNA foi avaliada em gel de agarose 0,8% com 200-500ng de amostra.

As amostras com contaminação visível por RNA, após análise em gel de agarose 0,8%, foram tratadas com RNase (*MasterPure Complete DNA & RNA Purification Kit*, Epicentre Biotechnologies, Madison, WI, USA), segundo protocolo do fabricante. As amostras foram ressuspensas em água ultra pura em 20-30uL, dependendo do sedimento obtido.

Os procedimentos de marcação das amostras, hibridação e detecção foram realizados pelo protocolo de marcação enzimática (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). A quantidade de gDNA utilizada foi de 600ng em um volume máximo de 20,2uL. Aos tubos foram adicionados 3uL de cianina-3 (Cy3 - casos) e cianina-5 (Cy5 - referência). A quantificação da incorporação das cianinas, o cálculo da atividade específica (eficiência de incorporação) e o rendimento da incorporação das cianinas foram realizados

para cada uma das amostras, sendo que para aquelas marcadas com Cy-3 espera-se uma atividade específica de 25 a 40 pmol/ug de DNA e para as marcadas com Cy-5 espera-se uma atividade de 20 a 35 pmol/ug de DNA. De acordo com os valores obtidos para a eficiência de incorporação seguiu-se com a hibridação das amostras na lâmina (20rpm por 24 horas, a 65°C).

A captura das imagens foi realizada no *Microarray Scanner System* (Agilent G2565CA), utilizando-se o *Scan Control Software* 8.1. A extração dos dados foi realizada usando o *Software Feature Extraction* v10.7 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

A análise dos dados foi realizada pelo *software* Nexus 6.0 (BioDiscovery Inc., El Segundo, CA, USA), após a extração dos dados pelo *Feature Extraction* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) segundo os critérios de qualidade (QC Metrics) recomendados (Anexo 5). Os arquivos foram importados para o *software*, sob a forma de um projeto. Para tanto, foi necessária a criação de um *sample descriptor*, um documento de texto em formato específico usado para descrever as amostras, a localização dos dados de entrada e quaisquer fatores (dados clínicos) associados a cada amostra.

O *software* Nexus 6.0 é constantemente atualizado com os bancos de dados disponíveis do genoma humano, incluindo os bancos de CNVs (*Database of Genomic Variants* – DGV, <http://projects.tcag.ca/variation/>) e micro-RNAs. O algoritmo escolhido para a análise foi o *FASST2* (*Fast Adaptive States Segmentation Technique 2*), o qual utiliza o modelo HMM (*Hidden Markov Model*).

Como a marcação das amostras é realizada de maneira inversa (*flipped*) à padronizada pela Agilent, (Cy3: casos e Cy5: referência), o *sample descriptor* deve conter uma informação sobre essa inversão. Após a importação dos dados, as amostras são processadas e recebem um valor de qualidade, além de um valor da somatória de alterações encontradas. A qualidade é considerada como ótima pelo *software* Nexus quando está entre 0,15 a 0,20. Como casos de tumores também foram avaliados, além dos casos de sangue, o intervalo de qualidade considerado como ótimo foi expandido para um valor entre 0,15 e 0,30. A dispersão e a qualidade da hibridação também foram observadas para cada amostra.

O Anexo 6 mostra alguns dos valores utilizados como parâmetros para a obtenção dos dados.

A seleção de regiões para uma análise mais detalhada dos dados baseou-se na inclusão das alterações presentes em mais de 20% dos casos. Todos os genes e regiões genômicas detectadas como alteradas nestas amostras, após essa seleção, foram automaticamente comparadas com banco de dados *Database of Genomic Variants* (DGV - <http://projects.tcag.ca/variation/>) e submetidas a duas análises. Na primeira, foram consideradas todas as CNAs geradas pelo *software* Nexus 6.0. Nessa análise, foi realizada uma comparação entre as CNAs envolvidas em ganhos e perdas genômicas identificadas nos grupos de amostras de sangue periférico e amostras tumorais. Em seguida, essas alterações foram comparadas com as CNVs observadas no grupo referência, composto por 72 indivíduos saudáveis da população brasileira. Foram consideradas como

relevantes para o estudo apenas as CNVs raras, identificadas em $\leq 1\%$ da população de referência (KREPISCHI et al. 2012) e no banco de dados DGV, e as CNVs novas raras, ausentes nestes dois bancos de dados. As CNVs presentes em mais de 1% da população referência e no DGV, foram consideradas como comuns.

3.3.6 Análises estatísticas

As análises estatísticas para avaliação de uma possível associação entre dados moleculares e as características clínico-patológicas foram realizadas utilizando-se o programa SPSS *version* 17.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) para Windows. O teste de χ^2 de Pearson foi utilizado para estudar associações, de acordo com frequências, exceto quando o número de casos esperados fosse igual ou menor a cinco, utilizando-se neste caso o teste Exato de Fisher. Para a análise de variáveis expressas de forma numérica contínua, foram utilizados os testes não paramétricos (teste de Kruskal-Wallis com correção de Bonferroni para a comparação de mais de dois grupos não pareados, teste de Wilcoxon para dois grupos pareados e o teste de correlação Spearman, para correlacionar duas variáveis numéricas).

A análise dos dados de aCGH, feita pelo próprio *software* Nexus 6.0, foi realizada utilizando-se o teste exato de Fisher para a comparação entre os diferentes grupos caracterizados de acordo com dados clínico-patológicos e alterações moleculares.

Em todas as análises estatísticas a hipótese nula foi rejeitada quando o valor de P bicaudado foi $<0,05$. As representações gráficas foram feitas

pelo programa Graphpad Prism 5.0 (*GraphPad Software Inc.*, La Jolla, CA, USA).

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Os dados clínico-patológicos dos 102 casos de CCECP avaliados no presente estudo foram coletados para a realização de correlações com os achados moleculares (Anexo 3).

O grupo de pacientes estudado apresentou idade variando de 28 a 90 anos e primeiro grau completo (12,7%). História familiar em 1º grau estava presente em 50,0% dos pacientes, sendo que história familiar de câncer de cabeça e pescoço em parentes de primeiro grau correspondia a 11,8% dos casos. Outros tumores prevalentes nos familiares foram os carcinomas de mama, pulmão, intestino, estômago, esôfago, pâncreas e de colo de útero. A presença de pelo menos um dos critérios adotados para história familiar de CCECP foi detectada em 70 casos (68,6%); nove casos (8,8%) se enquadravam em pelo menos dois dos critérios.

A maioria dos tumores apresentava estágio clínico IV (41,2%) e grau histológico II (45,1%). Estavam ausentes invasão perineural, vascular sanguínea e vascular linfática em, respectivamente, 34,3%, 53,9% e 40,2% dos casos. Foram observadas margens cirúrgicas livres em 54,9% dos casos e comprometimento linfonodal em 22,5%. A maioria dos pacientes não apresentou recidiva (51,0%) e 10,8% tiveram um segundo tumor

primário. A radioterapia adjuvante foi realizada em 45,1% dos pacientes e a quimioterapia adjuvante em 14,7% dos pacientes. Alguns pacientes realizaram a biópsia e logo em seguida iniciaram os tratamentos com radioterapia e quimioterapia neoadjuvantes (6,9%, para ambos os casos).

As principais variáveis acessadas, bem como o número de casos e a frequência ou mediana em que ocorrem estão representadas no Anexo 7.

4.2 ANÁLISE DO NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *PHF21B* NO DNA TUMORAL E DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM CCECP PELA qPCR

O DNA genômico de 75 amostras de tumor dos pacientes com carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço foi avaliado pela metodologia de qPCR com o objetivo de se determinar o número relativo de cópias do gene *PHF21B*, tendo como gene endógeno o *GAPDH*. Destas 75 amostras, 68 foram previamente avaliadas pela qPCR (BERTONHA 2008).

Baseado no intervalo obtido para a dissomia (seção Material e Métodos) observou-se que 43/75 casos (57,3%) apresentaram perdas para o fragmento genômico do gene *PHF21B* analisado e 32/75 casos (42,7%) apresentaram um perfil normal de amplificação pela qPCR. Os resultados detalhados estão mostrados no Anexo 8.

Entre os 43 casos com perda para o éxon 13 do gene *PHF21B*, 36 deles apresentavam história de câncer na família, sendo que 22/36 casos (61,1%) apresentavam história de câncer em parentes de primeiro grau

($P=0,049$, Qui-quadrado de Pearson). A perda dessa região do gene *PHF21B* foi comparada ainda às demais características clínico-patológicas não tendo sido detectadas associações significativas (Tabela 8).

O DNA genômico extraído de linfócitos do sangue periférico de 49 pacientes com CCECP também foi avaliado pela metodologia de qPCR com o objetivo de se determinar o número relativo de cópias do gene *PHF21B*. Todas as amostras são pareadas com o tecido tumoral do mesmo paciente que também foram avaliados pela qPCR.

Baseado no intervalo obtido para a dissomia observou-se que cinco dos 49 pacientes (10,2%) apresentaram perdas no gene *PHF21B*, 43 casos (87,8%) apresentaram um perfil normal de amplificação para o fragmento genômico avaliado pela qPCR. Entre os cinco casos com perda, um apresentava história familiar de câncer de CCECP (cavidade oral) em segundo grau (tio). Um outro caso não tinha história de câncer na família. Um caso de carcinoma de orofaringe, entre os cinco com perda do gene, era positivo para o HPV16 (caso BT1475). Esse mesmo caso era do sexo masculino, tinha 66 anos de idade ao diagnóstico, não fumava ou bebia e não relatava história familiar de câncer. Os resultados são mostrados no Anexo 9.

Os cinco casos (75, BT1475, BT878, 584, 579) apresentaram perdas tanto na amostra tumoral quanto na amostra de sangue periférico.

A comparação entre os dados de perdas genômicas e as características clínico-patológicas dos pacientes não revelou associações significativas (Tabela 8).

Tabela 8 - Distribuição das amostras tumorais e de sangue periférico de acordo com os resultados de qPCR para o gene *PHF21B*. N°: Número amostral total; Nd: Dados clínicos não determinados.

Variável	Amostras tumorais			Amostras de sangue periférico		
	Casos (N°=75)	N° de casos com perda <i>PHF21B</i> (%)	P-valor	Casos (N°=49)	N° de casos com perda <i>PHF21B</i> (%)	P-valor
Idade	≤ 45 anos	16	7 (43,8)	11	0 (0,0)	0,315**
	> 45 anos	59	36 (61,0)	38	5 (13,1)	
Gênero	Masculino	61	36 (59,0)	40	4 (10,0)	1,000**
	Feminino	14	7 (50,0)	9	1 (11,1)	
Sítio tumoral	Oral + Orofaringe	54	31 (57,4)	-	-	0,361**
	Hipofaringe	8	3 (37,5)	-	-	
	Laringe	13	9 (69,2)	-	-	
Tabaco	Sim	40	25 (62,5)	20	0 (0,0)	0,259**
	Não	10	5 (50,0)	7	1 (14,3)	
	Nd	25		22		
Álcool	Sim	40	24 (60,0)	20	0 (0,0)	0,231**
	Não	9	5 (55,6)	6	1 (16,7)	
	Nd	26		23	-	

Variável		Casos (Nº=75)	Nº de casos com perda <i>PHF21B</i> (%)	P-valor	Casos (Nº=49)	Nº de casos com perda <i>PHF21B</i> (%)	P-valor
Tabaco + álcool	Sim	39	23 (59,0)	1,000*	16	0 (0,0)	0,157**
	Não	11	7 (63,6)		11	1 (9,1)	
	Nd	25			22	-	
Estádio T	T1+T2	22	15 (68,2)	0,290**	-	-	-
	T3+T4	51	28 (54,9)		-	-	
	Nd	2					
Estádio N	N0	38	24 (63,2)	0,366**	-	-	-
	N+	36	19 (52,8)		-	-	
	Nd	1					
Estádio clínico	I + II	17	13 (76,5)	0,080**	-	-	-
	III+ IV	57	30 (52,6)		-	-	
	Nd	1					
HPV16+	Sim	5	3 (60,0)	1,000*	-	-	-
	Não	54	29 (53,7)		-	-	
	Nd	16					

Variável		Casos (Nº=75)	Nº de casos com perda <i>PHF21B</i> (%)	P-valor	Casos (Nº=49)	Nº de casos com perda <i>PHF21B</i> (%)	P-valor
Pelo menos 1 dos critérios	Sim	46	27 (58,7)	0,764**	28	1 (3,6)	0,150**
	Não	29	16 (55,2)		21	4 (19,0)	
História familiar de câncer	1º grau	30	22 (73,3)	0,049**	19	0 (0,0)	0,067**
	Não	29	14 (48,3)		14	3 (21,4)	
	Nd	16			16		
História familiar de CCECP	1º grau	6	4 (66,7)	1,000*	1	0 (0,0)	1,000**
	Não	51	30 (58,8)		31	3 (9,7)	
	Nd	18			17		
Recidiva	Sim	18	12 (66,7)	0,551**	-	-	-
	Não	31	18 (58,1)		-		
	Nd	26					
Morte	Sim	43	24 (55,8)	0,814**	-	-	-
	Não	29	17 (58,6)		-		
	Nd	3					

Legendas:

*: Qui-quadrado de Pearson

** : Teste exato de Fisher

4.3 ANÁLISE DE MUTAÇÕES NO GENE *PHF21B* PELO SEQUENCIAMENTO DIRETO

Vinte e seis amostras de DNA de sangue periférico e do tumor do mesmo paciente com CCECP foram amplificadas pela PCR e analisadas pelo sequenciamento direto em busca de mutações no gene *PHF21B*.

O gene possui 13 éxons, mas apenas os éxons 3, 6, 7, 8, 9 e 11 foram passíveis de análise. Os éxons 7, 8 e 9 contém o domínio PHD *zinc finger* de ligação ao DNA. A análise de sequenciamento foi realizada parcialmente em estudo prévio (éxons 7, 8 e 9) (BERTONHA 2008).

Entre os 26 pacientes avaliados, 10 apresentavam história familiar de câncer, sendo que 9/10 apresentavam história familiar em parentes de primeiro grau. Entre os 10 pacientes com história familiar, 9 amostras pareadas (sangue e tumor) foram avaliadas para perdas no gene *PHF21B* pela qPCR. Foram detectadas perdas para o gene *PHF21B* em 8/9 tumores, mas em nenhuma amostra de sangue periférico destes pacientes.

Além das 26 amostras pareadas (sangue e tumor) outras nove pareadas foram sequenciadas para alguns dos seis éxons selecionados. As Tabelas 9 e 10 mostram os casos sequenciados para cada um dos éxons.

Tabela 9 - Caracterização das amostras avaliadas por sequenciamento direto.

Amostra	Sítio	Éxons											História 1º grau	História 1º ou 2º grau	
		3S	3T	6S	6T	7S	7T	8S	8T	9S	9T	11S			11T
40	oral	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd	+	+
53	hipofaringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	+	+
55	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
66	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	+	+
72	laringe	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●		●	●	●	Nd	Nd	0	0
75	oral	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd	0	+
114	orofaringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
128	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	+
163	laringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	+	+
168	orofaringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	+	+
169	orofaringe	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd	+	+
178	oral	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd	+	+
207	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	+	+
212	laringe	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd	0	0
229	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	+	+
326	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
331	laringe	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd	0	+
336	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
339	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	+	+
348	orofaringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
349	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
353	laringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	+	+
398	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	+	+
581	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd
586	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd
588	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd
600	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd

Amostra	Sítio	Éxons												História 1º grau	História 1º ou 2º grau
		3S	3T	6S	6T	7S	7T	8S	8T	9S	9T	11S	11T		
603	laringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd
606	hipofaringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd
637	laringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
BT1215	oral	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	●	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	0	0
BT1287	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
BT1426	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
BT1475	orofaringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	0	0
BT878	oral	●	Nd	●	●	●	●	●	Nd	●	Nd	●	●	0	0

Legenda:

- Sequenciamento realizado
- s Sequenciamento realizado no sangue no respectivo éxon
- T Sequenciamento realizado no tumor no respectivo éxon
- N Perfil normal de amplificação do gene PHF21B pela qPCR
- P Perda para o gene PHF21B pela qPCR
- G Ganho para o gene PHF21B pela qPCR
- + Presente
- 0 Ausente
- Nd Informação não determinada

Tabela 10 - Amostras avaliadas pelo sequenciamento direto do gene *PHF21B* e a relação com a análise pela qPCR no sangue e tumor e presença de história familiar.

Amostra	Sítio	Éxons											qPCR tumor	qPCR sangue	História 1º grau	História 1º ou 2º grau	
		3S	3T	6S	6T	7S	7T	8S	8T	9S	9T	11S					11T
40	oral	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd	P	N	+	+
53	hipofaringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	N	+	+
55	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	N	N	0	0
66	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd	+	+
72	laringe	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	Nd	●	●	●	Nd	Nd	N	Nd	0	0
75	oral	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd	P	P	0	+
114	orofaringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	N	N	0	0
128	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	N	N	0	+
163	laringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	N	+	+
168	orofaringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	N	+	+
169	orofaringe	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd	P	Nd	+	+
178	oral	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd	N	N	+	+
207	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	N	+	+
212	laringe	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd	P	Nd	0	0
229	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	N	+	+
326	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	Nd	0	0
331	laringe	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	●	●	●	●	Nd	Nd	P	N	0	+
336	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	N	N	0	0
339	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	N	+	+
348	orofaringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	N	Nd	0	0
349	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	Nd	0	0
353	laringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	N	+	+
398	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	N	+	+
581	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	N	Nd	Nd
586	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	N	Nd	Nd

Amostra	Sítio	Éxons												qPCR tumor	qPCR sangue	História 1º grau	História 1º ou 2º grau
		3S	3T	6S	6T	7S	7T	8S	8T	9S	9T	11S	11T				
600	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	N	N	Nd	Nd
603	laringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	N	Nd	Nd
606	hipofaringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	N	Nd	Nd
637	laringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	N	0	0
BT1215	oral	Nd	Nd	Nd	Nd	●	●	●	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	N	Nd	0	0
BT1287	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	N	N	0	0
BT1426	oral	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	N	N	0	0
BT1475	orofaringe	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	P	P	0	0
BT878	oral	●	Nd	●	●	●	●	●	Nd	●	Nd	●	●	P	P	0	0

Legenda:

- Sequenciamento realizado
- s Sequenciamento realizado na amostra de sangue periférico
- T Sequenciamento realizado no tumor
- N Perfil normal de amplificação do gene PHF21B pela qPCR
- P Perda para o gene PHF21B pela qPCR
- G Ganho para o gene PHF21B pela qPCR
- + Presente
- 0 Ausente
- Nd Metodologia não realizada ou informação não determinada

Todas as sequências obtidas foram analisadas quanto à identidade com o gene *PHF21B* pelo software BLAST. Apenas as amostras com >90% de identidade foram consideradas na análise final. Após essa etapa os cromatogramas foram avaliados individualmente e em conjunto no software *CLC Main Workbench 5.0.2*, tendo como referência para o alinhamento a sequência genômica do *PHF21B* (NM_138415.3).

Não foram encontradas mutações ou alterações relevantes nos éxons avaliados.

4.4 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO POR HRM

Seis linhagens celulares de CCECP (SCC4, SCC9, SCC15, FaDu, CCL-138 e HTB-41) foram avaliadas quanto ao perfil de metilação no DNA, assim como 32 amostras de sangue periférico de pacientes com CCECP, 37 amostras de DNA dos tumores desses mesmos pacientes e ainda 12 amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis e sem história de câncer em 1º grau.

Todas as amostras foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio, para a discriminação das citosinas metiladas, e à análise de HRM (*High Resolution Melting*), que explora as diferenças no perfil de dissociação do *amplicon* derivado de DNA modificado pelo bissulfito.

Em uma análise inicial, para a escolha da melhor região da ilha CpG273 a ser avaliada nas amostras posteriores, as reações de HRM foram realizadas em quatro das linhagens celulares (SCC4, SCC9, SCC15 e

FaDu), tratadas e não tratadas com 5-aza-CdR, utilizando-se três conjuntos de iniciadores nomeados de acordo com as três regiões da ilha CpG 273 (1, 2 e 3, respectivamente) (Figura 3).

Cromossomo 22

Gene *PHF21B*

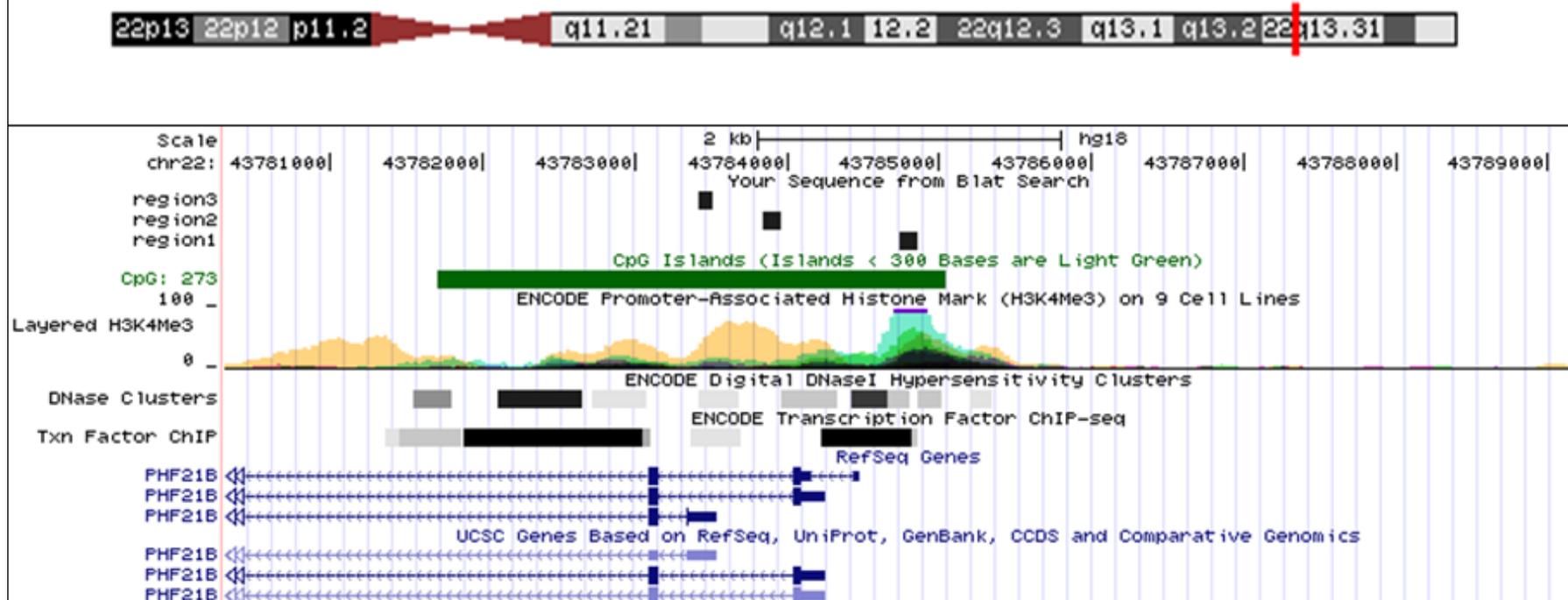


Figura 3 - Diagrama da ilha CpG associada ao promotor do gene *PHF21B*, de acordo com a localização física em 22q13.31 (UCSC *Genome Browser on Human, assembly GRCh37/hg19*, <http://genome.ucsc.edu>). Os detalhes mostram a posição das três regiões avaliadas por HRM. A região 1 sobrepõe e é associada ao promotor ativo ou prestes a ser ativado, tal como sugerido pela marca de enriquecimento da histona H3K4Me3, determinada por um ensaio ChIP-seq em nove linhagens celulares (Gm12878, H1ES, HepG2, HMEC, HSMM, HUVEC, K562, NHEK, NHLF). As áreas hipersensíveis a DNase e sítios de fatores de transcrição também se sobrepõe a região 1 (os retângulos em cinza englobam os picos de ocupação do fator de transcrição, enquanto que os retângulos mais escuros são proporcionais ao máximo sinal observado em qualquer linhagem celular) (Dados do ENCODE Project).

Essa análise prévia da ilha CpG273 nas linhagens celulares selecionadas revelou que tanto as linhagens não tratadas como as tratadas com 5-aza-CdR apresentaram ausência de metilação para as três regiões avaliadas (Figura 4).

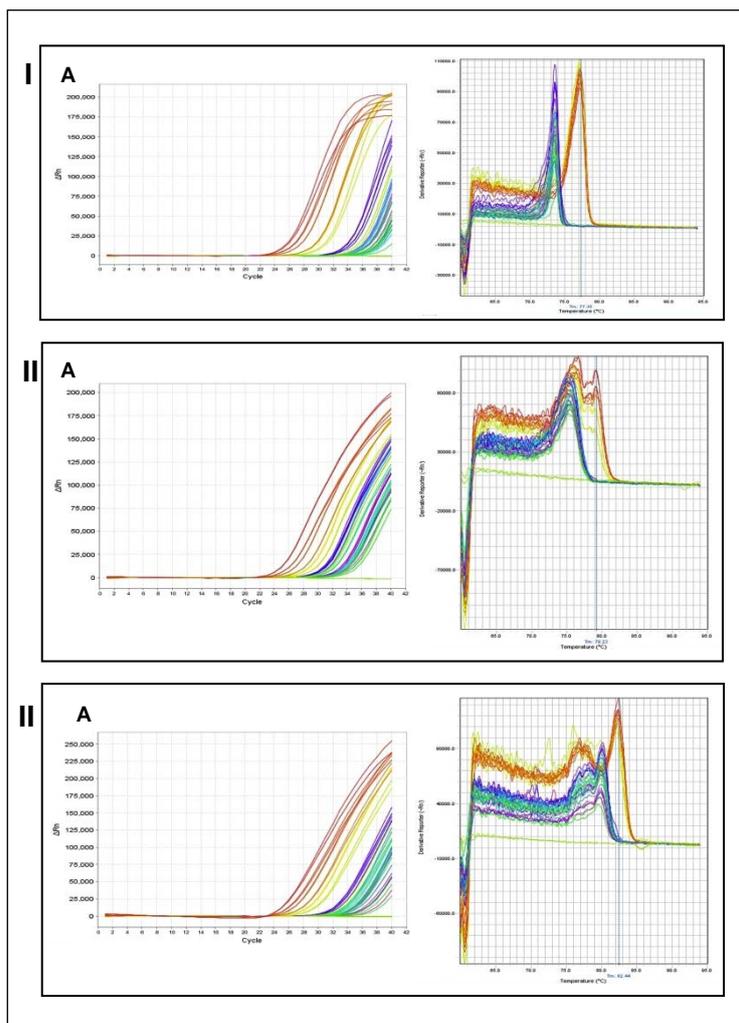


Figura 4 - Gráficos obtidos após a amplificação do DNA pela PCR em tempo real com oligonucleotídeos iniciadores direcionados para as regiões 1 (I), 2 (II) e 3 (III). Em A) curva de amplificação e em B) curva de dissociação. Estas imagens incluem os dados das linhagens celulares tratadas e não tratadas com 5-aza-2'-deoxicitidina e da curva-padrão.

Após a análise dos parâmetros da curva de dissociação e da sobreposição com o sítio de início de transcrição e de fatores reguladores preditos do gene optou-se por prosseguir com as análises utilizando o conjunto de iniciadores número 1, referente à região 1 da ilha CpG273 (Figura 5). Esse conjunto foi então utilizado para as reações subsequentes nas outras linhagens celulares e nas amostras tumorais e de sangue periférico dos pacientes assim como nas amostras de sangue dos indivíduos saudáveis.

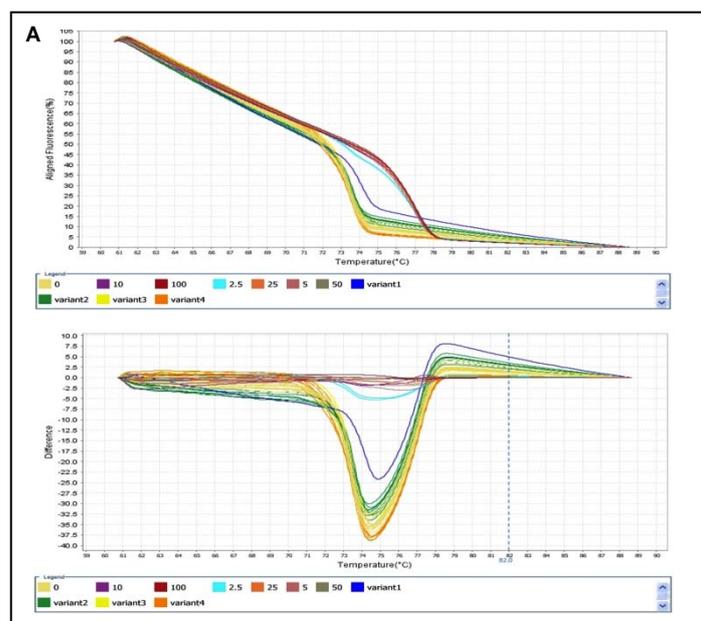


Figura 5 - Gráficos obtidos após a análise de HRM da região 1. O sistema capta o sinal da fluorescência emitida à medida que a temperatura se eleva e as fitas se abrem, gerando o gráfico *Aligned Melt Curves* (ou curvas de dissociação alinhadas). Outro gráfico gerado é o *Difference Plot*, no qual as curvas das amostras são subtraídas de uma amostra referência (no caso, a amostra referente à 50% de metilação, mostrada como a linha base). Em A) *Aligned Melt Curves* e em B) *Difference Plot*, das linhagens celulares tratadas e não tratadas com 5-aza-2'-deoxicitidina e da curva-padrão.

A avaliação do perfil de metilação revelou que a região genômica correspondente à parte da ilha CpG 273 (região 1) não se apresenta metilada nas linhagens celulares, nas amostras de sangue dos indivíduos saudáveis e na maioria (65%) das amostras tumorais. Treze amostras tumorais (35,1%) apresentaram algum nível de metilação (2,5% a 25%). Baseados no estudo de KRISTENSEN et al. (2009) e com o objetivo de estimar o nível de metilação dessas 13 amostras, foram utilizados os pontos da curva como padrão para os ensaios de metilação. Os pontos da curva apresentam razões conhecidas entre o DNA comercial não metilado e o DNA comercial metilado, ou seja, com as seguintes porcentagens de metilação: 0%, 2,5%, 5%, 10%, 25%, 50% e 100%. As porcentagens entre 2,5%-5,0% foram consideradas como baixo nível de metilação (B); valores entre 5,0%-10,0% foram considerados como nível intermediário (I); valores entre 10%-100% foram considerados como alto nível de metilação (A). Alguns valores ficaram nos pontos intermediários e foram considerados como Baixo-Intermediário (B-I) ou Intermediário-Alto (I-A). Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11 - Análise da metilação do DNA por HRM nas linhagens celulares, amostras de sangue periférico e amostras tumorais, de acordo com a região 1 referente à ilha CpG 273.

Amostra	qPCR <i>PHF21B</i> sangue	qPCR <i>PHF21B</i> tumor	Metilação (%) região 1		Nível
			Sangue	Tumor	
Controle 1	Nd	Nd	0	Nd	-
Controle 2	Nd	Nd	0	Nd	-
Controle 3	Nd	Nd	0	Nd	-
Controle 4	Nd	Nd	0	Nd	-
Controle 5	Nd	Nd	0	Nd	-
Controle 6	Nd	Nd	0	Nd	-
Controle 7	Nd	Nd	0	Nd	-
Controle 8	N	Nd	0	Nd	-
Controle 9	N	Nd	0	Nd	-
Controle 10	N	Nd	0	Nd	-
Controle 11	N	Nd	0	Nd	-
Controle 12	N	Nd	0	Nd	-
SCC4	Nd	N	Nd	0	-
SCC9	Nd	N	Nd	0	-
SCC15	Nd	N	Nd	0	-
FaDu	Nd	G	Nd	0	-
CCL-138	Nd	Nd	Nd	0	-
HTB-41	Nd	Nd	Nd	0	-
53	N	P	0	0	-
98	Nd	N	Nd	0	-
114	N	N	0	5	B-I
128	N	N	0	0	-
168	N	P	0	0	-
178	N	N	0	0	-
207	N	P	0	5-10	I
208	N	P	0	0	-
229	N	P	0	2.5-5	B
261	Nd	N	Nd	0	-
326	Nd	P	0	10-25	A
338	Nd	P	Nd	0	-
339	N	P	0	0	-
343	Nd	P	Nd	0	-
348	Nd	N	0	5-10	I
349	Nd	P	0	0	-
353	N	P	0	25	A
398	N	P	0	0	-
564	N	N	0	0	-

5					
65	N	N	0	0	-
578	N	P	0	10-25	A
579	P	P	0	10-25	A
581	N	P	0	0	-
586	N	P	0	0	-
588	N	N	0	5-10	I
600	N	N	0	0	-
603	N	P	0	10	I-A
605	N	N	0	10	I-A
606	N	P	0	0	-
27.1	N	P	0	2.5-10	B-I
58.1	Nd	N	0	0	-
61.1	N	N	0	0	-
67.1	P	N	0	10	I-A
BT1287	N	N	0	0	-
BT1426	N	N	0	0	-
BT1475	P	P	0	0	-
BT878	P	P	Nd	0	-

Legenda:

P: perda pela qPCR para o gene *PHF21B*

G: ganho pela qPCR para o gene *PHF21B*

N: perfil normal de amplificação pela qPCR para o gene *PHF21B*

B: baixo nível de metilação

I: nível intermediário de metilação

A: alto nível de metilação

B-I: nível baixo a intermediário de metilação

I-A: Nível intermediário a alto de metilação

Nd: informação não determinada (experimento não realizado ou sem resultados)

Entre as 37 amostras tumorais analisadas, 13 (35,1%) apresentaram algum nível de metilação, sendo seis casos de cavidade oral, três casos de orofaringe, um caso de hipofaringe e três casos de laringe. Cinco casos entre os 13 tumores apresentaram história familiar em 1º grau. Sete dos 13 pacientes preenchiam pelo menos um dos critérios adotados como relacionados a predisposição hereditária.

Dentre os 13 casos, oito apresentaram algum nível de metilação e

perda do gene *PHF21B* na análise de qPCR nas amostras tumorais. Dois casos (579 e 67.1) apresentaram algum nível de metilação no tumor e perda do gene na análise de qPCR nas amostras de sangue. Entre os 13 casos, o 579 apresentou metilação em alto nível (10%-25%) e perda tanto na amostra de sangue quanto na amostra tumoral.

Os casos BT1475 e BT878 apresentaram perda para o gene *PHF21B* no sangue e no tumor, mas não apresentaram metilação (0%) pela análise de HRM. O caso 67.1 apresentou perda do gene no sangue, mas não no tumor, e apresentou 10% de metilação no tumor, mas não no sangue.

Para a comparação dos resultados de metilação com os dados clínicos disponíveis desses pacientes, qualquer porcentagem de metilação foi considerada como positiva (2,5%-25%). Foram encontradas associações estatisticamente significativas para a presença de metilação e sítio tumoral ($p=0,047$), pacientes que não fumavam ($p=0,011$), pacientes que não fumavam e não bebiam ($p=0,026$) e com estadiamento clínico I + II ($p=0,042$), mas esses achados não parecem reais devido ao pequeno número amostral. A Tabela 12 mostra o resultado dessa análise.

Tabela 12 - Distribuição das amostras tumorais quanto a presença de metilação na região 1 da ilha CpG273.

Variável		Número de casos (Nº= 37)	Presença de metilação	p-valor
Gênero	Masculino	32	10 (31,3)	0,321*
	Feminino	5	3 (60,0)	
Sítio tumoral	Oral + orofaringe	30	9 (30,0)	0,047*
	Hipofaringe	4	1 (25,0)	
	Laringe	3	3 (100,0)	
Tabaco	Sim	16	2 (12,5)	0,011*
	Não	7	5 (71,4)	
	Nd	14	-	
Álcool	Sim	19	5 (26,3)	0,557*
	Não	4	2 (50,0)	
	Nd	14	-	
Tabaco + álcool	Sim	15	2 (13,3)	0,026*
	Não	8	5 (62,5)	
	Nd	14	-	
Estádio T	T1+T2	13	7 (53,8)	0,148*
	T3+T4	24	6 (25,0)	
Estádio N	N0	16	8 (50,0)	0,098**
	N+	21	5 (23,8)	
Estádio clínico	I + II	9	6 (66,7)	0,042*
	III+ IV	28	7 (25,0)	
2º tumor primário	Sim	4	3 (75,0)	0,053*
	Não	13	2 (15,4)	
	Nd	20	-	

Cont/ Tabela 12

Variável		Número de casos (Nº= 37)	Presença de metilação	p-valor
Invasão perineural	Presente	9	1 (11,1)	0,303*
	Ausente	10	4 (40,0)	
	Nd	18	-	
Invasão vascular sanguínea	Presente	2	0 (0,0)	1,000*
	Ausente	17	5 (29,4)	
	Nd	18	-	
Invasão vascular linfática	Presente	7	0 (0,0)	0,106*
	Ausente	12	5 (41,7)	
	Nd	18	-	
HPV16+	Sim	4	2 (50,0)	0,627*
	Não	30	11 (36,7)	
	Nd	3	-	
Preenche pelo menos 1 critério	Sim	23	7 (30,4)	0,495*
	Não	14	6 (42,9)	
História familiar	1º grau	14	5 (35,7)	0,683*
	Não	12	3 (25,0)	
	Nd	11	-	
História familiar de CCECP	1º grau	2	0 (0,0)	1,000*
	Não	23	7 (30,4)	
	Nd	12	-	
Recorrência	Sim	9	1 (11,1)	0,165*
	Não	13	6 (46,2)	
	Nd	15	-	

Legenda:

0: ausente

+: presente

*: Qui-quadrado de Pearson

**: Teste exato de Fisher

Nº: Número amostral total; Nd: Dados clínicos não determinados.

Entre as 21 amostras tumorais que apresentaram perda para o gene *PHF21B* pela qPCR, 8 (38,1%) mostraram algum nível de metilação, mas essa associação não foi estatisticamente significativa ($p=0,666$; χ^2 de Pearson).

Entre as amostras metiladas (tumorais), quatro (207T, 348T, 578T e 605T) apresentaram um padrão heterogêneo com variação entre as triplicatas, com formação de possíveis heterodúplexes. Destes quatro casos, dois (207T e 578T) também tiveram perda para o gene *PHF21B* pela qPCR, nas mesmas amostras tumorais. Já as amostras de sangue periférico 207N e 578N não apresentaram perda para o gene.

4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS miRNAS *HSA-LET-7A-3* E *HSA-LET-7B*

Em 22q13.31 também está mapeado o gene *PHF21B* e os os miRNA *hsa-let-7a-3* e *hsa-let-7b*. O marcador D22S274 está a 7,6Kb do gene *PHF21B* e este gene está a 1.102.820pb do *hsa-let-7a-3* e a 1.103.757pb do *hsa-let-7b*. Esses miRNAs distam entre si em 864pb.

A análise de expressão relativa dos miRNAs *hsa-let-7a-3* e *hsa-let-7b* foi realizada em 25 amostras de sangue periférico e 27 amostras tumorais de pacientes com CCECP e história familiar de câncer, destes 24 casos eram amostras pareadas (sangue e tumor do mesmo paciente). Dez amostras de sangue periférico de pacientes saudáveis e sem história familiar de câncer em parentes de 1º grau também foram incluídos no estudo como

controles normais (aqui identificados com “N” após a numeração).

Os RNAs não codificadores *RNU48*, *RNU44*, *U47*, *RNU6B* e *hsa-miR-16* foram selecionados e testados em um subconjunto de amostras, para a seleção do melhor grupo de miRNAs de referência. Para esse teste inicial, sete amostras controles foram utilizadas, assim como seis amostras tumorais de CCECP e um “pool normal”, composto de uma mistura de 19 amostras obtidas de sangue de indivíduos saudáveis e sem história familiar de câncer em parentes de 1º grau. Após a avaliação dos resultados utilizando o programa GeNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>), determinou-se que os RNAs não codificadores *RNU48*, *RNU6B* e *RNU44* eram os mais estáveis para serem considerados na normalização dos miRNA alvos. Os resultados obtidos pelo GeNorm possibilitaram o cálculo de um fator de normalização da expressão gênica (FN) para cada amostra com base na média geométrica dos valores obtidos para os diferentes normalizadores (VANDESOMPELE et al. 2002). Os Anexos 10 e 11 mostram os resultados dessa análise.

Após o teste inicial, todas as amostras foram avaliadas para os três normalizadores escolhidos *RNU48*, *RNU6B* e *RNU44* sendo repetido a análise no GeNorm. Os miRNAs normalizadores mais estáveis foram o *RNU48* e o *RNU44*, conforme resultados mostrados nos Anexos 11 e 12.

Assim, para a avaliação dos resultados de expressão dos miRNAs nas amostras foram utilizados os normalizadores *RNU48* e *RNU44* (Anexo 13). A normalização dos dados foi realizada como proposto por PFAFFL

(2001) e os resultados obtidos foram transformados em razão de log2. Para as análises estatísticas, foram excluídos os valores considerados extremos (*outliers*). O teste estatístico não paramétrico de Kruskal-Wallis foi escolhido para as análises iniciais dos dados. Para cada miRNA estudado foi realizada a comparação entre os três grupos: amostras de sangue de indivíduos saudáveis (grupo 1), amostras de sangue dos pacientes com CCECP (grupo 2) e amostras de tumores dos pacientes (grupo 3). Para os dois miRNAs avaliados, a comparação revelou uma associação estatisticamente significativa, com $p=0,001$ (Figura 6).

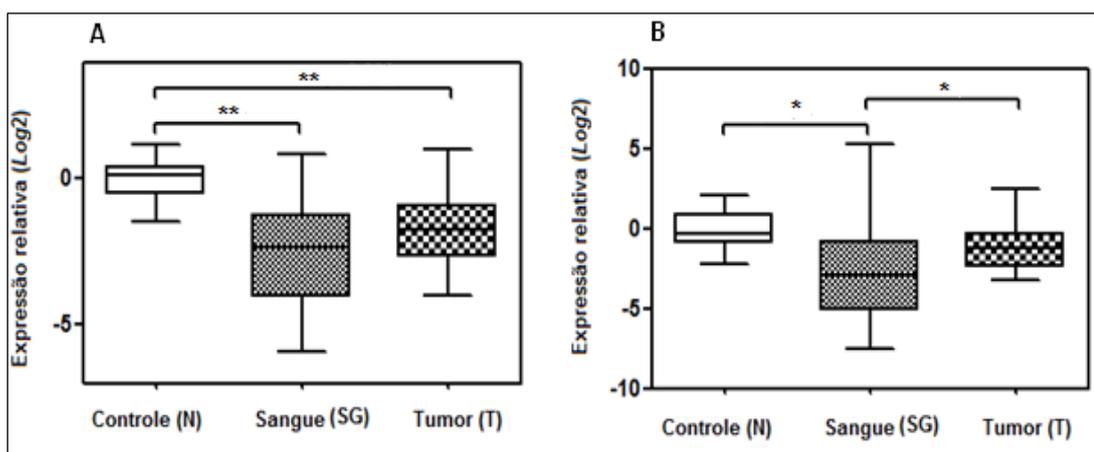


Figura 6 - Comparação em pares entre os grupos amostrais para os miRNAs *hsa-let-7a-3* (A) e *hsa-let-7b* (B). O pós-teste de Mann-Whitney com correção de Bonferroni foi aplicado e revelou significância estatística entre os grupos assinalados. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Foi realizada também uma análise não pareada entre os grupos (aos pares): grupo 1 *versus* grupo 2; grupo 1 *versus* grupo 3; e grupo 2 *versus* grupo 3 pelo teste de Mann Whitney com correção de Bonferroni (para correção de múltiplas hipóteses), como mostrado na Tabela 13.

Tabela 13 - Comparações entre a expressão de *hsa-let-7a-3* e *hsa-let-7b* em sangue de indivíduos saudáveis sem histórico de câncer pessoal ou em parentes de primeiro grau (grupo 1), sangue de indivíduos com CCECP (grupo 2) e seus respectivos tumores (grupo 3).

miRNA	Amostragem	N*	Mediana	Kruskal-Wallis	Pós-teste [#]	Análise Pareada [°]
<i>hsa-let-7a-3</i>	Grupo 1	10	0,142	0,001	1vs2; p=0,002	-
	Grupo 2	22	-2,326		1vs3; p=0,006	-
	Grupo 3	27	-1,758		2vs3; p=0,337	p=0,429 (n*=23)
<i>hsa-let-7b</i>	Grupo 1	10	-0,310	0,001	1vs2; p=0,010	-
	Grupo 2	24	-2,924		1vs3; p=0,079	-
	Grupo 3	27	-1,231		2vs3; p=0,021	p=0,013 (n*=23)

Legenda:

*número de amostras após exclusão de valores *outliers*.

[#]Teste não paramétrico de Mann-Whitney com correção de Bonferroni.

[°]Teste não paramétrico para amostras emparelhadas de Wilcoxon.

Tanto no sangue de pacientes com histórico familiar de câncer como em seus respectivos tumores foi observado que a expressão de *hsa-let-7a-3* era menor, em relação ao sangue de indivíduos saudáveis. Para *hsa-let-7b*, observou-se também uma menor expressão no sangue dos pacientes e uma tendência a expressão diminuída nos tumores. Porém, o *hsa-let-7b* foi encontrado mais expresso nos tumores em relação aos sangue dos pacientes, inclusive em uma análise pareada (Figura 7A e 7B).

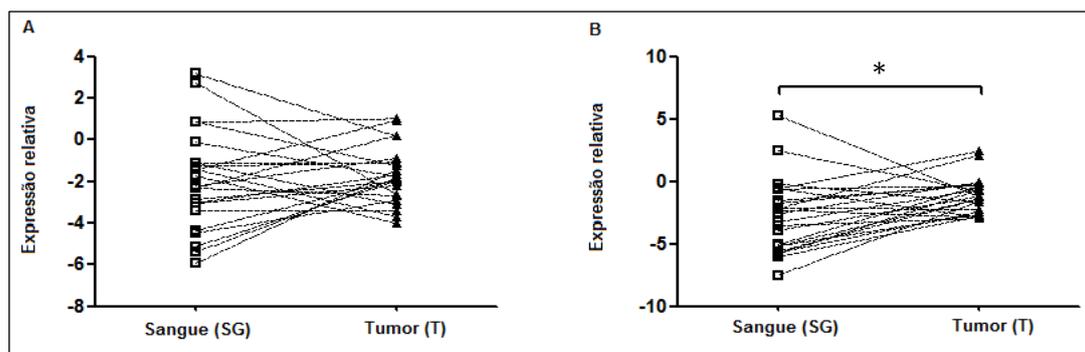


Figura 7 - Comparação entre as amostras pareadas de sangue e tumor de um mesmo paciente para os miRNAs *hsa-let-7a-3* (A) e *hsa-let-7b* (B). O teste de Wilcoxon revelou significância estatística apenas para o *hsa-let-7b*. * $p < 0,05$.

Cinco casos com história familiar positiva (58.1, 61.1, 26.1, 72.1 e 74.1) avaliadas aqui quanto à expressão dos miRNAs também foram avaliadas quanto à perda do *PHF21B* pela qPCR e quanto à metilação pelo HRM. Essa comparação entre os resultados é mostrada na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados comparativos para três das metodologias. Cinco casos foram avaliados para a qPCR, RT-qPCR e HRM.

Caso	qPCR <i>PHF21B</i>		Expressão miRNA – RT-qPCR				HRM	
	Sangue	Tumor	Sangue		Tumor		Sangue	Tumor
			<i>hsa-let-7a-3</i>	<i>hsa-let-7b</i>	<i>hsa-let-7a-3</i>	<i>hsa-let-7b</i>		
58.1	Nd	N	↓	↓	N	N	0%	0%
61.1	N	N	Nd	Nd	N	N	0%	0%
26.1	N	N	↓	↓	N	N	Nd	Nd
72.1	N	P	N	N	N	N	Nd	Nd
74.1	N	N	↑	↑	N	N	Nd	Nd

Legenda:

N: perfil normal de amplificação na qPCR ou expressão normal na RT-qPCR;

P: perda da sequência do gene *PHF21B* na qPCR;

G: ganho da sequência do gene *PHF21B* na qPCR;

↓: expressão diminuída do miRNA avaliado pela RT-qPCR;

↑: expressão aumentada do miRNA avaliado pela RT-qPCR;

Nd: metodologia não avaliada para a amostra

4.6 ANÁLISE GENÔMICA PELA aCGH

Dezoito amostras de DNA pareadas (sangue periférico e tumor do mesmo paciente) foram avaliadas quanto ao número de cópias genômicas pela metodologia de aCGH em lâminas de 4x180K (Agilent). Foi também avaliada uma amostra de sangue de um parente (caso 27.2) do caso 27.1. Os dados obtidos foram analisados no software Nexus 6.0 (*Quality score* <0,3) (Biodiscovery Inc.) e comparados com os dados clínicos.

Considerando-se individualmente as 37 amostras (sangue e tumor), uma análise global das alterações foi realizada e 4819 CNAs (do inglês, *copy number alterations*) foram encontradas (média de $130,2 \pm 139,6$ CNAs). As alterações foram divididas em ganhos (1 cópia adicional), perdas heterozigotas (1 cópia ausente), alto nível de ganhos (2 ou mais cópias adicionais) e perdas homozigotas (2 cópias ausentes).

Entre as amostras de sangue periférico (aqui denominadas **grupo 1**) foram encontradas 803 alterações (média de $42,3 \pm 68,7$). Essas alterações genômicas no grupo 1 variaram de 7 a 307 CNVs por caso, as quais se subdividem em 334 ganhos (41,6%), 421 perdas heterozigotas (52,4%), 13 ganhos em alto nível (1,6%) e 35 perdas homozigotas (4,4%). Analisando-se por cromossomos, os ganhos (incluindo os de alto nível) no grupo 1 foram mais prevalentes nos cromossomos 7 (com 22 eventos) e 19 (com 24 eventos). As perdas (incluindo as homozigotas) foram mais prevalentes nos cromossomos 1 (com 60 eventos) e 15 (com 35 eventos) (Figura 8A).

Para as amostras tumorais (aqui denominadas **grupo 2**) foram

detectadas 4016 alterações com média de $223,1 \pm 132,7$. Essas alterações no grupo 2 variaram de 21 a 647 CNAs por caso, as quais se subdividem em 1789 ganhos (44,5%), 2057 perdas heterozigotas (51,2%), 105 ganhos em alto nível (2,6%) e 65 perdas homozigotas (1,6%). Na análise por cromossomos, os ganhos (incluindo os de alto nível) foram mais prevalentes nos cromossomos 1 (com 357 eventos) e 8 (com 361 eventos). As perdas (incluindo as homozigotas) foram mais prevalentes nos cromossomo 3 (com 266 eventos) e 4 (com 202 eventos) (Figura 8B).

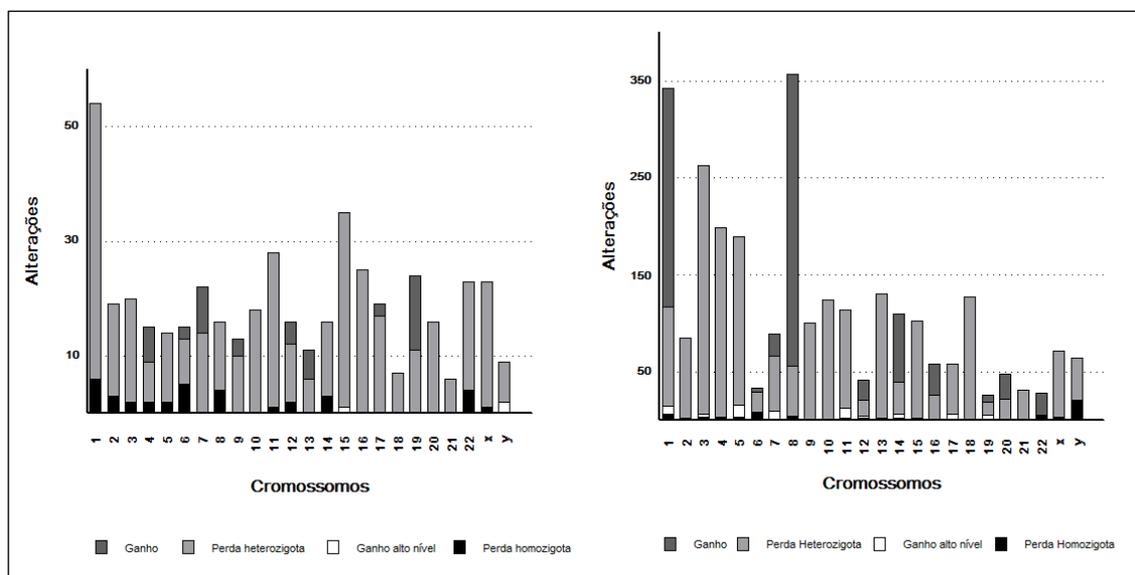


Figura 8 - A) Representação gráfica do número de alterações nas 19 amostras pertencentes ao grupo 1 (sangue periférico), por cromossomo. B) Representação gráfica do número de alterações nas 18 amostras pertencentes ao grupo 2 (amostras tumorais), por cromossomo. Imagens obtidas no programa *Graphpad Prism 5*.

Utilizando os mesmos parâmetros dos casos, foi realizada a análise das alterações no número de cópias de DNA nos 72 indivíduos saudáveis da população brasileira. Esse grupo de referência (aqui denominado **REF**)

apresentou 1223 alterações com média de $17,0 \pm 6,0$. Essas alterações variaram de 6 a 34 CNVs por indivíduo, as quais se subdividem em 479 ganhos (39,2%), 486 perdas heterozigotas (39,7%), 128 ganhos em alto nível (10,5%) e 130 perdas homozigotas (10,6%) (dados obtidos pela Dra Ana Cristina Vitorino Krepischi, CIPE - Hospital A.C.Camargo). Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de CNVs identificadas entre o grupo 1 e o grupo de referência ($p=0,1265$; teste t não pareado, bicaudado).

Os ideogramas referentes às alterações no grupo 1 e no grupo 2 estão representados nas figuras 9A e 9B, respectivamente. O anexo 14 apresenta um exemplo representativo dos perfis de hibridação de um caso pareado (amostra de sangue periférico e amostra de tumor).

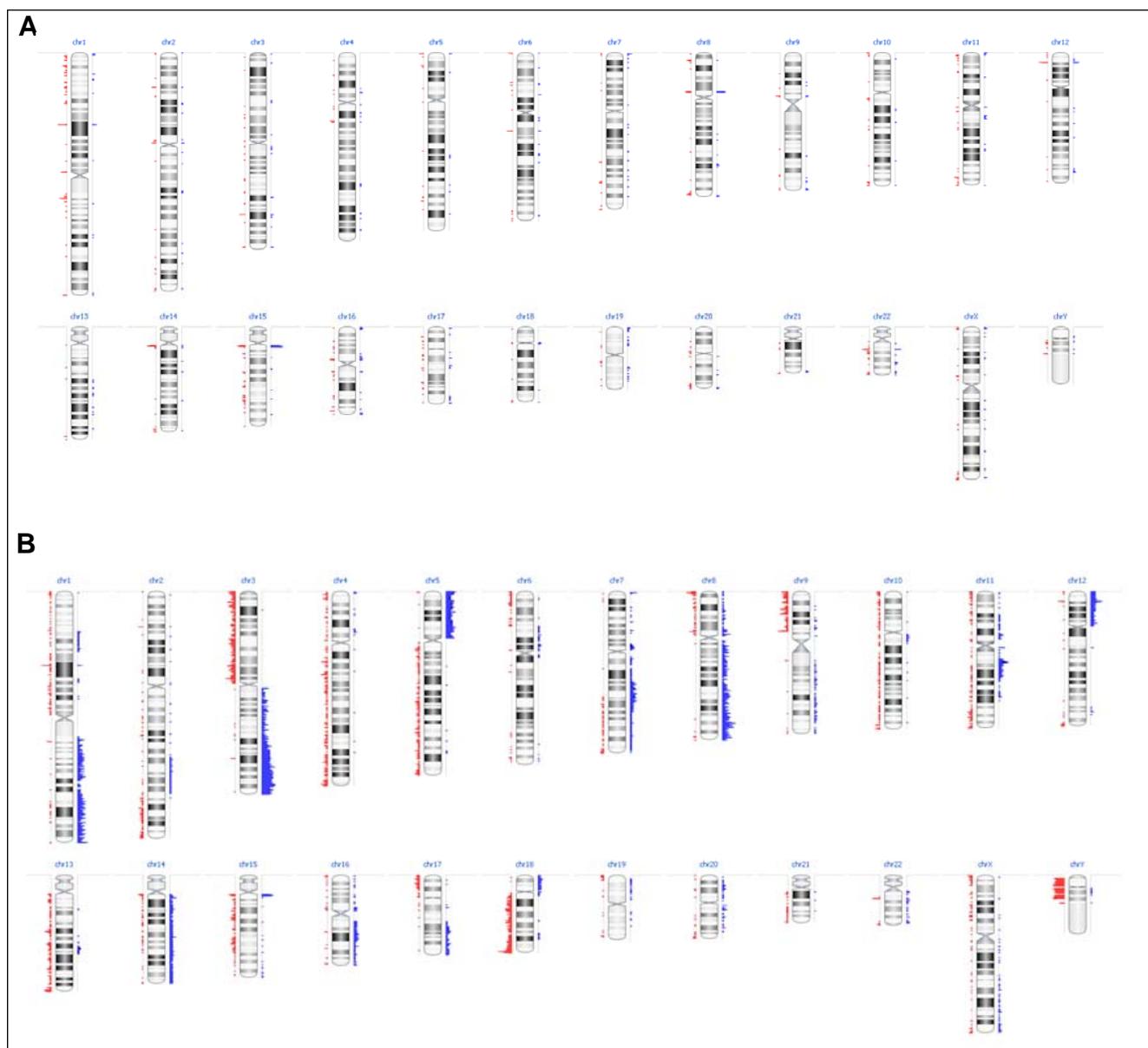


Figura 9 - Ideogramas ilustrando as alterações genômicas encontradas nos 37 casos de CCECP avaliados pela técnica de aCGH. Em A) são mostradas as alterações obtidas no DNA do sangue periférico dos pacientes com CCECP (grupo 1). Em B) são mostradas as alterações genômica detectadas entre as amostras tumorais dos mesmos pacientes (grupo 2). Em ambos, as barras à direita do eixo central de cada cromossomo representam ganhos (em azul), enquanto as barras à esquerda indicam perdas genômicas (em vermelho).

Várias regiões cromossômicas apresentaram alta frequência de CNAs/CNVs e por essa razão foi realizada uma análise mais detalhada, considerando apenas as alterações presentes em mais de 20% dos casos e com p-valor $<0,05$. A representação gráfica dessas alterações em ambos os grupos, para todos os cromossomos está ilustrada na Figura 10.

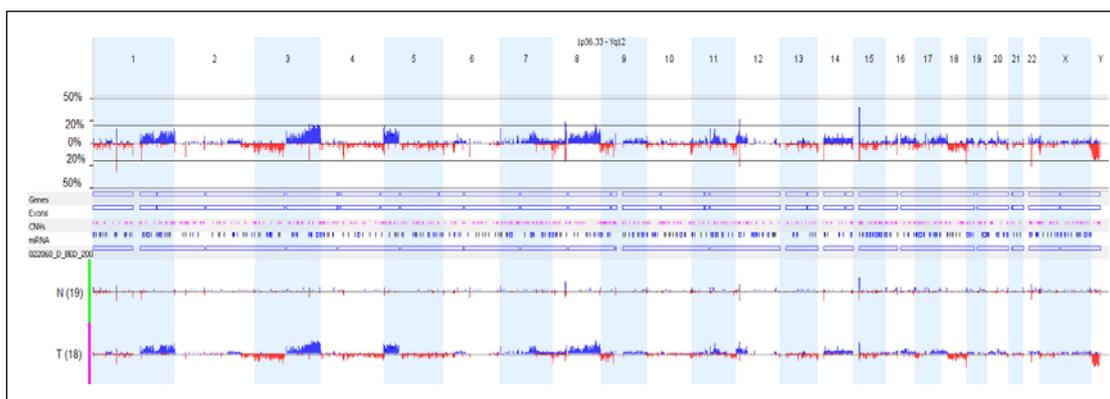


Figura 10 - Representação gráfica das alterações presentes no grupo 1 (N) e 2 (T). As linhas contínuas em preto no quadro superior delimitam a frequência de 20% tanto para ganhos (em azul) quanto para perdas (em vermelho). No quadro inferior são mostradas separadamente as alterações para o grupo 1 (com 19 amostras) e para o grupo 2 (com 18 amostras).

Essas alterações mais frequentes foram comparadas ao banco de dados do **DGV** e ao grupo referência, composto por 72 indivíduos brasileiros saudáveis (**REF**). Essa comparação foi realizada para identificar as alterações comuns, raras e novas raras nos dois grupos estudados. As alterações comuns foram consideradas quando presentes em $>1\%$ das amostras (cobertura total segundo o banco de dados DGV); alterações raras foram denominadas quando detectadas em $\leq 1\%$ dos casos descritos no DGV; e as alterações novas raras foram aquelas ausentes nos bancos de dados avaliados (DGV e REF). As alterações presentes nos cromossomos

sexuais foram excluídas desta análise.

O grupo 1 (amostras de sangue periférico) apresentou apenas uma CNV nova rara em 1p11.2. Essa alteração envolve uma perda que engloba o gene *EMBP1* (*Embigin pseudogene 1*) e está presente em 22,2% das amostras do grupo 1 (casos 74.1N, 26.1N, 27.1N e 67.1N). Levando em consideração as alterações globais (e não apenas as mais frequentes), o caso 74.1T apresentou esta mesma alteração. As demais CNVs encontradas para o grupo 1 foram consideradas como comuns na comparação com os dois bancos (DGV e REF). O resultado da análise para o grupo 1 é mostrado na Tabela 15.

O grupo 2 (de amostras tumorais) apresentou 8 CNAs novas raras: 1q44 (*OR2T6*); 3p12.1 (*CADM2*); 7p22.3 (*C7orf50*, *FP15621*, *GPR146*, *MIR339*); 8p23.3 (*BC022082*, *BC038783*, *LOC286083*); 8p11.21 (*ANK1*); 8q24.21 (*BC014119*); 11q13.2-q13-3 (*AK094674*, *AK124252*, *AK125463*, *ANO1*, *AX746803*, *BC127192*, *CCND1*, *CTTN*, *FADD*, *FGF19*, *FGF3*, *FGF4*, *KIAA1022*, *MIR548K*, *MYEOV*, *OCIM*, *ORAOV1*, *PPFIA1*, *SHANK2*) e 18q23 (*SALL3*). Levando em consideração as alterações globais (e não apenas as mais frequentes), a região alterada em 7p22.3 apresentou ganhos significativos para as amostras tumorais 2.1T, 207T, 61.1T, 72.1T. A mesma alteração e os mesmos genes foram encontrados para a amostra de sangue 74.1N. Analisando individualmente as sondas presentes na lâmina para os genes *C7orf50*, *FP15621*, *GPR146* e *MIR33*, a amostra pareada 74.1T apresentou um ganho em alto nível para uma das sondas do *C7orf50*, mas nenhum outro ganho para alguma sonda dos demais genes.

Perdas em 8p23.3 (*BC022082*, *BC038783*, *LOC286083*) foram identificadas nas amostras tumorais 168T, 2.1T, 207T, 26.1T, 339T e 61.1T. Essa alteração, mas envolvendo apenas o gene *BC022082* também foi encontrada na amostra de sangue 27.2N. Essa amostra é de uma parente do caso 27.1N. Avaliando individualmente as sondas presentes na lâmina para o gene *BC022082*, a amostra de sangue do paciente (27.1N) apresentou perda para uma sonda desse gene. Já a amostra tumoral apresentou perda para três sondas desse mesmo gene.

A região 18q23 mostrou uma perda envolvendo o gene *SALL3* nas amostras tumorais 168T, 207T, 26.1T, 339T, 61.1T, 72.1T e 74.1T. A amostra 72.1N apresentou a mesma alteração para o mesmo gene, na análise global das alterações.

O resultado da análise para o grupo 2 é mostrado na Tabela 16.

Tabela 15 - Alterações estatisticamente significantes encontradas no grupo 1 (amostras de DNA de sangue periférico dos pacientes com CCECP), após comparação com o DGV e o banco de indivíduos saudáveis (REF). *Perda: perda heterozigota; **NR**: CNV nova rara; **R**: CNV rara. **Cobertura por CNV identificada no banco de dados do DGV, pelo software Nexus 6.0; ***Cobertura parcial da região em relação ao banco avaliado.

Região	Start	End	Tamanho (pb)	Evento*	Nº genes	Genes	Nº miRNAs	miRNAs	P-valor	Frequência (%)	Cobertura por CNV (%) [*]	Comparação DGV	Comparação REF
1p31.1	72,537,679	72,585,332	47653	Perda	0		0		0,000	33,3	100	Comum***	Comum***
1p11.2	120,872,963	120,982,693	109730	Perda	2	<i>EMBP1, LOC647121</i>	0		0,000	22,2	100	Comum***	NR
1q21.1	147,255,946	147,442,367	186421	Perda	1	<i>NBPF20</i>	0		0,000	22,2	100	Comum	Comum
3q26.1	163,987,310	164,112,820	125510	Perda	1	<i>BC073807</i>	0		0,000	22,2	100	Comum***	Comum***
6q14.1	79,025,925	79,091,012	65087	Perda	0		0		0,000	22,2	100	Comum***	Comum***
8p11.23	39,349,089	39,445,762	96673	Perda	3	<i>ADAM3A, ADAM5P, tMDC</i>	0		0,000	22,2	100	Comum***	Comum***
8p11.23	39,362,581	39,473,310	110729	Ganho	3	<i>ADAM3A, ADAM5P, tMDC</i>	0		0,000	22,2	100	Comum	Comum
12p13.31	9,492,374	9,571,161	78787	Ganho	0		0		0,000	22,2	100	Comum***	Comum***
12p13.31	9,492,374	9,615,714	123340	Perda	1	<i>BX647938</i>	0		0,000	22,2	100	Comum***	Comum***
14q11.1 - q11.2	18,446,762	19,490,547	1043785	Perda	28	<i>A26C2, AK022914, AK056135, AY338952, AY338954, AY458019, BC016035, BC017398, BC040855, BC041856, BX248778, DQ583164, DQ583610, DQ591735, DQ595048, DQ595091, DQ786293, OR11H12, OR11H2, OR4K1, OR4K2, OR4K5, OR4M1, OR4N2, OR4Q3, POTEG, POTEM</i>	0		0,000	22,2	100	Comum***	Comum***

Cont/ Tabela 15

Região	Start	End	Tamanho (pb)	Evento*	Nº genes	Genes	Nº miRNAs	miRNAs	P-valor	Frequência (%)	Cobertura por CNV (%) [#]	Comparação DGV	Comparação REF
15q11.2	18,841,966	19,326,398	484432	Perda	18	A26B1, AL832227, AX748135, BC012949, CXADRP2, DQ578838, DQ582025, DQ582073, DQ582260, DQ592322, DQ595648, GOLGA6L6, GOLGA8C, GOLGA8E, HERC2P3, LOC646214, NBEAP1, POTE8	0		0,005	22,2	100	Comum	Comum
15q11.2	18,717,320	20,188,556	1471236	Ganho	37	A26B1, AJ004954, AK058056, AL832227, AX748135, BC012949, BC047459, BC062994, CR619482, CR622584, CXADRP2, DQ578838, DQ582025, DQ582073, DQ582260, DQ592322, DQ595648, DQ786202, GOLGA6L6, GOLGA8C, GOLGA8E, HERC2P3, IGH, LOC348120, LOC646096, LOC646214, LOC650137, LOC727924, M84131, NBEAP1, NF1P2, OR4M2, OR4N3P, OR4N4, POTE8, REREP3	1	hsa-mir-1268	0,001	22,2	100	Comum	Comum***
15q11.2	19,373,980	20,188,556	814576	Perda	17	AJ004954, AK058056, BC047459, BC062994, CR619482, DQ786202, IGH, LOC348120, LOC650137, LOC727924, M84131, NF1P2, OR4M2, OR4N3P, OR4N4, REREP3	1	hsa-mir-1268	0,005	22,2	100	Comum	Comum***
22q11.23	22,672,813	22,728,622	55809	Ganho	4	GSTT1, GSTTP1, GSTTP2, LOC391322	0		0,000	22,2	100	Comum***	Comum***
22q11.23	22,672,813	22,728,622	55809	Perda	4	GSTT1, GSTTP1, GSTTP2, LOC391322	0		0,000	22,2	100	Comum***	Comum***

Tabela 16 - Alterações estatisticamente significantes encontradas no grupo 2 (amostras de DNA de tumor dos pacientes com CCECP), após comparação com o DGV e o banco de indivíduos saudáveis (REF).

Região	Start	End	Tamanho (pb)	Evento*	Nº genes	Genes	Nº miRNAs	miRNAs	P-valor	Frequência (%)	Cobertura por CNV (%) [#]	Comparação DGV	Comparação REF
1p31.1	72,537,679	72,585,332	47653	Perda	0		0		0,000	33,3	100	Comum***	Comum***
1q44	246,610,924	246,635,228	24304	Ganho	1	<i>OR2T6</i>	0		0,013	33,3	100	Comum	NR
3p12.1	85,639,597	85,718,527	78930	Perda	1	<i>CADM2</i>	0		0,019	33,3	0,9	R	NR
7p22.3	1,016,487	1,051,282	34795	Ganho	4	<i>C7orf50, FP15621, GPR146, MIR339</i>	1	<i>hsa-mir-339</i>	0,002	22,2	1	Comum***	NR
8p23.3	769,157	1,399,002	629845	Perda	3	<i>BC022082, BC038783, LOC286083</i>	0		0,007	27,8	34,3	Comum***	NR
8p11.21	41,780,680	41,850,242	69562	Ganho	1	<i>ANK1</i>	0		0,002	27,8	9	R	NR
8q24.21	129,541,352	129,684,217	142865	Ganho	1	<i>BC014119</i>	0		0,002	44,4	100	R	NR
9p13.1	38,903,174	39,146,954	243780	Perda	2	<i>CNTNAP3, KIAA1714</i>	0		0,001	33,3	100	Comum***	Comum***
11q13.2 - q13.3	68,820,467	70,119,957	1299490	Ganho	19	<i>AK094674, AK124252, AK125463, ANO1, AX746803, BC127192, CCND1, CTTN, FADD, FGF19, FGF3, FGF4, KIAA1022, MIR548K, MYEOV, OCIM, ORAOV1, PPFIA1, SHANK2</i>	1	<i>hsa-mir-548k</i>	0,031	27,8	27,9	Comum***	NR

*Perda: perda heterozigota; **NR**: CNA nova rara; **R**: CNA rara. **Cobertura por CNVs identificada no banco de dados do DGV, pelo software Nexus 6.0; ***Cobertura parcial da região em relação ao DGV.

Cont/ Tabela 16

Região	Start	End	Tamanho (pb)	Evento*	Nº genes	Genes	Nº miRNAs	miRNAs	P-valor	Frequência (%)	Cobertura por CNV (%) [#]	Comparação DGV	Comparação REF
12p13.31	9,492,374	9,571,161	78787	Perda	0		0		0,000	22,2	100	Comum***	Comum***
12p13.31	9,492,374	9,615,714	123340	Ganho	1	<i>BX647938</i>	0		0,001	33,3	100	Comum***	Comum***
15q11.2	18,571,743	20,051,399	1479656	Ganho	40	<i>A26B1, AJ004954, AK058056, AL832227, AX748135, BC012949, BC047459, BC062994, CR619482, CR622584, CXADRP2, DQ576041, DQ578838, DQ582025, DQ582073, DQ582260, DQ592322, DQ592463, DQ595648, DQ786202, GOLGA6L6, GOLGA8C, GOLGA8E, HERC2P3, IGH, LOC348120, LOC642311, LOC646096, LOC646214, LOC650137, LOC727924, M84131, NBEAP1, NF1P2, OR4M2, OR4N3P, OR4N4, POTE8, REREP3</i>	1	<i>hsa-mir-1268</i>	0,006	22,2	100	Comum	Comum***
18q23	74,641,020	74,899,270	258250	Perda	1	<i>SALL3</i>	0		0,012	33,3	41,7	Comum***	NR
22q11.23	22,672,813	22,728,622	55809	Perda	4	<i>GSTT1, GSTTP1, GSTTP2, LOC391322</i>	0		0,000	22,2	100	Comum***	Comum***

*Perda: perda heterozigota; **NR**: CNA nova rara; **R**: CNA rara. **Cobertura por CNVs identificada no banco de dados do DGV, pelo software Nexus 6.0;

***Cobertura parcial da região em relação ao banco avaliado.

4.6.1 Investigação do gene *PHF21B* e seus arredores em 22q13.31

Como mencionado anteriormente, o gene *PHF21B* está mapeado em 22q13.31, assim como os miRNAs *hsa-let-7a-3* e *hsa-let-7b*, que distam 864pb entre si e estão a aproximadamente 1,1Mb do gene.

A lâmina de aCGH de 4x180K (Agilent) possui 12 sondas intrônicas referentes ao gene *PHF21B* e uma sonda referente ao miRNA *hsa-let-7b*. O *hsa-let-7a-3* não possui nenhuma sonda representativa na lâmina. Pela análise do Nexus 6.0, nenhuma das amostras apresentou alteração tanto para o gene quanto para o miRNA, por não apresentar três sondas consecutivas alteradas. Com a finalidade de caracterizar o perfil de perdas por aCGH envolvendo a região 22q13.31, essas sondas foram avaliadas individualmente, sem levar em consideração o critério de três sondas.

Nessa análise, várias amostras de sangue e de tumor apresentaram perdas heterozigotas para algumas das sondas do *PHF21B* e para a sonda do *hsa-let-7b*. Apenas a amostra tumoral 2.1T apresentou perda homozigota para uma das sondas do gene. Os resultados podem ser melhor visualizados na figura 11. Foram também verificadas alterações compartilhadas entre os casos N e T: caso 65.1 (1 sonda – *let-7b*), 66 (2 sondas), 72.1 (1 sonda), 168 (1 sonda), 207 (2 sondas) e 229 (1 sonda).

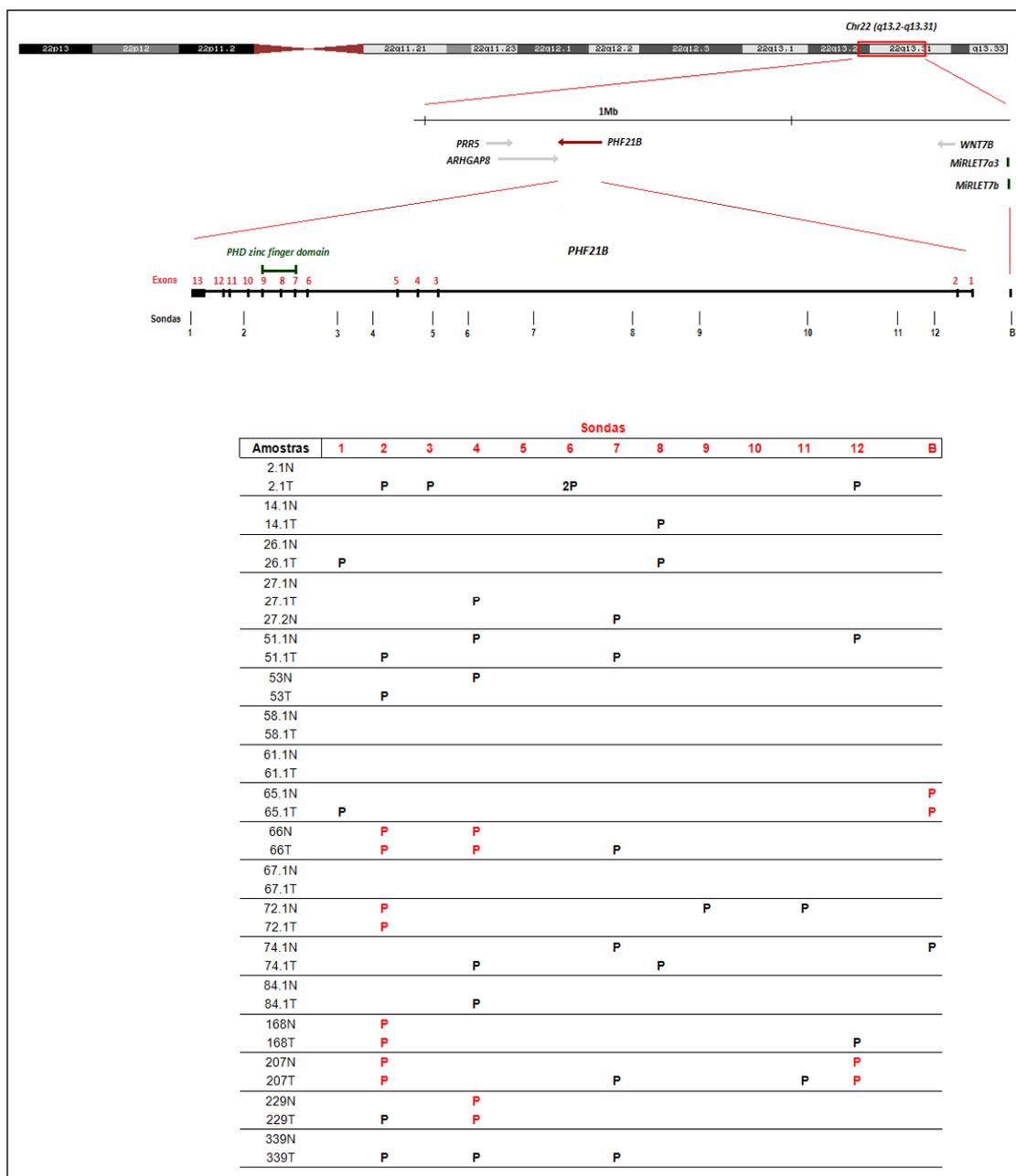


Figura 11 - Representação gráfica das 12 sondas intrônicas para o gene *PHF21B* presentes na plataforma 4x180K da Agilent Technologies (números de 1 a 12) e da sonda para o miRNA *hsa-let-7b* (letra B), para cada um dos 18 casos N e T. Em **vermelho**, as alterações presentes no sangue e tumor do mesmo paciente. P: perda heterozigota; 2P: perda homozigota.

O RNA obtido do sangue periférico dos pacientes 74.1N e 65.1N, assim como a amostra tumoral 65.1T também foram avaliadas para a expressão do miRNA *hsa-let-7b* pela PCR em tempo real. Na análise de RT-qPCR a amostra 74.1N apresentou aumento de expressão para o miRNA (e perda, no sangue, da sonda referente a esse miRNA pela aCGH). A amostra 65.1N só foi avaliada pela aCGH apresentando perda da sonda, como descrito anteriormente. A amostra 65.1T apresentou diminuição de expressão para o miRNA *hsa-let-7b* e perda da sonda do mesmo miRNA pela aCGH.

Ainda em uma busca por CNVs no gene *PHF21B*, uma análise *in silico* foi realizada no banco de dados do DGV e foram encontradas seis alterações descritas para esse gene: quatro do tipo InDel e duas do tipo *Copy Number*, como mostrado no Anexo 15.

Ainda na região 22q13.31 está mapeado o gene *ARHGAP8* (*Rho GTPase activating protein 8*) que, assim como o *PHF21B*, está próximo ao marcador D22S274pb (a 10,4Kb). A lâmina de aCGH de 4x180K (Agilent) possui 13 sondas referentes aos genes *PRR5-ARHGAP8*, 12 mapeadas em regiões intrônicas e apenas uma na região UTR. Pela análise do Nexus 6.0, apenas uma amostra (65.1T) apresentou perda para três sondas consecutivas (sondas 4, 5 e 6 – íntrons 4 e 5). Essa mesma amostra apresentou perda homozigota para o miRNA *hsa-let-7b*. O gene *ARHGAP8* dista aproximadamente 1,12 Mb desse miRNA, mas entre eles há outros genes, inclusive o *PHF21B* (que teve apenas a sonda 1 perdida na amostra 65.1T). A amostra 65.1N também apresentou perda para a sonda 5. Com a

finalidade de se caracterizar alterações afetando o gene *ARHGAP8*, as 13 sondas também foram avaliadas individualmente (Figura 12).

Nessa análise, várias amostras de sangue e de tumor apresentaram perdas heterozigotas para algumas das sondas do *PRR5-ARHGAP8*. A amostra pareada 53N e 53T apresentou perda para a sonda 1, sendo homozigota na amostra N (Figura 12). Os casos 2.1, 53, 65.1, 72.1, 202, 207 e 229, apresentaram perdas de uma mesma sonda nas amostras pareadas N e T.

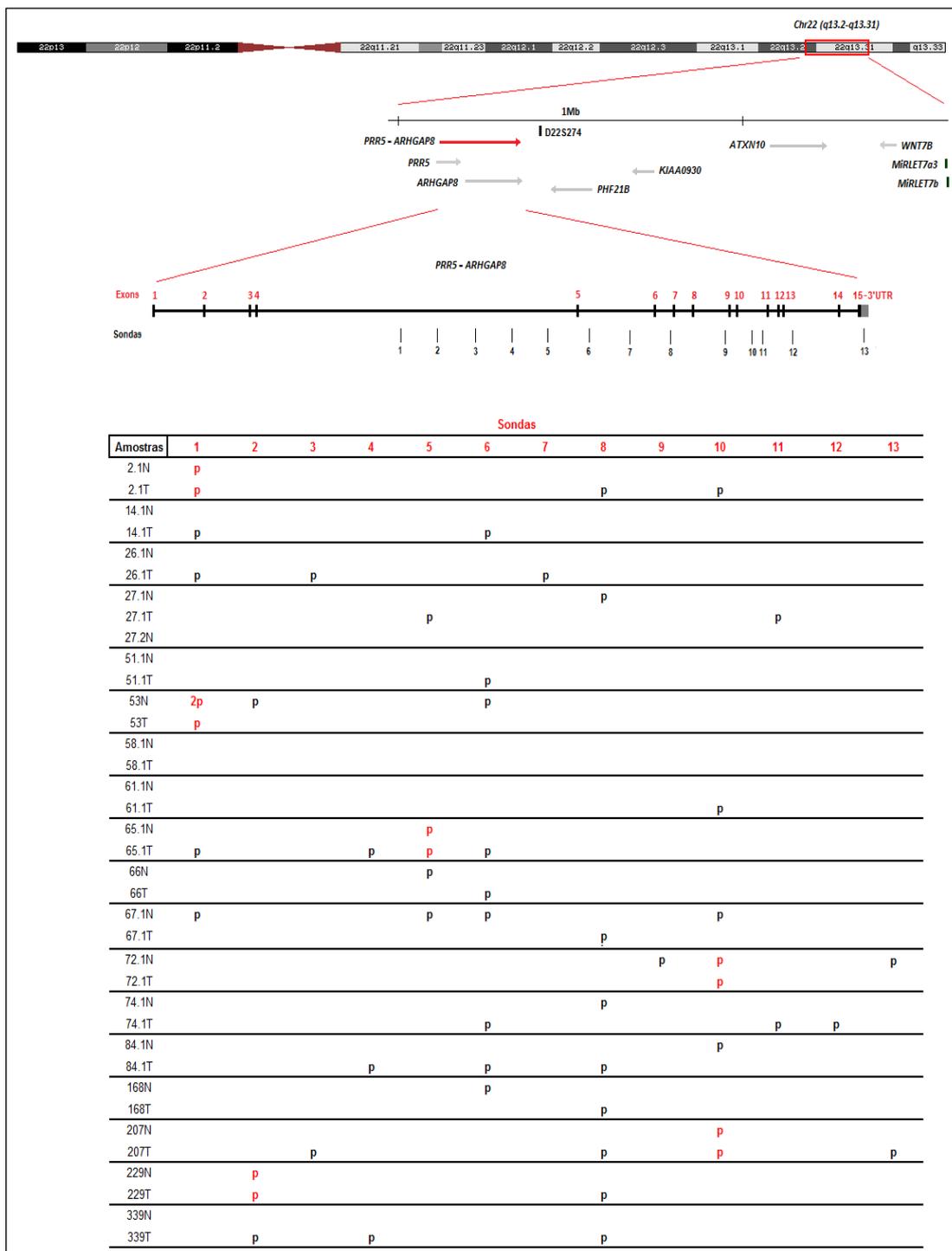


Figura 12 - Representação gráfica das 13 sondas para os genes *PRR5-ARHGAP8* presentes na plataforma 4x180K da Agilent Technologies (números de 1 a 13), para cada um dos 18 casos N e T. Em **vermelho**, as alterações presentes no sangue e tumor do mesmo paciente. P: perda heterozigota; 2P: perda homozigota.

Além da avaliação individualizada das sondas referentes aos genes *PHF21B* e *PRR5-ARHGAP8*, mais próximos ao marcador D22S274, foi realizada uma análise global das perdas homozigotas encontradas pela metodologia de aCGH. Vinte e sete regiões distintas foram encontradas com perdas homozigotas nos tumores dos 18 indivíduos com história familiar de câncer de cabeça e pescoço. Como essas regiões são passíveis de conter novos genes supressores tumorais, foram consideradas importantes para a avaliação dos CCECP. A Tabela 17 mostra os resultados dessa análise.

Três regiões alteradas foram consideradas como CNAs novas raras: 4p14 (*TBC1D1*); 5q11.2 (*RAB3C*) e 11q13.1 (*ATG2A*, *c11orf85*, *GPHA2*, *PPP2R5B*). Quatro regiões alteradas foram consideradas como CNAs novas raras: 3p14.2 (*ID2B*, *PTPRG*); 5q33.1 (*c5orf62*, *MST150*); 6q27 (*RPS6KA2*) e 9p23 (região sem gene descrito, inclusive no Hg19). As amostras de sangue periférico (pareadas ou não) não apresentaram essas alterações.

Tabela 17 - Perdas genômicas homozigotas encontradas nas amostras tumorais.

Amostras	Região	Start	Stop	Tamanho (pb)	Cobertura por CNV (%)#	Nº genes	Genes	miRNAs	p-valor	Comparação DGV	Comparação REF
207T* , 72.1T	1p31.1	72,537,679	72,666,723	129045	100	0	-		0,000	Comum***	Comum***
2.1T, 229T,	1p31.1	72,537,679	72,585,332	47654	100	0	-		0,000	Comum***	Comum***
27.1T* , 61.1T											
66T	11q11**	55,126,379	55,216,250	89872	100	4	<i>OR4C11, OR4C6, OR4P4, OR4S2</i>		0,000	Comum	Comum***
84.1T	11q13.1	64,435,049	64,466,191	31143	0	4	<i>ATG2A, C11orf85, GPHA2, PPP2R5B</i>		0,307	NR	NR
58.1T, 65.1T	12p13.31	9,492,374	9,571,161	78788	100	0	-		0,000	Comum***	Comum***
61.1T	14q32.33**	105,598,425	105,651,652	53228	100	2	<i>BC042994, abParts</i>		0,000	Comum	Comum***
168T	14q32.33**	105,852,683	105,889,396	36714	100	2	<i>Z49973, abParts</i>		0,000	Comum	Comum***
27.1T	15q11.2	18,717,320	18,880,586	163267	100	3	<i>CR622584, HERC2P3, LOC646096</i>		0,000	Comum	Comum***
53T	15q14	32,489,895	32,630,876	140982	100	3	<i>DQ570464, GOLGA8A, GOLGA8B</i>	<i>hsa-mir-1233</i>	0,000	Comum	Comum***
53T* , 61.1T*	2p22.3	34,548,116	34,588,943	40828	100	0	-		0,000	Comum***	Comum***
168T, 2.1T* ,	22q11.23	22,672,813	22,728,622	55810	100	4	<i>GSTT1, GSTTP1, GSTTP2, LOC391322</i>		0,000	Comum***	Comum***
53T* , 61,1T											
72.1T	22q11.23	22,693,974	22,728,622	34649	100	3	<i>GSTT1, GSTTP2, LOC391322</i>		0,000	Comum***	Comum***
27.1T* , 72.1T	3q26.1	163,987,310	164,112,820	125511	100	1	<i>BC073807</i>		0,000	Comum***	Comum***
72.1T	3p14.2	61,898,827	62,138,262	239436	1,922860066	2	<i>ID2B, PTPRG</i>		0,000	Comum***	NR
72.1T	4p14	37,687,940	37,787,496	99557	0	1	<i>TBC1D1</i>		0,000	NR	NR

Amostras	Região	Start	Stop	Tamanho (pb)	Cobertura por CNV (%) [#]	Nº genes	Genes	miRNAs	p-valor	Comparação DGV	Comparação REF
27.1T* , 58.1T	4q13.2	68,990,434	69,405,506	415073	100	3	<i>TMPRSS11E, UGT2B15, UGT2B17</i>		0,000	Comum***	Comum***
168T	5p15.33**	794,205	889,443	95239	100	1	<i>ZDHHC11</i>		0,000	Comum***	Comum***
229T	5q33.1	150,152,512	150,205,496	52985	100	2	<i>C5orf62, MST150</i>		0,000	Comum***	NR
207T	5q11.2	58,048,956	58,078,413	29458	0	1	<i>RAB3C</i>		0,855	NR	NR
72.1T	6p25.3	240,983	329,189	88207	100	1	<i>DUSP22</i>		0,000	Comum	Comum***
207T	6q27	166,884,263	166,923,286	39024	6,040027676	1	<i>RPS6KA2</i>		0,729	Comum***	NR
14.1T	6p21.33	29,956,856	30,015,694	58839	100	8	<i>AK097625, BC035647, HCG2P7, HCG4B, HCG4P6, HLA-A, HLA-A*0226, HLA-H</i>		0,000	Comum***	Comum***
339T	6p21.32	32,553,729	32,617,603	63875	100	2	<i>HLA-DRB1, HLA-DRB5</i>		0,000	Comum***	Comum***
72.1T	6p21.32**	32,573,363	32,640,289	66927	100	3	<i>HLA-DRB1, HLA-DRB5, HLA-DRB6</i>		0,000	Comum***	Comum***
27.1T* , 61.1T*	6q14.1	79,025,925	79,091,012	65088	100	0	-		0,000	Comum***	Comum***
58.1T* , 65.1T* , 72.1T* , 74.1T*	8p11.23 - p11.22	39,349,089	39,502,789	153701	100	3	<i>ADAM3A, ADAM5P, tMDC</i>		0,000	Comum***	Comum***
72.1T	9p23	14,008,762	14,048,662	39901	4,912280702	0	-		0,000	Comum***	NR

Em **negrito** estão destacadas as regiões presentes em mais de uma amostra tumoral. * Alterações presentes no tumor e sangue do mesmo indivíduo; **Regiões alteradas presentes em apenas uma amostra tumoral, mas também encontradas nas amostras de sangue; ***Cobertura parcial da região em relação ao banco avaliado; **NR**: CNA nova rara; **R**: CNA rara. [#]Cobertura por CNV identificada no banco de dados do DGV, pelo software Nexus 6.0; Nd: Não determinado.

4.6.2 Análise das alterações compartilhadas nas amostras pareadas de cada indivíduo

Os casos pareados (N e T) do mesmo paciente foram avaliados para a presença de alterações genômicas em comum. As alterações encontradas foram ainda comparadas com os bancos de dados do DGV e REF, para se determinar quais eram raras ou novas raras e, assim, de relevância para o presente estudo. O resultado desta análise é mostrado na Tabela 18.

Onze alterações foram classificadas como raras ou novas raras pela comparação com os dois bancos (DGV e REF). Entre essas, a variação nova rara mapeada em 8q22.3 possui um sítio frágil já descrito. As demais variações estão mapeadas em regiões próximas a outros sítios frágeis também já descritos, na sua maioria sítios comuns.

Tabela 18 - Resultado da comparação das alterações genômicas nas amostras pareadas normais e tumorais do mesmo paciente.

Caso (NxT)	Região	Início	Término	Evento*	Nº genes	miRNAs	Tamanho (pb)	p-valor	Cobertura por CNV (%)	Comparação DGV	Comparação REF	Genes (raras e novas raras)
2.1	1p31.1	72,537,679	72,585,332	Perda	0	0	47653	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	3p12.3	75,822,265	75,947,629	Perda	2	0	125364	1,000	100,0	Comum***	NR	MIR4273, ZNF717
	22q11.23	22,672,813	22,728,622	Perda	4	0	55809	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	Xq22.2	103,063,604	103,233,199	Ganho	7	0	169595	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
14.1	1q21.1	147,338,124	147,442,367	Perda	1	0	104243	1,000	100,0	Comum***	Comum	-
	6p21.33	29,956,856	29,988,609	Perda	5	0	31753	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	14q11.1 - q11.2	18,446,762	19,490,547	Perda	28	0	1043785	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	15q11.2	19,212,123	19,839,771	Ganho	14	0	627648	1,000	100,0	Comum	Comum***	-
	15q11.2	19,938,622	20,036,197	Ganho	4	hsa-mir-1268	97575	1,000	100,0	Comum	Comum	-
26.1	1p31.1	72,537,679	72,585,332	Ganho	0	0	47653	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	2p11.2	89,630,201	89,707,031	Perda	1	0	76830	1,000	100,0	Comum	Comum	-
	3q26.1	163,987,310	164,112,820	Perda	1	0	125510	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
27.1	1p31.1	72,537,679	72,585,332	Perda	0	0	47653	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	1q21.1	147,378,121	147,483,260	Perda	1	0	105139	1,000	100,0	Comum***	Comum	-
	3q26.1	163,987,310	164,112,820	Perda	1	0	125510	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	4q13.2	68,990,434	69,405,506	Perda	3	0	415072	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	5p15.2	12,635,541	12,731,302	Perda	3	0	95761	1,000	82,4	Comum***	NR	TAG, AY328033, AY330599
	6q14.1	79,025,925	79,091,012	Perda	0	0	65087	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	7q31.1	110,738,392	110,886,056	Perda	1	0	147664	1,000	100,0	Comum***	Comum	-
	12p13.31	9,492,374	9,615,714	Ganho	1	0	123340	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	15q11.2	18,717,320	20,188,556	Perda	37	hsa-mir-1268	1471236	1,000	100,0	Comum	Comum***	-

27.1 e 27.2	5p15.2	12,635,541	12,731,302	Perda	3	0	95761	1,000	82,4	Comum***	NR	TAG, AY328033, AY330599
	6q14.1	79,025,925	79,091,012	Perda	0	0	65087	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	7q31.1	110,738,392	110,886,056	Perda	1	0	147664	1,000	100,0	Comum***	Comum	-
	12p13.31	9,492,374	9,571,161	Ganho	0	0	78787	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	15q11.2	19,138,701	19,326,398	Perda	7	0	187697	1,000	100,0	Comum	Comum	-
51.1	2q37.3	242,507,945	242,951,149	Perda	4	0	443204	1,000	54,9	Comum***	Comum***	-
	15q11.2	18,571,743	19,839,771	Ganho	32	0	1268028	1,000	100,0	Comum	Comum***	-
	16p11.2	32,539,907	33,603,561	Ganho	9	0	1063654	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
53	2p22.3	34,548,116	34,588,943	Perda	0	0	40827	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	3q26.1	163,987,310	164,112,820	Ganho	1	0	125510	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	8p11.23	39,362,581	39,487,965	Ganho	3	0	125384	1,000	100,0	Comum***	Comum	-
	8q22.3	103,258,066	103,340,652	Ganho	5	0	82586	1,000	0,0	NR	NR	RRM2B, p53R2, AK095151, KIAA0896, UBR5
	17p11.2	17,643,728	17,666,103	Perda	5	MIR33B	22375	1,000	100,0	Comum	NR	RAI1, SMCR5, SREBP-1, SREBP-1a (delta), SREBF1
	19p13.3	4,756,729	4,843,327	Perda	4	0	86598	1,000	17,5	Comum***	NR	TICAM1, M6PRBP1, PLIN3, ARRDC5
	22q11.23	22,672,813	22,728,622	Perda	4	0	55809	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
Xp22.33	1,690,222	1,707,512	Ganho	1	0	17290	1,000	100,0	Comum	NR	ASMT	
Xq28	154,043,625	154,085,945	Perda	0	0	42320	1,000	100,0	Comum	Comum***	-	
58.1	4q13.2	68,990,434	69,405,506	Perda	3	0	415072	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	8p11.23 - p11.22	39,349,089	39,502,789	Perda	3	0	153700	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	12p13.31	9,492,374	9,571,161	Perda	0	0	78787	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	14q11.1 - q11.2	18,446,762	19,426,991	Ganho	26	0	980229	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	22q13.31	45,071,974	45,236,241	Ganho	5	0	164267	1,000	100,0	R	NR	GTSE1, dJ1163J1.4, MTU1, TRMU, CELSR1

	22q13.31	45,898,311	46,014,117	Ganho	1	0	115806	1,000	78,5	Comum***	NR	<i>TBC1D22A</i>
	22q13.31	46,560,023	46,802,886	Ganho	1	0	242863	1,000	63,4	Comum***	NR	<i>AK093107</i>
61.1	1p31.1	72,537,679	72,585,332	Perda	0	0	47653	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	2p22.3	34,548,116	34,588,943	Perda	0	0	40827	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	3q12.2	101,827,251	101,906,647	Ganho	1	0	79396	1,000	100,0	Comum	NR	<i>GPR128</i>
	6q14.1	79,025,925	79,091,012	Perda	0	0	65087	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	22q11.23	22,672,813	22,706,737	Perda	3	0	33924	1,000	100,0	Comum	Comum***	-
												-
65.1	8p11.23 - p11.22	39,349,089	39,502,789	Perda	3	0	153700	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	15q11.2	18,717,320	18,996,809	Perda	4	0	279489	1,000	100,0	Comum	Comum***	-
	21q21.1	21,342,424	21,371,830	Perda	1	0	29406	1,000	100,0	Comum	NR	<i>NCAM2</i>
66	1p31.1	72,537,679	72,585,332	Ganho	0	0	47653	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	1q44	246,781,814	246,863,600	Perda	4	0	81786	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	3q29	196,863,269	196,942,795	Perda	9	<i>hsa-mir-570</i>	79526	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	6p25.3	240,983	329,189	Perda	1	0	88206	1,000	100,0	Comum	Comum***	-
	8p22	15,989,447	16,070,028	Perda	1	0	80581	1,000	100,0	Comum***	NR	<i>MSR1</i>
	8p11.23	39,373,309	39,445,762	Ganho	3	0	72453	1,000	100,0	Comum	Comum	-
	11q11	55,126,379	55,216,250	Perda	4	0	89871	1,000	100,0	Comum	Comum***	-
	12p13.31	9,492,374	9,597,208	Perda	0	0	104834	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	15q11.2	18,783,197	19,999,362	Ganho	34	0	1216165	1,000	100,0	Comum	Comum***	-
	Xq28	154,781,766	154,865,290	Perda	1	0	83524	1,000	98,3	Comum***	NR	<i>BMX</i>
	Yq11.222 - q11.223	21,234,866	21,484,239	Perda	1	0	249373	1,000	46,7	Comum***	NR	<i>RPS4Y2</i>
67.1	1p33	49,511,949	49,598,027	Perda	1	0	86078	1,000	0,0	NR	NR	<i>AGBL4</i>
	2q37.3	242,507,945	242,951,149	Perda	4	0	443204	1,000	54,9	Comum***	Comum***	-
	3p26.2	4,145,068	4,192,897	Perda	1	0	47829	1,000	100,0	Comum***	Comum	-
	11q11	55,162,806	55,216,250	Ganho	3	0	53444	1,000	100,0	Comum	Comum***	-
	15q11.2	18,717,320	19,224,573	Ganho	16	0	507253	1,000	100,0	Comum	Comum***	-

72.1	3q26.1	163,987,310	164,112,820	Perda	1	0	125510	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	4p14	37,687,940	37,787,496	Perda	1	0	99556	1,000	0,0	NR	NR	<i>TBC1D1</i>
	4q12	54,194,814	54,503,104	Perda	2	0	308290	1,000	23,4	Comum***	NR	<i>LNx1, UNQ574</i>
	6p25.3	240,983	315,594	Perda	1	0	74611	1,000	100,0	Comum	Comum	-
	6p21.1	42,398,038	42,499,523	Ganho	2	0	101485	1,000	0,0	NR	NR	<i>TRERF1, RAPA</i>
	7q22.1	100,577,394	100,667,677	Ganho	9	0	90283	1,000	100,0	Comum***	NR	<i>AP1S1, MIR4653, VGF, C7orf52, AX747364, MOGAT3, PLOD3, ZNHIT1, CLDN15</i>
	8p23.1	7,041,803	7,980,956	Perda	39	0	939153	1,000	100,0	Comum	Comum***	-
	8p11.23	39,349,089	39,445,762	Perda	3	0	96673	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	9p21.3	21,000,493	21,100,569	Perda	2	0	100076	1,000	1,8	Comum***	NR	<i>PTPLAD2, IFNB1</i>
	11q24.2	126,165,618	126,284,265	Perda	2	0	118647	1,000	4,8	Comum***	NR	<i>KIRREL3, KIAA1867</i>
	14q11.2	20,639,895	20,761,336	Ganho	7	0	121441	1,000	28,4	Comum***	NR	<i>ZNF219, C14orf176, OR5AU1, AK092333, LOC283624, HNRPC, HNRNPC</i>
	14q13.2	34,451,057	34,507,513	Ganho	1	0	56456	1,000	100,0	Comum***	NR	<i>C14orf19</i>
	14q24.3	74,680,009	74,817,154	Ganho	3	0	137145	1,000	6,1	Comum***	NR	<i>TMED10, DKFZp451D084, FOS</i>
	16p11.2	32,500,016	33,286,122	Perda	9	0	786106	1,000	100,0	Comum	Comum	-
	18q12.2	32,595,613	32,655,963	Perda	2	0	60350	1,000	100,0	Comum***	NR	<i>KIAA1695, C18orf10</i>
	18q23	74,641,020	75,010,050	Perda	3	0	369030	1,000	35,4	Comum***	NR	<i>SALL3, ATP9B, DKFZp434A042</i>
	18q23	75,189,671	75,312,456	Perda	3	0	122785	1,000	54,6	Comum***	NR	<i>ATP9B, DKFZp434A042, NFATC1</i>
	20q13.33	60,680,685	60,837,931	Perda	5	0	157246	1,000	100,0	Comum***	NR	<i>SLCO4A1, LOC100127888, LOC100135777, OATP-E, NTSR1</i>

74.1	1p11.2	120,956,526	120,982,693	Perda	2	0	26167	1,000	100,0	Comum	NR	<i>EMBP1, LOC647121</i>
	1q44	244,881,940	245,156,193	Ganho	8	0	274253	1,000	13,2	Comum***	NR	<i>C1orf71, CNST, AK026365, SCCPDH, AK022825, LOC149134, elys, AHCTF1</i>
	3p14.1	66,073,567	66,543,737	Perda	2	0	470170	1,000	0,1	Comum***	NR	<i>SLC25A26, LRIG1</i>
	3q24	146,754,451	147,181,157	Ganho	0	0	426706	1,000	52,8	Comum***	NR	-
	3q26.1	164,564,179	165,220,353	Ganho	0	0	656174	1,000	100,0	Comum***	NR	-
	3q26.1	166,230,548	166,385,066	Ganho	1	0	154518	1,000	1,0	Comum***	Comum***	
	3q26.1	166,660,235	167,021,256	Ganho	2	0	361021	1,000	29,7	Comum***	NR	<i>CR612557, BCHE</i>
	3q26.31	176,456,502	176,510,635	Ganho	1	0	54133	1,000	0,0	NR	NR	<i>NAALADL2</i>
	8p11.23 - p11.22	39,349,089	39,502,789	Perda	3	0	153700	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	15q11.2	18,841,966	20,351,308	Perda	45	<i>hsa-mir-1268</i>	1509342	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	15q22.2	60,129,133	60,209,265	Perda	4	0	80132	1,000	0,0	NR	NR	<i>VPS13C, BC028842, FAM148A, C2CD4A</i>
	15q22.2	60,741,137	60,915,534	Perda	4	<i>MIR190</i>	174397	1,000	0,5	Comum***	NR	<i>TLN2, KIAA0320, MIR190, AK125516</i>
	15q23	69,029,570	69,546,551	Perda	8	0	516981	1,000	44,7	Comum***	NR	<i>LRRC49, CT62, LOC196993, AF401215, BC043587, LOC645296, THSD4, UNQ9334</i>
	15q24.1	70,652,370	70,669,625	Perda	2	<i>MIR630</i>	17255	1,000	100,0	R	NR	<i>ARIH1, MIR630</i>
	15q24.1	71,173,594	71,334,424	Perda	1	0	160830	1,000	0,2	Comum***	NR	<i>NEO1</i>
	15q24.3	74,659,476	74,690,789	Perda	2	0	31313	1,000	100,0	Comum***	NR	<i>SCAPER, KIAA1454</i>

	16q22.1	66,346,378	66,623,121	Ganho	21	0	276743	1,000	17,7	Comum***	NR	RANBP10, TSNAXIP1, CENPT, THAP11, NUTF2, CR621108, EDC4, AK125818, NRN1L, PSKH1, CTRL, PSMB10, LCAT, AK310027, SLC12A4, KCC1, DPEP3, DPEP2, UNQ284, DDX28, DUS2L
	16q24.1	83,219,608	83,592,937	Ganho	5	0	373329	1,000	4,2	Comum***	NR	KLHL36, AK057887, USP10, CRISPLD2, ZDHHC7
	16q24.3	87,817,956	88,283,196	Ganho	19	0	465240	1,000	68,9	Comum***	NR	ZNF778, AX747440, AX748291, ANKRD11, LOC100287036, ANKRD11, AK096064, AK097694, SPG7, CMAR, SNORD68, OK/SW-cl.46, RPL13, CPNE7, DPEP1, CHMP1A, C16orf55, BC031657, CDK10
	17q12	31,468,082	31,695,581	Ganho	19	0	227499	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	18p11.32	1,900,040	1,977,424	Perda	0	0	77384	1,000	100,0	Comum***	NR	-
	18q21.31	52,640,799	52,834,453	Perda	2	0	193654	1,000	54,4	Comum***	NR	KIAA0541, WDR7
	19q13.11	39,400,022	39,465,234	Perda	2	0	65212	1,000	50,6	Comum***	NR	LSM14A, KIAA0355
207	1p31.1	72,537,679	72,585,332	Perda	0	0	47653	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	1q32.2	206,294,711	206,619,987	Perda	1	0	325276	1,000	68,4	Comum***	NR	PLXNA2
	2p11.1	91,129,939	91,270,370	Ganho	3	0	140431	1,000	100,0	Comum***	Comum	-
	2q37.3	239,775,889	239,871,491	Perda	3	0	95602	1,000	100,0	Comum***	NR	MGC16025, KIAA0288, HDAC4
	2q37.3	240,964,430	241,159,375	Perda	7	hsa-mir-149	194945	1,000	77,6	Comum***	NR	CR598098, GPC1, PP14571, MIR149, ANKMY1, DUSP28, RNPEPL1
	3q23	141,750,380	141,858,067	Perda	1	0	107687	1,000	100,0	Comum***	NR	CLSTN2

4p14	39,711,387	39,838,467	Ganho	3	0	127080	1,000	13,7	Comum***	NR	LOC344967, KIAA1413, N4BP2
5q31.1	135,087,147	135,289,367	Perda	3	0	202220	1,000	73,7	Comum***	NR	LOC153328, SLC25A48, IL9
7q32.3	131,348,452	131,572,634	Perda	2	0	224182	1,000	95,5	Comum***	NR	KIAA1550, PLXNA4
8p11.23	39,373,309	39,457,130	Ganho	3	0	83821	1,000	100,0	Comum	Comum	-
8q24.3	142,496,683	142,793,980	Perda	4	0	297297	1,000	72,5	Comum***	NR	AK311257, PTP4A3, hPRL-3, FLJ43860
8q24.3	143,451,537	143,579,130	Perda	2	0	127593	1,000	93,1	Comum***	NR	TSNARE1, BAI1
9p11.2	43,626,920	43,987,912	Ganho	2	0	360992	1,000	100,0	Comum***	Comum	-
10q21.3	70,007,305	70,071,059	Ganho	1	0	63754	1,000	0,0	NR	NR	TET1
10q26.3	130,974,193	131,467,488	Perda	1	0	493295	1,000	24,9	Comum***	NR	MGMT
11p15.5	2,187,853	2,385,828	Perda	8	0	197975	1,000	62,3	Comum***	NR	ASCL2, C11orf21, TSPAN32, TSSC6, BC019904, CD81, TSSC4, TRPM5
11p15.4	4,934,242	4,968,748	Perda	1	0	34506	1,000	100,0	Comum***	NR	MMP26
11q25	133,923,109	134,011,994	Perda	0	0	88885	1,000	100,0	Comum***	NR	-
12p13.33	0	107,671	Perda	2	0	107671	1,000	100,0	Comum***	NR	FAM138D, IQSEC3
12p13.33	2,332,146	2,407,800	Perda	1	0	75654	1,000	0,6	Comum***	NR	-
12p13.31	7,795,471	8,013,873	Ganho	7	0	218402	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
12p13.31	9,492,374	9,615,714	Ganho	1	0	123340	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
14q32.31	100,594,512	100,619,916	Perda	13	MIR154, MIR496, MIR377, MIR541, MIR409, MIR412, MIR369, MIR410, MIR656	25404	1,000	35,8	R	NR	MIR154, DJ087804, MIR496, MIR377, DJ442752, MIR541, MIR409, MIR412, MIR369, MIR410, MIR656, AK094562, BC148240
15q11.1 - q11.2	18,362,555	20,188,556	Ganho	40	hsa-mir-1268	1826001	1,000	100,0	Comum***	Comum***	
15q13.3	30,708,364	30,889,444	Ganho	7	0	181080	1,000	100,0	Comum***	NR	ARHGAP11A, SCG5, C15orf45, AX747968, DRM, GREM1, FMN1
15q25.3	86,468,754	86,540,533	Perda	1	0	71779	1,000	2,0	Comum***	NR	NTRK3

	16p11.2	32,120,881	33,334,549	Ganho	15	0	1213668	1,000	100,0	Comum	Comum***	-
	16q23.3	81,062,979	81,290,591	Perda	1	0	227612	1,000	8,5	Comum***	NR	CDH13
	18q11.1	16,100,000	17,105,581	Ganho	3	0	1005581	1,000	1,1	Comum***	NR	GREB1L
	20q11.21	29,374,470	29,497,500	Ganho	6	0	123030	1,000	0,0	NR	Comum***	-
	21q22.3	46,115,505	46,236,637	Perda	2	0	121132	1,000	32,0	Comum***	NR	PCBP3, COL6A1
	Xp11.4	39,020,364	39,188,759	Perda	2	0	168395	1,000	0,0	NR	NR	AK093678, LOC286442
229	1p31.1	72,537,679	72,585,332	Perda	0	0	47653	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	5q33.1	150,161,369	150,205,496	Perda	0	0	44127	1,000	100,0	Comum***	NR	-
	6p21.33	29,956,856	30,015,694	Perda	8	0	58838	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	12p13.31	9,492,374	9,615,714	Ganho	1	0	123340	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	15q11.2	19,919,008	20,188,556	Perda	5	hsa-mir-1268	269548	1,000	100,0	Comum	Comum***	-
	19p12	20,393,129	20,502,123	Perda	2	0	108994	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	20p12.1	14,764,679	14,828,249	Perda	4	0	63570	1,000	100,0	Comum***	NR	MACROD2, MACROD2-AS1, CR596518, MACROD2
	Xp22.33	2,379,683	2,414,728	Perda	2	0	35045	1,000	100,0	Comum***	NR	DHRX, ZBED1
339	1q21.1	147,363,814	147,430,071	Perda	1	0	66257	1,000	100,0	Comum***	Comum	-
	8p23.1	7,191,930	7,980,956	Perda	32	0	789026	1,000	100,0	Comum	Comum	-
	15q11.2	19,482,222	20,051,399	Ganho	12	hsa-mir-1268	569177	1,000	100,0	Comum	Comum***	-
	16p11.2	32,430,247	33,525,433	Perda	9	0	1095186	1,000	100,0	Comum	Comum***	-
84.1	12p13.31	9,492,374	9,571,161	Perda	0	0	78787	1,000	100,0	Comum***	Comum***	-
	15q11.2	19,412,367	20,051,399	Ganho	15	hsa-mir-1268	639032	1,000	100,0	Comum	Comum***	-
	17p12	14,046,699	14,173,409	Perda	4	0	126710	1,000	100,0	Comum***	NR	COX10, CDRT15, MGC12916, HS3ST3B1

*Perda: perda heterozigota; **NR**: CNA nova rara; **R**: CNA rara. **Cobertura por CNV identificada no banco de dados do DGV, pelo software Nexus 6.0;
***Cobertura parcial da região em relação ao banco avaliado.

5 DISCUSSÃO

Os fatores de risco mais importantes para o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CCECP) são o consumo de álcool e tabaco, sendo relatados efeitos sinérgicos (LEEMANS et al. 2011). Entre os 102 pacientes de nossa casuística, 50% fumavam e bebiam, 17,6% não fumavam e 14,7% não bebiam.

A infecção pelo HPV também ocupa lugar de destaque no desenvolvimento desses tumores, principalmente nos carcinomas de orofaringe (NAIDU e WRIGHT 2011), apesar de ser detectado também em um subconjunto de carcinomas de laringe (24%) e de cavidade oral (23%) (KREIMER et al. 2004; LAJER e VON BUCHWALD 2010; D'SOUZA e DEMPSEY 2011; KAMINAGAKURA et al. 2012). Neste estudo, entre as 64 amostras de CCECP avaliadas quanto à infecção pelo HPV, cinco (7,8%) foram positivas apenas para o HPV16. Quatro destes pacientes apresentaram carcinomas de orofaringe (28,6% dos casos). Dados em literatura apontam que 20 a 85% dos casos de orofaringe apresentam infecção pelo HPV16 (SHANESMITH et al. 2011). Assim, a infecção pelo HPV16 pode ser considerada como um importante fator de risco para o desenvolvimento da doença em pacientes brasileiros.

Os fatores etiológicos conhecidos não explicam 5 a 10% dos casos de CCECP, sendo que algumas doenças herdadas (por exemplo, anemia de Fanconi) e outros fatores de suscetibilidade genética, podem influenciar na

predisposição ao CCECP (CLOOS et al. 1996; KUTLER et al. 2003; HOPKINS et al. 2008). Buscando por um gene candidato à predisposição familiar em cânceres de cabeça e pescoço e de acordo com estudos prévios do grupo (POLI-FREDERICO et al. 2000; REIS et al. 2002a e b; BÉRGAMO et al. 2005), 75 amostras de tumor de pacientes com CCECP foram avaliadas pela metodologia de qPCR em tempo real, sendo que 43 destes casos (57,3%) apresentaram perdas para o fragmento genômico analisado do *PHF21B*. Entre estes 43 casos, 36 apresentavam história de câncer na família, sendo que 22/36 casos (61,1%) tinham história de câncer em 1º grau ($P=0,049$). A associação com história familiar em 1º grau foi uma evidência inicial do envolvimento deste gene na predisposição hereditária a tumores de cabeça e pescoço.

Para confirmar essa hipótese, 49 amostras pareadas (N e T), foram avaliadas pela qPCR em tempo real. Cinco das 49 amostras (10,2%) apresentaram perdas para o fragmento genômico do *PHF21B*. Entre os cinco casos com perda, um (caso 75) apresentava história familiar de câncer de CCECP (boca) em um parente de segundo grau (tio). Um caso não tinha história de câncer na família até a última avaliação (Julho de 2012) e para os outros três foi perdido o seguimento e, infelizmente, essa informação não pode ser confirmada. Entre os cinco casos com perda do gene, um paciente com carcinomas de orofaringe era positivo para o HPV16 (caso BT1475).

Estes resultados revelaram que aproximadamente 10% dos casos apresentaram perdas constitutivas para o *PHF21B*. Utilizando o banco de dados do DGV, foi verificado que as CNVs descritas para este gene não

coincidem com a região analisada. Baseados na hipótese do gene *PHF21B* ser um supressor tumoral, o achado de perdas genômicas poderia ser considerado como o primeiro evento para a sua inativação.

O gene *PHF21B* é também conhecido como *PHF4*, *BHC80L* e *FLJ34161* e codifica uma proteína que possui um domínio *PHD finger*, interagindo seletivamente e não covalentemente a qualquer íon metálico, mas preferencialmente a íons de zinco (AmiGO, The Gene Ontology). Vários domínios PHD foram associados com proteínas contendo módulos de ligação a histona H3 metiladas nos resíduos de lisina (BIENZ 2006; MELLOR 2006; LI H et al. 2007; MUSCO e PETERSON 2008). A proteína BHC80/PHF21A foi identificada como parte de um complexo BRAF-HDAC (BHC) que possui um importante papel na repressão de genes tecido-específico (IWASE et al. 2004).

As histonas centrais dos nucleossomos são alvos para várias formas de modificação em seus finais N-terminal. Entre as modificações estão a acetilação de lisinas, a metilação de lisinas e argininas, a ubiquitinação de lisinas e outras modificações (KOUZARIDES 2007). A metilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4) ou da lisina 36 (H3K36) estão geralmente associadas com a ativação transcricional, enquanto que a metilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9) ou da lisina 27 (H3K27) causam silenciamento gênico. Como esse código de histonas é traduzido para uma atividade associada à cromatina é um questionamento que está sob investigações ativas (RUTHENBURG et al. 2007). A princípio, as modificações nas histonas alteram a acessibilidade à cromatina pela neutralização da carga das

histonas (acetilação) ou podem servir ainda como sítio de ligação a proteínas associadas à cromatina. Essas proteínas são recrutadas por seus domínios específicos (MUSCO e PETERSON 2008).

Acredita-se que os domínios *PHD fingers* possam interagir simultaneamente com os nucleossomos e proteínas específicas em multi-complexos, efetuando essa leitura do código de histonas. Desta forma, teriam um papel fundamental na regulação epigenética da expressão gênica (MELLOR 2006). BAKER et al. (2008) mostraram que mutantes patológicos *PHD fingers* em genes como *ATRX*, *NSD1*, *RAG2* e *ING*, desencadeiam diferentes doenças humanas as quais incluem doenças neurológicas e do desenvolvimento, câncer e distúrbios imunológicos.

A perda da função de ligação a histonas de muitas proteínas *PHD fingers* devido a deleções, translocações, alterações na estrutura ou mutações nos sítios de ligação, impossibilita o recrutamento dessas proteínas e dos complexos associados ao remodelamento da cromatina no nucleossomo, levando à perda da regulação da transcrição, recombinação e reparo e à perda da homeostase celular, o que pode contribuir para o desenvolvimento da doença (MUSSELMAN e KUTATELADZE 2009).

Na tentativa de se caracterizar um segundo evento para a inativação do gene supressor tumoral (KNUDSON 1971) foi realizada a análise dos éxons 3, 6, 7, 8, 9 e 11 por sequenciamento direto, mas essa análise não revelou mutações nos éxons estudados do gene *PHF21B*. Entre os 26 pacientes avaliados por sequenciamento de Sanger (amostras pareadas N e T), 10 apresentavam história familiar de câncer, sendo que 9/10

apresentavam história de câncer em parentes de 1º grau. Estes resultados revelaram que para as regiões investigadas não havia mutações que poderiam ser consideradas como um evento associado com a inativação do candidato a supressor tumoral *PHF21B*.

Originalmente os genes supressores de tumor (GST) agem de forma recessiva e devem ser inativados e contribuindo para a iniciação e progressão tumoral. Entretanto, vários GST, como o *TP53* e o *PTEN*, apresentam haploinsuficiência como consequência da dose-dependência. A haploinsuficiência é verificada quando o alelo selvagem remanescente, após a alteração de perda de função do outro alelo, não é suficiente para desempenhar a função celular normal. Ou seja, um evento de perda de função de cópia única pode ser suficiente para causar o fenótipo quando ambas as cópias são necessárias para a função normal da proteína (BERGER e PANDOLFI 2011), caracterizando a hipótese de um evento (YEUNG et al. 2008).

O impacto da haploinsuficiência no câncer tem sido apenas recentemente avaliado, mas várias síndromes de desenvolvimento humano são causadas por perda cromossômica heterozigota parcial, como a síndrome de DiGeorge caracterizada por monossomia parcial do cromossomo 22 (FISHER e SCAMBLER 1994).

Embora não se possa excluir a presença de mutações nos demais éxons não avaliados, podem ocorrer outros mecanismos que levam a inativação de genes supressores tumorais. As vias de inativação gênica podem ser genéticas e epigenéticas. As genéticas incluem a perda gênica

(THIAGALINGAM et al. 2001; WIJNHOVEN et al. 2001), deleções de pares de bases, inserções e substituições (PFEIFER 2000). A perda de heterozigose (LOH) é um termo amplamente utilizado para descrever perdas gênicas, incluindo grandes ou pequenas deleções do gene (ou partes dele), assim como perda com ou sem reduplicação do outro cromossomo, além de eventos de recombinação não recíproca, como a conversão gênica (THIAGALINGAM et al. 2001; WIJNHOVEN et al. 2001).

Mecanismos epigenéticos, como as regulações transcricionais e pós-transcricionais (JONES e LAIRD 1999; BAYLIN e HERMAN 2000; TYCKO e ASHKENAS 2000) também podem levar ao silenciamento de genes. A metilação do promotor do gene e alterações associadas à cromatina são importantes eventos epigenéticos de silenciamento transcricional em células eucariotas (ROBERTSON e WOLFFE 2000). A metilação da citosina-5 também está implicada em vários mecanismos de inativação gênica (CHEN et al. 1998; PFEIFER 2000).

Alterações epigenéticas têm um papel importante na carcinogênese oral pela desregulação da expressão de oncogenes e genes supressores tumorais (ESTELLER 2008; TABY e ISSA 2010). Recentemente, OLIVEIRA et al. (2009) avaliaram as alterações genéticas e epigenéticas durante a progressão da síndrome de câncer gástrico difuso hereditário. A comparação entre os mecanismos de segundo evento em tumores primários e lesões metastáticas demonstrou que os tumores primários apresentam preferencialmente alterações epigenéticas (50%) como único evento, enquanto que as lesões metastáticas apresentam preferencialmente

alterações genéticas, como LOH, concomitantes ou não, com alterações epigenéticas (58,3%; $P=0,0274$). Este estudo ainda demonstrou que não há associação entre o tipo/sítio da mutação na linhagem germinativa de *CDH1* (E-caderina) e o tipo de mecanismo de inativação associado como segundo evento.

Alterações semelhantes associadas a um segundo evento foram relatadas em carcinoma colorretal hereditário. Nestes tumores foram descritas a hipermetilação e LOH no gene *hMLH1* (KUISMANEN et al. 2000; OLLIKAINEN et al. 2007). Também foram relatados eventos de metilação aberrante em 75% dos cânceres de ovário familiares que apresentam LOH para o gene *BRCA1* (PRESS et al. 2008) e em 83% dos casos de FAP (polipose adenomatosa familiar) que apresentam mutações e deleções no gene *APC* (LATCHFORD et al. 2007).

A hipermetilação da região promotora dos genes é uma das características associadas ao silenciamento transcricional e é considerada como um importante mecanismo epigenético implicado na regulação da expressão gênica normal (ESTELLER 2007). Vários estudos têm demonstrado inúmeros genes silenciados pela metilação do DNA em diferentes tipos de câncer (ESTELLER 2008; KULIS e ESTELLER 2010). Em CCECP esporádicos, vários genes como *MGMT*, *CDKN2A*, *DAPK*, *TIMP3*, *CDH1*, *RASSF1*, *CCNA1* e *MLH1* têm sido relatados como associados ao desenvolvimento e progressão do tumor quando metilados, mesmo com frequências de metilação e métodos de análise variáveis para cada um dos genes (SHAW-SMITH et al. 2006; MARTONE et al. 2007;

CARVALHO et al. 2008). WEISS et al. (2011) avaliaram a metilação de promotores gênicos em amostras de CCECP esporádicos e encontraram uma frequência altamente significativa de metilação do promotor dos genes *TCF21* ($P \cong 0.0005$), *CCNA1* ($P \cong 0.016$) e *DAPK1* ($P \cong 0.043$), em relação a amostras controle.

WORSHAM et al. (2010) avaliaram o perfil de metilação da região promotora de 1143 genes associados ao câncer, para realizar uma análise global e imparcial, de regiões metiladas no CCECP. Usando o *Affymetrix whole-genome tiling array*, os autores relataram 231 genes com regiões promotoras metiladas ainda não relatadas em CCECP (após comparação com o banco de dados de metilação no câncer: PubMeth - <http://www.pubmeth.org/>). O gene *PHF21B* não está entre os 231 novos genes com regiões promotoras metiladas e também não há nenhuma correspondência com o banco de dados PubMeth.

A hipótese de alteração epigenética como um segundo evento envolvido na predisposição a cânceres de cabeça e pescoço é corroborada pela estrutura do gene *PHF21B*, que possui uma ilha de CpG com 3336 pb (CpG *island* 273). Esta ilha se inicia na região promotora do gene e se estende pela 5'UTR, éxons 1, 2 e 2853 nucleotídeos *downstream*. Esse fragmento contém 273 dinucleotídeos CpG, conteúdo de C ou G de 55,4% e uma razão CpG observada/CpG esperada de 1,07, o que a qualifica como uma ilha de CpG segundo os critérios aceitos (GARDINER-GARDEN e FROMMER 1987).

A análise de metilação de alta resolução (do inglês, HRM) é uma nova

ferramenta para a análise de promotores gênicos e seu perfil de metilação (WOJDACZ et al. 2008) e foi utilizada no presente estudo para avaliar o perfil de metilação da ilha CpG 273 nas linhagens celulares derivadas de CCECP e nas amostras de DNA dos tumores e do sangue dos pacientes com CCECP, previamente tratadas com bissulfito de sódio. Esse tipo de análise não permite a obtenção de informações detalhadas sobre a metilação de uma única citosina na sequência de interesse, mas é capaz de distinguir amostras completamente metiladas daquelas nada ou parcialmente metiladas (ZHANG et al. 2010). A estimativa dos níveis de metilação na análise de HRM é feita com base na comparação dos perfis de metilação entre as amostras e os padrões com porcentagem conhecida de metilação (pontos da curva feitos a partir de razões entre o DNA controle metilado e o DNA controle não metilado).

KRISTENSEN et al. (2009) consideraram valores de metilação entre 0,1-1% como sendo de baixo nível; valores de 1-10% como sendo de nível intermediário e valores de 10-100% como sendo de alto nível. Esses valores foram obtidos a partir das diluições (realizadas com DNAs metilado e não metilado) para os pontos da curva-padrão, utilizada na reação de HRM para comparação com as amostras avaliadas. Seguindo esse padrão e os pontos da curva estabelecidos para o presente estudo, os valores de metilação de 2,5%-5% foram considerados como de baixo nível; os valores de 5%-10% como de nível intermediário e os valores de 10%-100% como de alto nível.

Baseados nestes valores, a análise de HRM das linhagens celulares revelou que as mesmas não apresentam metilação da ilha CpG avaliada. E

assim como as linhagens celulares, as amostras de sangue dos pacientes e indivíduos controle (saudáveis) também não apresentaram metilação da região da ilha CpG no promotor do gene. Entretanto, em 13 amostras tumorais foram observados níveis variáveis de metilação (2,5% a 25%) na região inicial da ilha 273. Entre estes 13 casos, cinco apresentaram história de câncer em parentes de 1º grau (casos 207, 229, 27.1, 67.1 e 353) e sete pacientes preenchem pelo menos um dos critérios adotados no estudo. Destes 13 casos com níveis alterados de metilação, oito apresentaram perda para o gene *PHF21B* na análise de qPCR nas amostras tumorais (casos 207, 229, 326, 353, 578, 579, 603 e 27.1) e um caso (579) apresentou perda do gene na análise de qPCR na amostra de sangue e tumor. Isso revela que esses eventos contribuem para a tumorigênese dos carcinomas de cabeça e pescoço, dando evidências de que o gene *PHF21B* é papel de supressor tumoral. Em adição, a perda do gene *PHF21B* no sangue e tumor do paciente 579 e a alteração concomitante da metilação no tumor sugerem o papel deste gene como candidato a predisposição hereditária nos carcinomas de cabeça e pescoço.

Outro caso apresentou perda para o gene *PHF21B* no sangue e no tumor, mas não apresentou metilação (0%) pelo HRM (caso BT1475). O caso BT878 apresentou perda para o gene nas amostras de sangue e tumor, mas não apresentou metilação para a amostra (a amostra de sangue não foi avaliada pelo HRM, por não haver a quantidade suficiente de DNA). Assim, outros mecanismos poderiam estar envolvidos no silenciamento deste suposto supressor tumoral.

Apesar da análise estatística não revelar associação significativa entre a perda do *PHF21B* nos tumores dos pacientes que apresentaram algum nível de metilação pelo HRM ($p=0.666$), nos casos com perda gênica, a metilação da ilha CpG poderia agir como um dos eventos necessários para a inativação da função gênica. ROTHHAMMER e BOSSERHOFF (2007) mostraram que muitos GST não são primariamente inativados por mutação ou deleção, mas por alterações epigenéticas como a metilação de seu promotor. Vários GST sofrem metilação *de novo* e silenciamento em muitos tipos de câncer apesar do conteúdo reduzido de metilação no genoma como um todo (KRISTENSEN et al. 2009). Ademais, eventos anormais de metilação ocorrem no início da tumorigênese e por isso podem ser usados como potenciais marcadores para a detecção precoce do câncer (SHI et al. 2007).

Quatro amostras tumorais (207T, 348T, 578T e 605T) mostraram um padrão indicativo de metilação heterogênea, mostrando picos na curva de *melting* característicos da amplificação de moléculas que diferem em um, dois ou três bases (WORM et al. 2001; CANDILORO et al. 2008). Embora a porcentagem de metilação para essas amostras tenha sido estimada de forma semelhante às demais, a análise de HRM como a aplicada aqui não é indicado para esses casos específicos. CANDILORO et al. (2008) mostraram que o HRM digital possibilita uma análise detalhada da metilação do DNA em amostras com metilação heterogênea complexa, eliminando a necessidade de uma análise por sequenciamento direto. No HRM digital há a amplificação de moléculas únicas pela PCR seguindo diluições limitantes

(VOGELSTEIN e KINZLER 1999; POHL e SHIH 2004), da ordem de 1:1000 a 1:2000 para 10ng/ μ L.

Entre essas quatro amostras, duas (207T e 578T) também apresentaram perda para o gene *PHF21B* pela qPCR, mas as suas respectivas amostras de sangue periférico não apresentaram a mesma perda. Para essas duas amostras a perda e a metilação no tumor parecem ser os dois eventos necessários para a inativação de genes supressores tumorais.

Neste estudo, também foi avaliada a expressão de dois miRNA mapeados em 22q13.31. A descoberta de milhares de genes que produzem transcritos de RNA não codificadores, revelou que a complexidade do câncer é maior do que se esperava. Os miRNAs parecem contribuir para a oncogênese, podendo funcionar como supressores de tumor ou como oncogenes. Assim, as alterações em miRNAs, se herdadas pela linhagem germinativa, podem ser importantes para a predisposição ao câncer por afetar os níveis de expressão de genes supressores tumorais e oncogenes (CALIN e CROCE 2006a).

Baseando-se nessa hipótese e na proximidade do *PHF21B* a dois importantes miRNAs (*hsa-let-7a-3* e *hsa-let-7b*), a expressão relativa desses dois miRNAs foi avaliada em 25 amostras de sangue periférico e 27 amostras tumorais de pacientes com CCECP e sua associação com história familiar de câncer.

A família de miRNAs *let-7* é composta por 13 membros (*let-7a-1*, *7a-2*, *7a-3*, *7b*, *7c*, *7d*, *7e*, *7f-1*, *7f-2*, *7g*, *7i*, *miR-98* e *miR-202*) localizados em

nove cromossomos diferentes e muitos desses membros têm sua expressão desregulada em cânceres humanos (RUBY et al. 2006; ROUSH e SLACK 2008; BOYERINAS et al. 2010). Em mamíferos, os níveis de *let-7* parecem aumentar durante a embriogênese e o desenvolvimento cerebral (THOMSON et al. 2004; THOMSON et al. 2006; WULCZYN et al. 2007). A expressão aumentada desse miR é ainda mantida em vários tecidos adultos (SEMPERE et al. 2004) mas a diminuição dos níveis de *let-7* tem sido observada em muitos cânceres, o que reflete a reversão do processo embrionário que ocorre durante a tumorigênese (PARK et al. 2007). Tem sido relatado que a restauração da expressão normal do *let-7* previne a tumorigênese (JOHNSON et al. 2007; KUMAR et al. 2008). A expressão do *let-7* é regulada em vários estágios da sua biogênese e é dependente do tipo celular. O *let-7* regula muitos fatores transcricionais que têm papéis importantes na regulação do ciclo celular, diferenciação e apoptose. Muitos dos fatores que controlam a expressão do *let-7* formam circuitos regulatórios sendo regulados por tal expressão. Os genes *LIN28*, *POU5F1*, *SOX2*, *NANOG*, *TLX1*, *HMGA2*, *MYC* e *IMPs* são conhecidos por formar tais circuitos (BARH et al. 2010).

A expressão do *let-7* está diminuída em cânceres de mama, agindo na transcrição de genes alvos como: *ANG*, *CCND1*, *CCND2*, *CDK4*, *CDK6*, *CYP19A1*, *FGF11*, *HMGA2*, *HMGB2*, *IGF1*, *MMP2*, *MMP8*, *MYC*, *H-RAS*, *RB1*, *TGFB1*, *TP53*, entre outros (SEMPERE et al. 2007; BARH et al. 2008). A diminuição da expressão de *let-7* também está envolvida com a regulação da transcrição dos genes *AURKA*, *BRCA1*, *CCNA2*, *CDK8*, *CHEK1*,

DICER1, *FANCD2*, *HMGA2*, *N-ras*, *SKP2*, *SOX9*, entre outros, em linhagens celulares de carcinomas hepatocelulares (JOHNSON et al. 2007) e em linhagens celulares de pulmão, com regulação da transcrição e tradução de genes como *MYC* e *RAS* (JOHNSON et al. 2005), *AURKA*, *CCNA2*, *CDC34*, *CDK8*, *DICER1*, *HMGA2*, *N-RAS*, entre outros (LEE e DUTTA 2007; KUMAR et al. 2008).

A expressão reduzida de quase todos os membros da família *let-7*, com exceção do *let-7i*, tem sido relatada em CCECP esporádicos (CHANG et al. 2008; RAMDAS et al. 2009; HUI et al. 2010). TAKAMIZAWA et al. (2004) relataram correlação entre a diminuição da expressão de *let-7* com pior sobrevida em pacientes com câncer de pulmão. Posteriormente, YANAIHARA et al. (2006) relataram a mesma correlação para o *let-7a-2*.

No presente estudo, a comparação de três grupos amostrais (sangue de indivíduos saudáveis e sem história familiar; sangue dos pacientes com câncer e história familiar; e os tumores desses mesmos pacientes com história familiar) mostrou uma associação significativa para os dois miRNAs estudados ($P=0,001$). Na comparação aos pares entre esses grupos, foi observado que tanto no sangue de pacientes com histórico familiar de câncer como nos tumores dos mesmos pacientes, a expressão de *hsa-let-7a-3* era menor, quando comparado ao sangue de indivíduos sem histórico familiar de câncer ($P=0,002$ e $P=0,006$, respectivamente). Para o *hsa-let-7b*, observou-se uma expressão diminuída no sangue dos pacientes ($P=0,010$) e no tumor, entretanto neste último caso foi apenas marginalmente significativa ($P=0,079$).

A diminuição da expressão específica de *let-7-a* tem sido relatada em cânceres de mama, renal e linfomas de Burkitt (SAMPSON et al. 2007; SEMPERE et al. 2007; NAM et al. 2008) assim como em carcinomas de laringe (LONG et al. 2009) e em outros CCECO (YU et al. 2011). YU et al. (2011) também relataram que a expressão de *let-7a* era significativamente reduzida em tecidos metastáticos em comparação com CCECP primários.

A diminuição da expressão de *let-7b* foi descrita em leucemia linfoblástica aguda, cânceres de bexiga e no melanoma maligno (MI et al. 2007; NAM et al. 2008; SCHULTZ et al. 2008). Em linhagens celulares de carcinomas orais, JAKYMIW et al. (2010) demonstraram que a expressão elevada da *Dicer* (uma endonuclease RNase III) foi correlacionada a uma diminuição de expressão do *let-7b*, ao contrário do observado para *let-7a*, demonstrando que a *Dicer* é regulada pela família *let-7*.

BRUECKNER et al. (2007) relataram um atividade consistente do miRNA *let-7a-3* como oncogene, enquanto outros estudos descrevem atividades supressoras tumorais para outros miRNAs *let-7* (CALIN et al. 2004; TAKAMIZAWA et al. 2004; JOHNSON et al. 2005).

CHANG et al (2008) sugeriram que a família *let-7* pode não possuir uma função de supressora tumoral em todas as circunstâncias ou em todos os tecidos. Esse mesmo conceito poderia ser aplicado para os nossos achados onde o *hsa-let-7b* apresentou expressão aumentada nos tumores em relação ao sangue dos pacientes ($P=0,021$), inclusive em uma análise pareada ($P=0,013$). Uma explicação alternativa pode estar associada aos relatos em literatura de ganhos do cromossomo 22 em carcinomas de

cabeça e pescoço (BÉRGAMO et al. 2005; KOSTRZEWSKA-POCZEKAJ et al. 2010; 2011).

No presente estudo também foi comparado o padrão de expressão entre os dois miRNAs, nas amostras de sangue e tumor sendo observada uma forte correlação positiva ($r=0,713$; $P<0,001$), indicando que quando um miRNA tem sua expressão diminuída o outro miRNA tende a seguir esse mesmo padrão, quando as amostras são comparadas como um todo e não separadas em grupos específicos. Assim, os miRNAs parecem contribuir igualmente para o silenciamento de genes importantes para o desenvolvimento do tumor, apresentando principalmente uma expressão diminuída. Esse achado corrobora com dados em literatura que mostram que a família *let-7* age preferencialmente como supressora tumoral (revisado por BOYERINAS et al. 2010). Porém, na análise pareada o *let-7b* é hiperexpresso no tumor em relação ao sangue, como discutido anteriormente.

Cinco casos (N e T) com história familiar avaliados quanto à expressão dos miRNAs também foram investigadas para perda do *PHF21B* pela qPCR e metilação pelo HRM. Três casos mostraram expressão anormal do *hsa-let-7a-3* e *hsa-let-7b* no sangue dos pacientes, mas não no tumor. Dois deles mostraram expressão diminuída dos dois miRNA e um caso, apresentou expressão aumentada. A diferença no perfil de expressão dos miRNA no tumor em relação ao sangue poderia sugerir uma modulação distinta da expressão desses miRNAs no sangue. Esses casos com história

familiar não apresentaram perdas do gene *PHF21B* no sangue periférico sugerindo que estes eventos foram mutuamente exclusivos.

Alterações cromossômicas são frequentes no câncer e variações na dosagem gênica são considerados eventos comuns de ativação ou atenuação de oncogenes e genes supressores tumorais, respectivamente (KRESSE et al. 2010). A associação de CNVs em genes específicos e doenças humanas é conhecida há tempos, mas a amplitude e a prevalência desta forma de variação têm sido apenas recentemente descrita em literatura (CARTER 2007).

A metodologia de CGH-*array*, descrita em 1997 por SOLINAS-TOLDO et al. permite a triagem de variações polimórficas no número de cópias de DNA genômico com uma alta resolução. Essas variações polimórficas ou CNVs (*Copy Number Variations*) têm sido relatadas como frequentes em diferentes regiões do genoma eucromático humano, incluindo o cromossomo 22 (TUZUN et al. 2005; SCHERER et al. 2007), onde está mapeado o gene *PHF21B*.

Em uma análise *in silico* no banco de dados do DGV, na busca por CNVs já descritas para o gene *PHF21B* foram encontradas seis alterações: quatro do tipo *InDel* e duas do tipo *Copy Number*. Duas dessas CNVs (as do tipo *copy number*) cobrem os éxons e íntrons 1 e 2 (este último parcialmente), englobam a região promotora do gene e se estendem além do *PHF21B*. Essas variantes possuem 53.514 pb e 186.987 pb. As quatro variações do tipo *InDel* estão mapeadas íntron 2 (726bases), no íntron 5 (787 bases), no íntron 6 (593 bases) e outra no íntron 12 (210 bases).

A análise de aCGH das amostras de DNA do sangue periférico e do tumor de pacientes com CCECP (*software* Nexus v6.0, Build 36.1-equivalente ao Hg18), foram encontradas 4819 CNAs (do inglês, *copy number alterations*) com média de $200,8 \pm 139,6$. As alterações foram divididas em ganhos (1 cópia adicional), perdas heterozigotas (1 cópia ausente), alto nível de ganhos (2 ou mais cópias adicionais) e perdas homozigotas (2 cópias ausentes).

Dados em literatura em CCECP revelam um padrão de alterações genômicas, por análises citogenéticas convencionais, que incluem deleção em 3p, 4q, 5q, 9p, 18q e ganhos envolvendo 3q, 5p, 7p, 8q, 11q, 17q e 20q (revisado em STRUSKI et al. 2002).

Ganhos em 3q foram relatados em vários tipos tumorais, mas mais frequentemente naqueles de origem escamosa, como o CCECP (STRUSKI et al. 2002). Em muitos casos esse achado é resultante da formação de isocromossomos para 3q, levando a duplicação do braço longo e perda do braço curto, outro achado muito comum nos CCECP (GOLLIN 2001). Porém, alguns casos de perda em 3p parecem ser devidos a quebra em 3p14.2, local do sítio frágil mais comum e do gene *FHIT* (CROCE et al. 1999). ASHMAN et al. (2003) avaliaram 45 amostras de carcinomas de cabeça e pescoço por CGH cromossômico e encontraram amplificações em 3q (10 casos), 11q (4 casos), 5p (2 casos), 7p e 8q (1 caso cada). A sobrevida média dos pacientes com ganho em 3q25-27 foi significativamente reduzida (44,9 meses) em comparação àqueles sem essa alteração (63,3 meses) ($P=0,04$).

Em nossa análise por aCGH, os tumores da cavidade oral (10 casos) apresentaram 1749 alterações globais, sendo que os ganhos foram mais prevalentes nos cromossomos 8 e 14, e as perdas foram mais prevalentes nos cromossomos 10 e 11. Dois estudos utilizando aCGH também relataram estas mesmas alterações como frequentes. FREIER et al. (2010) avaliaram 40 amostras CCECP (cavidade oral), também pela metodologia de aCGH, e demonstraram predominância de ganhos em 1q23 (9 casos), 3q26 (11 casos), 5p15 (13 casos), 7p11 (7 casos), 8q24 (17 casos), 11q13 (15 casos), 14q32 (8 casos), 19p13 (8 casos), 19q12 (7 casos), 19q13 (8 casos) e 20q13 (9 casos); e de perdas em 3p21-3p12 (15 casos), 8p32 (11 casos), 10p12 (8 casos) e 18q21-q23 (10 casos). AMBATIPUDI et al. (2011) avaliaram 60 amostras de CCECP (cavidade oral), pela aCGH, e observaram ganhos frequentes em 3q (60%), 5p (50%), 7p (50%), 8q (73%), 11q13 (47%), 14q11.2 (47%) e 19p13.3 (58%); e perdas em 3p14.2 (55%) e 8p (83%).

Os tumores de orofaringe (seis casos) apresentaram 1428 alterações globais e os ganhos foram mais prevalentes nos cromossomos 1 e 3, já as perdas foram mais prevalentes nos cromossomos 3 e 4. Os tumores de hipofaringe (dois casos) apresentaram 839 alterações globais, sendo que os ganhos foram mais prevalentes nos cromossomos 1 e 3, e as perdas foram mais prevalentes nos cromossomos 4 e 5.

WELKOBORSKY et al. (2000) avaliaram 20 pacientes com carcinomas de orofaringe e hipofaringe metastáticos e não metastáticos, pela CGH cromossômica, e encontraram ganhos em 3q, 5p, 8q, 10q e 20q e

perdas em 5q, 9p e 14q (nos carcinomas não metastáticos). Já os carcinomas metastáticos mostraram ganhos em 3q, 5p, 11q, 15q, 22q, e perdas em 3p, 4q, 5q, 18q e 19p. Os ganhos e perdas encontrados para os carcinomas metastáticos revelaram maior semelhança com os nossos achados tanto para os carcinomas de orofaringe quanto para os de hipofaringe. Mas entre os seis casos de orofaringe avaliados em nosso estudo apenas um deles (caso 168) apresentou metástase linfonodal, assim como entre os casos de hipofaringe (caso 53).

Ganhos em 3q, 5p e 8q e perdas em 3p, 5q e 8p também já foram descritas em outros tipos de carcinomas de células escamosas, como o de pulmão (CHUJO et al. 2002; SY et al. 2004; YAKUT et al. 2006; CHOI et al. 2007). BOELENS et al. (2009) avaliaram 34 amostras de carcinomas de células escamosas de pulmão, por CGH-*array*, e relataram alterações comuns (frequência > 40%) como ganhos em 3q13.2-q29 (41-94%) e 8q24.3 (41-44%), e perdas em 5q14.2-q23.3 (41-68%).

Considerando as amostras de sangue periférico do nosso estudo (grupo 1, com 19 casos), foi encontrada uma média de $42,3 \pm 68,7$ alterações. O grupo de referência (amostras de 72 indivíduos brasileiros) apresentou uma média de $17,0 \pm 6,0$. Não houve diferença estatisticamente significativa entre o número de CNVs identificadas entre o grupo 1 e o grupo de referência ($p=0,1265$).

Em um estudo de YOSHIHARA et al. (2011), os autores compararam o número de CNVs identificadas em três grupos distintos: (1) pacientes positivas para mutação no gene *BRCA1* e com diagnóstico de câncer de

ovário; (2) pacientes sem a mutação, mas com a doença (grupo esporádico); (3) pacientes saudáveis (grupo controle). Eles observaram que não houve diferença significativa entre o número de CNVs identificadas no grupo de pacientes *BRCA1* positiva e o grupo controle.

KREPISCHI et al. (2012) compararam o número de CNVs identificadas em pacientes com diagnóstico precoce de câncer de mama, porém negativas para mutação nos genes de predisposição *BRCA1* e *BRCA2*, com um grupo controle. Neste estudo, eles não observaram diferença entre o total e o tamanho de CNVs no grupo amostral quando comparado com o grupo controle. Porém, a proporção de CNVs raras nos pacientes foi maior do que na população controle.

As alterações frequentes em mais de 20% dos casos foram comparadas aos bancos de dados DGV e REF, na tentativa de se identificar alterações comuns, raras e novas raras nos dois grupos estudados.

O grupo 1 (amostras de sangue periférico) apresentou apenas uma CNV nova rara em 1p11.2. Essa alteração envolve uma perda que engloba o gene *EMBP1* (*Embigin pseudogene 1*) e foi detectada em quatro amostras do grupo 1 (casos 74.1N, 26.1N, 27.1N e 67.1N). Levando em consideração as alterações globais (e não apenas as mais frequentes), o caso 74.1T apresentou esta mesma alteração. Pseudogenes são definidos como *loci* genômicos que se assemelham a genes funcionais, mas abrigam códons de parada prematuros, deleções/inserções e mutações *frameshift* que anulam a sua tradução em proteínas funcionais. Porém, as sequências de nucleotídeos contidas nos pseudogenes estão bem conservadas, sugerindo

que a pressão seletiva para manter estes elementos genéticos existe e que eles podem, de fato, desempenhar um papel celular importante (POLISENO et al. 2010). Para o nosso conhecimento não há relatos do envolvimento do *EMBP1* em câncer.

Na região 15q11.2 foram detectadas duas alterações envolvendo o miRNA *hsa-mir-1268*: um ganho e uma perda genômica. Ganhos desse miRNA foram detectados em seis amostras de sangue periférico (14.1N, 2.1N, 339N, 66N, 67.1N e 84.1N) e perdas em quatro casos (229N, 27.1N, 65.1N e 74.1N). Não temos conhecimento de dados em literatura envolvendo esse miRNAs. As demais CNVs encontradas para o grupo 1 foram consideradas como comuns.

O grupo 2 (amostras tumorais) apresentou oito CNAs novas raras distribuídas em: ganho 1q44 – 7 casos (*OR2T6*); perda em 3p12.1 – 6 casos (*CADM2*); ganho em 7p22.3 – 4 casos (*C7orf50*, *FP15621*, *GPR146*, *miR339*); perda em 8p23.3 – 6 casos (*BC022082*, *BC038783*, *LOC286083*); ganho em 8p11.21 – 6 casos (*ANK1*); ganho em 8q24.21 – 8 casos (*BC014119*); ganho em 11q13.2-q13-3 – 1 caso (*AK094674*, *AK124252*, *AK125463*, *ANO1*, *AX746803*, *BC127192*, *CCND1*, *CTTN*, *FADD*, *FGF19*, *FGF3*, *FGF4*, *KIAA1022*, *miR548K*, *MYEOV*, *OCIM*, *ORAOV1*, *PPFIA1*, *SHANK2*) e perda em 18q23 – 7 casos (*SALL3*).

Os ganhos em 1q44 envolvem o gene *OR2T6* (*olfactory receptor, family 2, subfamily T, member 6*). Os receptores olfatórios interagem com as moléculas olfativas e dão início à resposta neuronal de percepção do cheiro. Essas proteínas receptoras são membros de uma grande família de

receptores acoplados à proteína G (GPCR). A família gênica de receptores olfatórios é a maior no genoma, mas essa alteração não deve ter qualquer papel nos CCECP considerando a função deste receptor.

Perdas em 3p12.1 envolveram o gene *CADM2* (*cell adhesion molecule 2*). Este gene codifica para um membro da família de moléculas de adesão celular sináptica 1 (*SynCAM*), a qual pertence à superfamília das imunoglobulinas. CHANG et al. (2010) relataram expressão proteica significativamente reduzida de *CADM2* em carcinomas de próstata e revelaram que a expressão do gene é parcialmente regulada por metilação do promotor, o que o classificaria como um novo gene supressor tumoral assim como os já reconhecidos membros da família de moléculas de adesão celular (*CADM*): *CADM-1*, *CADM-3* e *CADM-4*. Dos seis casos com essa perda, dois (casos 339T e 53T) apresentaram metástase linfonodal. Este achado evidencia que o *CADM2* pode ter um papel relevante em carcinomas de cabeça e pescoço, pois a perda no gene *CADM2* pode ter afetado a função proteica da molécula de adesão por ele codificada, facilitando a invasão e a metástase observada nos dois casos.

As amostras tumorais 2.1T, 207T, 61.1T, 72.1T apresentaram ganhos significativos em 7p22.3. A *C7orf50* mapeada nesta região foi encontrada envolvida em ganhos tanto na amostra 74.1N como na amostra pareada do tumor, 74.1T. Nesta região também está mapeado o miR339. WU et al. (2010) relataram a expressão diminuída do *miR-339-5p* em linhagens celulares de câncer de mama agressivo (MDA-MB-468 e MDA-MB-231) e em tumores de mama em comparação a tecidos benignos. A expressão

diminuída foi associada com aumento de metástases linfonodais e com estadiamento clínico avançado. A transfecção de *miR-339-5p* reduziu pouco o crescimento celular, mas diminuiu significativamente a migração da célula tumoral e a capacidade de invasão em comparação com os controles. Após a transfecção, o *BCL-6*, um potencial gene alvo do *mir-339-5p*, mostrou-se com uma expressão diminuída nas células MDA-MB-231. Nossos achados demonstraram ganho para a região genômica onde está mapeado esse miRNA, um resultado aparentemente discordante daquele descrito por WU et al. (2010) (diminuição da expressão). Entre os casos alterados, um (caso 61.1T, cavidade oral) apresentou recorrência, comprometimento perineural, invasão vascular sanguínea e invasão vascular linfática, características de pior prognóstico. Entre as quatro amostras com essa alteração, apenas uma (72.1T) era de orofaringe, as demais eram de cavidade oral.

Perdas em 8p23.3 (*BC022082*, *BC038783*, *LOC286083*) foram identificadas em seis amostras tumorais, sendo quatro de cavidade oral e duas de orofaringe (2.1T, 207T, 339T, 61.1T e 168T, 26.1T, respectivamente). Essa alteração, mas envolvendo apenas o gene *BC022082* também foi encontrada na amostra de sangue 27.2N. Este caso é de uma parente do caso 27.1N. O caso 27.1N assim como o tumor do paciente, 27.1T, apresentaram perdas para o gene *BC022082*, o que o qualifica como um alvo para uma posterior validação. O símbolo oficial deste gene é *ERICH1-AS1* (*ERICH1 antisense RNA 1 - non-protein coding, C8orf68*).

O ganho em 8p11.21 foi encontrado em seis amostras: quatro de cavidade oral (14.1T, 229T, 51.1T, 58.1) e duas de orofaringe (26.1T, 74.1T). Essa alteração envolveu o gene *ANK1* (Ankyrin 1) que pertence a família de proteínas que contém o domínio anquirina, o qual é essencial para a integridade da membrana celular e a modulação de fatores sinalizadores extracelulares (BENNETT e CHEN 2001). O *miR-486* é transcrito dentro do locus *ANK1*, no qual ambas isoformas eritróide e músculo-específica são transcritas (ZHOU et al.1997). A menor isoforma do gene *ANK1*, a *ANK1.5* (ou *sANK1*) contém um éxon músculo-específico (éxon 39A) passível de splicing alternativo e sem o característico domínio de anquirina (ZHOU et al.1997; GALLAGHER e FORGET 1998).

A região 8p11.2-p12 está constantemente amplificada em cânceres de mama. Um estudo de DIB et al. (1995) utilizando contigs de YACs (2,8Mb), demonstrou a ligação dos genes *ANK1* (*Ankyrin 1*) e *PLAT* (*Tissue-type Plasminogen Activator*) e sua proximidade ao *FGFR1* (*Fibroblast growth factor receptor 1*), sugerindo um amplicon contínuo centrado no *FGFR1*.

O ganho em 8q24.21. onde se mapeia o gene *BC014119* foi detectado em oito amostras: seis de cavidade oral (2.1T, 229T, 339T, 51.1T, 58.1T, 61.1T) e duas de orofaringe (26.1T, 74.1T). Não temos conhecimento de relatos em literatura sobre essa sequência.

O ganho em 11q13.2-q13-3 mostrou-se presente em apenas uma amostra: 65.1T, hipofaringe, e envolveu 19 genes: *AK094674*, *AK124252*, *AK125463*, *ANO1*, *AX746803*, *BC127192*, *CCND1*, *CTTN*, *FADD*, *FGF19*, *FGF3*, *FGF4*, *KIAA1022*, *miR548K*, *MYEOV*, *OCIM*, *ORAOV1*, *PPFIA1*,

SHANK). Vários estudos tem relatado amplificação em alto nível em 11q13 em CCECP (SNIJDERS et al. 2005; JIN et al. 2006; JÄRVINEN et al. 2006; GIBCUS et al. 2007). Alguns destes genes, como *ANO1*, *CCND1*, *CTTN*, *FGF4*, tem sido descritos como envolvidos em ganhos/aumento de expressão vários tumores. AYOUB et al. (2010) demonstraram que a amplificação e a expressão aumentada de genes situados no *amplicon* 11q13 são associados com uma propensão a metástases a distância em CCECP negativos para HPV. O caso 65.1T era negativo para HPV16, mas não apresentou metástase linfonodal ou à distância. Em linhagens celulares, AYOUB et al. (2010) relataram ainda que a expressão aumentada de *ANO1* (*anoctamin 1, calcium activated chloride channel*) estimulou a perda de adesão, espalhamento e a invasão, tendo um efeito na migração celular, mas não na proliferação celular. Essa proteína participa no transporte de cloreto, tendo uma atividade intracelular no canal de cloreto ativado por cálcio (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

DUVVURI et al. (2012) relataram expressão aumentada de *ANO1* em 80% dos CCECP, a qual foi correlacionada com diminuição da sobrevida global nesses pacientes. STANICH et al. (2011) demonstraram em modelos funcionais que *ANO1* regula a proliferação na transição das fases G(1)/S do ciclo celular, podendo ter um papel importante na tumorigênese. RODRIGO et al. (2009) encontrou amplificação de *CTTN* e *CCND1* em 37-45% de tumores de laringe e faringe. A amplificação foi associada com doença avançada, porém somente *CTTN* foi significativamente associada com maior risco de recidiva. A cortactina (*CTTN*) é uma proteína associada à actina

envolvida em variados processos celulares, incluindo endocitose, tráfego de vesículas e formação de protusões celulares (DALY 2004). A ciclina D1 (CCND1) forma complexos com quinases dependente de ciclinas (CDKs) e promove a fosforilação de pRB levando a progressão do ciclo celular (SHERR 1994). Nosso grupo relatou uma maior expressão proteica de CTTN associada com características de pior prognóstico, como invasão perineural no fronte de invasão de carcinomas de laringe (AMBROSIO et al. 2011). CROUCHER et al. (2010) sugeriram que amplificação da região 11q13 pode conferir um aumento da proliferação em linhagens de carcinoma de cabeça e pescoço. No modelo proposto, a cortactina age via RhoA e diminui a expressão de Cip/Kip CDKs. EKE et al. (2012) recentemente demonstraram a participação da via β_1 Integrin/FAK/cortactina como essencial para a resistência de tumores de cabeça e pescoço à radioterapia em culturas celulares tridimensionais e em modelos xenográficos com camundongos.

Ciclina D1 e FADD (*Fas-associated protein with death domain*) regulam o ciclo celular e a apoptose, respectivamente e estão mapeados em 11q13, região frequentemente amplificada em CCECP. RASAMNY et al. (2012) relataram que pacientes com tumores de cabeça e pescoço com marcação fortemente positiva para ciclina D1 e FADD tiveram redução na sobrevida global (OS; $P = .003$ and $P < .001$), na sobrevida doença-específica (DSS; $P = .039$ and $P < .001$) e na sobrevida livre de doença (DFS; $P = .026$ and $P < .001$). A forte marcação de FADD foi correlacionada ainda ao alto consumo de álcool e variou significativamente entre sítios

tumorais primários: 56% dos tumores de hipofaringe expressaram altos níveis de FADD, mas apenas 7% dos tumores de glote tiveram a mesma expressão. O paciente 65.1T, aqui avaliado, também fumava e bebia.

JÄRVINEN et al. (2008) identificaram nove regiões altamente amplificadas em linhagens celulares de carcinomas orais, incluindo 11q13.2-q13.4. Além disso, alguns genes em 11q13 ainda apresentaram alterações (amplificações) semelhantes em linhagens celulares de laringe, incluindo os genes aqui relatados: *FADD*, *PPFIA1*, *CTT* e *NADSYN1*. Esses genes tiveram uma associação entre o aumento do número de cópias e aumento da expressão em pelo menos 39% das linhagens celulares de carcinomas orais e de laringe. HUANG et al. (2006) também mostraram que os genes situados no *amplicon* 11q13 (desde *TPCN2* até *SHANK2*, incluindo *FADD* e *CTTN*) apresentavam expressão aumentada em tumores orais e linhagens celulares.

PARISE et al. (1994) avaliaram a frequência de amplificação em 11q13, por *Southern Blot*, em CCECP e revelaram que os *loci* mais frequentemente amplificados foram *CYCD1* e *FGF3* (ambos presentes em 17/19 pacientes). A sobrevida em 3 anos (Kaplan-Meier) foi de 72,9% para os pacientes sem amplificação em 11q13 foi de 44,9% para os pacientes com amplificação, revelando seu potencial como um marcador prognóstico, possivelmente relacionado a recorrência. ROH et al. (2000) avaliaram o número de cópias do gene *INT2* (*FGF3*) em CCECP por PCR semiquantitativa. A amplificação do gene pareceu preceder o desenvolvimento tumoral, sugerindo que a amplificação ocorre

precocemente na tumorigênese desses tumores. TAN et al. (2008) também avaliaram a amplificação em 11q13 pela integração entre os dados obtidos pela aCGH e por *arrays* de expressão, em oito linhagens celulares de CCECP. O gene *PPFIA1* foi o gene mais altamente regulado nas linhagens celulares com o amplicon, em comparação às linhagens celulares sem esse amplicon. A regulação aumentada foi confirmada por qPCR. Os autores ainda sugerem que este gene pode agir como um inibidor da invasão em CCECP, já que as células tornaram-se mais invasivas quando os níveis proteicos de *PPFIA1* estavam reduzidos.

Ainda em nosso estudo, foram detectados ganhos envolvendo o miR548K, mapeado em 11q13.3, na amostra de hipofaringe (65.1T). PIRIYAPONGSA e JORDAN (2007) demonstraram que o *hsa-mir-548*, é derivado de elementos transponíveis *Made 1*. Esses elementos são pequenos elementos transponíveis repetidos e invertidos (do inglês, *MITEs*) compostos de dois terminais repetidos e invertidos de 37pb que flanqueiam uma sequência interna de 6pb. Aparentemente essas estruturas relacionadas a *Made 1* são reconhecidas e processadas pela maquinaria enzimática de interferência por RNA para formar sequências de miRNAs maduros de 22pb.

Perdas em 18q23 envolvendo o gene *SALL3* foram detectadas em sete amostras tumorais (168T, 26.1T, 72.1T e 74.1T, de orofaringe; e 207T, 339T, 61.1T, de cavidade oral). A amostra 72.1N apresentou a mesma alteração para o mesmo gene, na análise global das alterações. Portanto, essa alteração parece de relevância no estudo. O gene *SALL3* (*SALL3 sal-*

like 3 Drosophila) codifica uma proteína *zinc-finger*, que se liga a DNA metiltransferase 3 alfa (DNMT3A) e reduz a metilação de ilhas CpG mediada por DNMT3A. Sugere-se que o silenciamento deste gene, resultando na aceleração da metilação do DNA, tenha um papel na oncogênese (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). SHIKAUCHI et al. (2009) mostraram essa interação entre SALL3 e DNMT3A em carcinomas hepatocelulares. A interação ocorre entre o motivo *zinc-finger* duplo de SALL3 e o domínio PWWP de DNMT3A. Considerando a frequência de perdas envolvendo esse gene entre as amostras tumorais, assim como em um caso pareado (N e T) é de relevância a validação deste achado.

O ganho em 15q11.2 compreendeu 40 genes e o *hsa-mir-1268* foi detectado em 5 casos (207T, 14.1T, 339T, 72.1T, 84.1T). Como discutido anteriormente para os casos do grupo 1, não temos conhecimento de dados em literatura envolvendo esse miRNA.

Os dados de aCGH também foram avaliados para alterações específicas envolvendo a região 22q13.31. A lâmina de aCGH de 4x180K (Agilent Technologies) utilizada neste estudo possui 12 sondas intrônicas do gene *PHF21B* e uma sonda correspondente ao miRNA *hsa-let-7b*. Segundo os critérios adotados no estudo, não foram observadas alterações significativas para estas duas sequências. Contudo, com a finalidade de caracterizar em detalhes a região 22q13.31, essas sondas foram avaliadas individualmente. Nessa análise, várias amostras de sangue e de tumor apresentaram perdas heterozigotas para algumas das sondas do *PHF21B* e para a sonda do *hsa-let-7b*. Apenas a amostra tumoral 2.1T apresentou

perda homozigota para uma das sondas do gene. Duas amostras tumorais (2.1T e 207T) apresentaram quatro sondas distintas envolvidas em perdas para os introns do *PHF21B*. O delineamento da plataforma 4x180K não é adequado para avaliar e ou confirmar as perdas detectadas por qPCR para o gene *PHF21B* pelo fato de todas elas estarem mapeadas nos introns e muito distantes entre si. Assim, essas alterações não devem ter relevância para o fenótipo tumoral e não foram úteis para validar o achado de qPCR.

Em adição, esta plataforma contém uma única sonda para o *hsa-let-7b*. O caso 74.1N (paciente com carcinoma de orofaringe, 51 anos, sexo masculino, história de CCECP em irmão e tio, de câncer de próstata no pai e câncer de pâncreas na mãe) teve perda da sonda presente na análise por aCGH e diminuição da expressão do transcrito por RT-qPCR. Um achado interessante foi a perda deste miRNA no caso 65.1N (apenas avaliado por aCGH; paciente com carcinoma de hipofaringe, sexo feminino, 63 anos, história de pai com CCECP, irmão com câncer de pulmão e tio com câncer colorretal) e no tumor correspondente (65.1T). A amostra tumoral também apresentou diminuição da expressão para o miRNA *hsa-let-7b*. Em conjunto, estes achados reforçam o envolvimento deste miRNA como candidato a predisposição ao CCECP. Outros estudos são necessários em outros membros da família para confirmar esse achado.

Ainda com a finalidade de caracterizar o perfil de perdas por aCGH envolvendo a região 22q13.31, outro gene mapeado próximo ao marcador D22S274 e próximo ao gene *PHF21B* também foi investigado em detalhes pela aCGH. O gene *ARHGAP8* (*Rho GTPase activating protein 8*) e *PRR5*

(*PRR5-ARHGAP8*) estão representados na lâmina de 4x180K por 13 sondas (12 mapeadas em regiões intrônicas e uma na região UTR). Apenas uma amostra (65.1T) apresentou perda para três sondas consecutivas (sondas 4, 5 e 6). A amostra 65.1N também apresentou perda heterozigota para a sonda 5 (mapeada no íntron 4). Esse mesmo caso apresentou perda para a amostra de sangue e de tumor (65.1N e 65.1T) para o miRNA *hsa-let-7b*, também pela aCGH. O gene *ARHGAP8* dista aproximadamente 1,12 Mb desse miRNA, mas entre eles há outros genes, inclusive o *PHF21B*. Perdas em amostras pareadas N e T podem indicar o papel desse gene na etiologia dos CCECP. Outra amostra pareada (53N e 53T) apresentou perda para a sonda 1 (mapeada no íntron 4), sendo homozigota na amostra N.

Nessa análise, várias amostras de sangue e de tumor apresentaram perdas heterozigotas para algumas das sondas do *PRR5-ARHGAP8*.

O gene *ARHGAP8* codifica um membro da família RHOGAP e está mapeado em 22q13.31, uma região crítica de perda de heterozigose (do inglês, *LOH*) em carcinomas de cólon e mama (CASTELLS et al. 1999; CASTELLS et al. 2000). As proteínas da família GAP (do inglês, *GTPase-activating*) participam das vias de sinalização que regulam processos celulares envolvidos em alterações do citoesqueleto, progressão do ciclo celular, migração e invasão (ETIENNE-MANNEVILLE e HALL 2002). Essas proteínas alternam de um estado ativo (ligado a GTP) ou inativo (ligado a GDP). A proteína *ARHGAP8* promove a ativação Erk e consequente aumento da motilidade celular. São descritos produtos resultantes de *splicing* alternativos resultando em múltiplos transcritos. Um deles é lido a

partir do gene vizinho *PRR5* (*proline rich 5, renal*) até o *ARHGAP8*, o que leva à descrição desses dois genes como sendo apenas um (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), como mostrado na avaliação das sondas na lâmina de 4x180K utilizada no presente estudo.

JOHNSTONE et al. (2004) identificaram e caracterizaram o gene *ARHGAP8* em carcinomas de cólon e mama. A análise de PCR-SSCP (do inglês, *PCR-based single strand conformation polymorphism*) revelou seis variações *missense* na linhagem germinativa de indivíduos com esses tipos tumorais, porém nenhuma mutação somática foi encontrada nos 36 carcinomas de mama e 55 colorretais. Paradoxalmente, a expressão do *ARHGAP8* mostrou-se aumentada na maioria dos tumores colorretais primários avaliados (14/16 casos) em relação ao tecido normal adjacente, sugerindo que esse gene não é regulado por hipermetilação de uma ilha CpG e não pode ser considerado como um gene supressor tumoral inativado somaticamente nos cânceres de cólon e mama. Entretanto, considerando os diversos produtos de *splicing* deste gene, não pode ser desconsiderada a hipótese do seu envolvimento em CCEPC. Para o nosso conhecimento não relatos em literatura mostrando a associação deste gene com os carcinomas de cabeça e pescoço.

Os casos N e T pareados foram avaliados individualmente e comparados na tentativa de se determinar alterações em comum, presentes tanto na amostra de sangue periférico como na amostra tumoral do mesmo indivíduo. Foram consideradas como 11 alterações raras ou novas raras após comparação com os bancos de dados utilizados.

Uma alteração (um ganho de 123.030 pb) em um caso pareado (amostras 207N e 207T) em 20q11.21 foi considerada como uma CNA nova rara no DGV, mas comum na comparação com o REF. Interessantemente, essa alteração pode ser característica da população brasileira em relação à população avaliada pelo DGV. Os genes mapeados nessa região incluem: *DEFB118* (*defensin, beta 118*), *DEFB119*, *DEFB121*, *DEFB122*, *DEFB123* e *AY122474*. As proteínas defensinas-beta são peptídeos antimicrobianos que protegem tecidos e órgãos de uma variedade de infecções. A expressão do gene é regulada por andrógeno (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). O *AY122474* é um pseudogene conhecido como *DEFB122 pseudogene (defensin, beta 122 pseudogene)*.

Os sítios frágeis (SF) correspondem a *loci* cromossômicos específicos que possuem *gaps* ou perdas não randômicas ocorrendo em resposta a condições específicas de cultura ou exposição a determinados agentes químicos como o folato, a distamicina A e a bromodeoxiuridina. A maioria dos indutores de fragilidade compartilha a capacidade de inibir a duplicação do DNA, principalmente nos *loci* de sítios frágeis. É estabelecido que esses sítios possuem uma alta taxa de recombinação e estão frequentemente envolvidos com deleções e translocações (GLOVER e STEIN 1988; ARLT et al. 2006), em trocas entre cromátides irmãs (GLOVER e STEIN 1987), em integração de plasmídeos (RASSOOL et al. 1991) e em amplificação gênica intracromossômica (COQUELLE et al. 1997). Os sítios frágeis raros são identificados em menos que 5% da população, enquanto os sítios frágeis comuns são partes intrínsecas da estrutura dos cromossomos presentes em

todos os indivíduos (LUKUSA e FRYNS 2008). Alguns desses SF, especialmente os comuns, estão envolvidos também em rearranjos relacionados a tumores, como as deleções (MIMORI et al. 1999) e translocações (WILKE et al. 1994) encontradas em vários tumores.

A ativação dos sítios frágeis está associada a várias formas de instabilidade do DNA em células cancerosas e acredita-se que este seja um evento na geração de danos ao DNA nos períodos iniciais da tumorigênese (BLUMRICH et al. 2011). A presença de SF comuns no câncer é particularmente relevante quando um ou mais genes supressores de tumor estão localizados em regiões específicas de fragilidade (DRUSCO et al. 2011).

Entre as 11 alterações classificadas como raras ou novas raras pela comparação com os dois bancos de dados utilizados, a variação nova rara mapeada em 8q22.3 (caso 53N x 53T) possui um sítio frágil já descrito (FRA8A) (revisado em DEBACKER e KOOY 2007; LUKUSA e FRYNS 2008). É possível que a presença de SF nessa região constitua um dos fatores facilitadores do ganho observado para essa região cromossômica. Além disso, alterações em estágios iniciais do desenvolvimento tumoral geram uma alta instabilidade genômica permissiva de alterações subsequentes.

Os efeitos cariotípicos de perdas em 8p e ganhos em 8q simultâneos foram avaliados por VIRGIN et al. (1999). Nesse estudo, uma linhagem celular primária de câncer de próstata foi imortalizada e avaliada quanto a ganhos e perdas genômicos pela metodologia de CGH cromossômico.

Foram detectadas perdas em 8p e ganhos em 8q. Para verificar se esse padrão de alteração no cromossomo 8 ocorreu devido à presença de um isocromossomo, foi realizada a análise cariotípica da linhagem celular e foi constatada a presença de um isocromossomo 8q, presente em 86-90% das metástases analisadas. Assim, acredita-se que a alta instabilidade no cromossomo 8 em carcinomas de próstata resulte de eventos sequenciais que levam a formação de isocromossomos. Na análise de aCGH não foi observada alterações genômicas compatíveis com a formação de isocromossomos.

Outro sítio frágil comum (FRA1B) está mapeado em 1p32. A alteração encontrada em comum para as amostras 67.1N e 67.1T está mapeada em 1p33, sendo uma perda de 86.078 pb que envolveu apenas o gene *AGBL4*. Não há dados em literatura descritos para esse gene.

A perda mapeada em 4p14 foi comum às amostras 72.1N e 72.1T e envolveu os genes *TBC1D1*, *LNX1* e *UNQ574*. O sítio frágil comum FRA4D está mapeado em 4p15. Outras duas perdas foram encontradas em 15q22.2 e 15q24.1, comuns às amostras 74.1N e 74.1T e envolveram os genes *VPS13C*, *BC028842*, *FAM148A*, *C2CD4A*; e *ARIH1* e *MIR630*, respectivamente. A alteração em 15q24.1 foi considerada como rara no DGV e nova rara no REF. O sítio frágil comum FRA15A está mapeado em 15q22.

Um ganho mapeado em 3q26.31 foi comum às amostras 74.1N e 74.1T e envolveu o gene *NAALADL2*. O sítio frágil comum FRA3D está mapeado em 3q27. Outro ganho em 6p21.1 foi encontrado como comum às amostras 72.1N e 72.1T e envolveu o gene *TRERF1*. O sítio comum frágil

FRA6C está mapeado em 6p22.2. Em 10q21.3 foi encontrado um ganho comum às amostras 207N e 207T e envolveu o gene *TET1*. O sítio frágil comum FRA10D está mapeado em 10q22.1. Já o ganho em 22q13.31 foi comum às amostras 58.1N e 58.1T e envolveu os genes *GTSE1*, *dJ1163J1.4*, *MTU*, *TRMU*, *CELSR1*. O sítio frágil comum FRA22B está mapeado em 22q13.

A literatura em relação à comparação de amostras de tumor de um paciente com seu próprio sangue, pela metodologia de aCGH ainda é rara e nossos achados podem elucidar o papel das alterações já presentes no sangue do indivíduo na contribuição ao desenvolvimento da doença, já que as regiões comumente alteradas podem conter genes supressores tumorais e oncogenes importantes para a tumorigênese. Futuras investigações e validações são necessárias para a confirmação dos achados.

6 CONCLUSÕES

- Foram detectadas perdas no número de cópias do gene *PHF21B* em amostras tumorais e de sangue periférico. Oito casos pareados (N e T) mostraram perdas do gene *PHF21B*, destes dois sabidamente com história de câncer na família. Estes dados revelam que o gene *PHF21B* é um candidato a supressor tumoral.
- Como segundo evento possivelmente associado ao silenciamento do gene *PHF21B*, foi investigada mutações por sequenciamento do DNA do sangue periférico de um grupo de casos. Não foram identificadas mutações nos éxons avaliados.
- Como alternativa para a inativação funcional do gene *PHF21B*, foi avaliado o perfil de metilação do promotor do gene por HRM. Em um subconjunto de casos foi demonstrado que o gene *PHF21B* apresentava metilação aberrante. Em conjunto, estes achados sugerem que mecanismos genéticos e epigenéticos levam a perda da função do provável gene supressor tumoral *PHF21B* em carcinomas de cabeça e pescoço.
- Demonstrou-se a expressão diminuída dos miRNAs *hsa-let-7a-3* e *hsa-let-7b* mapeados em 22q13.31. Em um subconjunto de casos avaliados para perdas do *PHF21B* e expressão dos miRNAs, foi verificado que os eventos de perda/diminuição da expressão, respectivamente, eram mutuamente exclusivos.

- Por aCGH, foi avaliada a perda de sondas específicas nos arredores da região 22q13.31. Foi observada perda tanto para o *PHF21B* como para o *ARHGAP8*. Essa análise também revelou outras alterações (N e T) em indivíduos específicos que necessitam de validação posterior. Em determinados casos outros genes podem também estar envolvidos no risco familiar de desenvolvimento destes tumores. Na comparação entre a amostra de sangue e tumor de um mesmo indivíduo, várias regiões cromossômicas mostraram-se comumente alteradas. O único caso em que um parente foi avaliado, verificou-se que as CNVs deste indivíduo eram compartilhadas também pelo parente afetado (N e T).
- Em conjunto, os dados deste estudo ilustra a importância do gene *PHF21B* na tumorigênese dos carcinomas de cabeça e pescoço e sugere seu envolvimento como um supressor tumoral associado a predisposição hereditária. As análises globais do genoma de indivíduos com CCECP sugeririam o envolvimento de alguns genes que podem ter relevância na etiologia dos CCECP.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abel EL, Kruger ML, Friedl J. How do physicians define "light," "moderate," and "heavy" drinking? **Alcohol Clin Exp Res** 1998; 22:979-84.

Abrahante JE, Daul AL, Li M, et al. The *Caenorhabditis elegans* hunchback-like gene *lin-57/hbl-1* controls developmental time and is regulated by microRNAs. **Dev Cell** 2003; 4:625-37.

Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett** 2007; 245:96-102.

Achatz MI, Hainaut P, Ashton-Prolla P. Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? **Lancet Oncol** 2009; 10:920-5.

Adelstein DJ, Rodriguez CP. Current and emerging standards of concomitant chemoradiotherapy. **Semin Oncol** 2008; 35:211-20.

Ahmed SM, Mubeen, Jigna VR. Molecular biology: an early detector of oral cancers. **Ann Diagn Pathol** 2009; 13:140-5.

Alter BP, Joenje H, Oostra AB, Pals G. Fanconi anemia: adult head and neck cancer and hematopoietic mosaicism. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2005; 131:635-9.

Ambatipudi S, Gerstung M, Gowda R, et al. Genomic profiling of advanced-stage oral cancers reveals chromosome 11q alterations as markers of poor clinical outcome. **PLoS One** 2011; 6:e17250.

Ambros V. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. **Cell** 1989; 57:49-57.

Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. **Cell** 2003; 113:673-6.

Ambrosio EP, Rosa FE, Domingues MA, et al. Cortactin is associated with perineural invasion in the deep invasive front area of laryngeal carcinomas. **Hum Pathol** 2011; 42:1221-9.

AmiGO. **The Gene Ontology**. Available from: <URL:<http://amigo.geneontology.org/cgi-bin/amigo/go.cgi>> [2012 abr 3].

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

Ankathil R, Bhattathiri NV, Francis JV, et al. Mutagen sensitivity as a predisposing factor in familial oral cancer. **Int J Cancer** 1996; 69:265-7.

Arlt MF, Durkin SG, Ragland RL, Glover TW. Common fragile sites as targets for chromosome rearrangements. **DNA Repair (Amst)** 2006; 5:1126-35.

Ashman JN, Patmore HS, Condon LT, Cawkwell L, Stafford ND, Greenman J. Prognostic value of genomic alterations in head and neck squamous cell carcinoma detected by comparative genomic hybridisation. **Br J Cancer** 2003; 89:864-9.

Auluck A, Hislop G, Bajdik C, Poh C, Zhang L, Rosin M. Trends in oropharyngeal and oral cavity cancer incidence of human papillomavirus (HPV)-related and HPV-unrelated sites in a multicultural population: the British Columbia experience. **Cancer** 2010; 116:2635-44.

Ayoub C, Wasylyk C, Li Y, Thomas E, et al. ANO1 amplification and expression in HNSCC with a high propensity for future distant metastasis and its functions in HNSCC cell lines. **Br J Cancer** 2010; 103:715-26.

Baker LA, Allis CD, Wang GG. PHD fingers in human diseases: disorders arising from misinterpreting epigenetic marks. **Mutat Res** 2008; 647:3-12.

Baldwin C, Garnis C, Zhang L, Rosin MP, Lam WL. Multiple microalterations detected at high frequency in oral cancer. **Cancer Res** 2005; 65:7561-7.

Barh D, Parida S, Parida BP, Viswanathan G. Let-7, mir-125, mir-205, and mir-296 are prospective therapeutic agents in breast cancer molecular medicine. **Gene Ther Mol Biol** 2008; 12:189-206.

Barh D, Malhotra R, Ravi B, Sindhurani P. MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic. **Curr Oncol** 2010; 17:70-80.

Barros Filho MC. **Expressão de grupos de genes como marcadores moleculares preditivos de resposta à quimioterapia neoadjuvante com doxorrubicina e ciclofosfamida em pacientes com câncer de mama.** São Paulo; 2009. [Dissertação Mestrado-Faculdade de Medicina de São Paulo].

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell** 2009; 136:215-33.

Bauer VL, Braselmann H, Henke M, et al. Chromosomal changes characterize head and neck cancer with poor prognosis. **J Mol Med (Berl)** 2008; 86:1353-65.

Baykul T, Yilmaz HH, Aydin U, Aydin MA, Aksoy M, Yildirim D. Early diagnosis of oral cancer. **J Int Med Res** 2010; 38:737-49.

Baylin SB, Herman JG. DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. **Trends Genet** 2000; 16:168-74.

Benn PA, Hsu LY. Prenatal diagnosis of chromosomal abnormalities through amniocentesis. In: Milunsky A, editor. **Genetic disorders and the fetus**. 5th ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 2004. p.271-4.

Bennett V, Chen L. Ankyrins and cellular targeting of diverse membrane proteins to physiological sites. **Curr Opin Cell Biol** 2001; 13:61-7.

Bérgamo NA, da Silva Veiga LC, dos Reis PP, et al. Classic and molecular cytogenetic analyses reveal chromosomal gains and losses correlated with survival in head and neck cancer patients. **Clin Cancer Res** 2005; 11:621-31.

Berger AH, Pandolfi PP. Haplo-insufficiency: a driving force in cancer. **J Pathol** 2011; 223:137-46.

Bertonha FB. **O gene PHF21B como candidato à predisposição familiar em cânceres de cabeça e pescoço**. Botucatu; 2008. [Dissertação Mestrado-Universidade Estadual Paulista, Campus de Botucatu].

Bhalla KN. Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies. **J Clin Oncol** 2005; 23:3971-93.

Bienz M. The PHD finger, a nuclear protein-interaction domain. **Trends Biochem Sci** 2006; 31:35-40.

Blumrich A, Zapatka M, Brueckner L, Zheglo D, Schwab M, Savelyeva L. The FRA2C common fragile site maps to the borders of MYCN amplicons in neuroblastoma and is associated with gross chromosomal rearrangements in different cancers. **Hum Mol Genet** 2011; 20:1488-501.

Bockmühl U, Schlüns K, Kuchler I, Petersen S, Petersen I. Genetic imbalances with impact on survival in head and neck cancer patients. **Am J Pathol** 2000; 157:369-75.

Boelens MC, Kok K, van der Vlies P, et al. Genomic aberrations in squamous cell lung carcinoma related to lymph node or distant metastasis. **Lung Cancer** 2009; 66:372-8.

Bonazzi VF, Irwin D, Hayward NK. Identification of candidate tumor suppressor genes inactivated by promoter methylation in melanoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2009; 48:10-21.

Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. **Endocr Relat Cancer** 2010; 17:F19-36.

Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, et al. The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. **Cancer Res** 2007; 67:1419-23.

Cabanillas R, Astudillo A, Valle M, et al. Novel germline CDKN2A mutation associated with head and neck squamous cell carcinomas and melanomas. **Head Neck** 2011; 15. [Epub ahead of print]

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2004; 101:2999-3004.

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. **Nat Rev Cancer** 2006a; 6:857-66.

Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. **Cancer Res** 2006b; 66:7390-4.

Campo-Trapero J, Cano-Sánchez J, Palacios-Sánchez B, Sánchez-Gutierrez JJ, González-Moles MA, Bascones-Martínez A. Update on molecular pathology in oral cancer and precancer. **Anticancer Res** 2008; 28:1197-205.

Candiloro IL, Mikeska T, Hokland P, Dobrovic A. Rapid analysis of heterogeneously methylated DNA using digital methylation-sensitive high resolution melting: application to the CDKN2B (p15) gene. **Epigenetics Chromatin** 2008; 1:7.

Canevari R, Rogatto SR. Câncer de cabeça e pescoço. In: Ferreira CG, Rocha JC, editores. **Oncologia molecular**. São Paulo: Atheneu; 2004. p.189-202.

Cardesa A, Nadal A. Carcinoma of the head and neck in the HPV era. **Acta Dermatovenerol Alp Panonica Adriat** 2011; 20:161-73.

Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. **Cancer Lett** 2008; 269:7-17.

Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, et al. The transcriptional landscape of the mammalian genome. **Science** 2005; 309:1559-63.

Carter NP. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. **Nat Genet** 2007; 39(7 Suppl):S16-21.

Carvalho AL, Jeronimo C, Kim MM, et al. Evaluation of promoter hypermethylation detection in body fluids as a screening/diagnosis tool for head and neck squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2008; 14:97-107.

Cassidy J, Bissett D, Roy AJ, Payne M. Head and neck cancers. In: Cassidy J, Bissett D, Obe RAJS, editors. **Oxford handbook of oncology**. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press; 2010. p.443-62.

Castells A, Ino Y, Louis DN, Ramesh V, Gusella JF, Rustgi AK. Mapping of a target region of allelic loss to a 0.5-cM interval on chromosome 22q13 in human colorectal cancer. **Gastroenterology** 1999; 117:831-7.

Castells A, Gusella JF, Ramesh V, Rustgi AK. A region of deletion on chromosome 22q13 is common to human breast and colorectal cancers. **Cancer Res** 2000; 60:2836-9.

Cavenee WK, White RL. The genetic basis of cancer. **Sci Am** 1995; 272:72-9.

Cha JD, Kim HJ, Cha IH. Genetic alterations in oral squamous cell carcinoma progression detected by combining array-based comparative genomic hybridization and multiplex ligation-dependent probe amplification. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2011; 111:594-607.

Chalfie M, Horvitz HR, Sulston JE. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. **Cell** 1981; 24:59-69.

Chang G, Xu S, Dhir R, et al. Hypoexpression and epigenetic regulation of candidate tumor suppressor gene CADM-2 in human prostate cancer. **Clin Cancer Res** 2010; 16:5390-401.

Chang SS, Jiang WW, Smith I, et al. MicroRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Cancer** 2008; 123:2791-7.

Chen RZ, Pettersson U, Beard C, Jackson-Grusby L, Jaenisch R. DNA hypomethylation leads to elevated mutation rates. **Nature** 1998; 395:89-93.

Choi HR, Sturgis EM, Rosenthal DI, Luna MA, Batsakis JG, El-Naggar AK. Sarcomatoid carcinoma of the head and neck: molecular evidence for evolution and progression from conventional squamous cell carcinomas. **Am J Surg Pathol** 2003; 27:1216-20.

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

Choi YW, Choi JS, Zheng LT, et al. Comparative genomic hybridization array analysis and real time PCR reveals genomic alterations in squamous cell carcinomas of the lung. **Lung Cancer** 2007; 55:43-51.

Christensen BC, Avissar-Whiting M, Ouellet LG, et al. Mature microRNA sequence polymorphism in MIR196A2 is associated with risk and prognosis of head and neck cancer. **Clin Cancer Res** 2010; 16:3713-20.

Chujo M, Noguchi T, Miura T, Arinaga M, Uchida Y, Tagawa Y. Comparative genomic hybridization analysis detected frequent overrepresentation of chromosome 3q in squamous cell carcinoma of the lung. **Lung Cancer** 2002; 38:23-9.

Claverie JM. Fewer genes, more noncoding RNA. **Science** 2005; 309:1529-30.

Cloos J, Steen I, Timmerman AJ, van der Schans GP, Snow GB, Braakhuis BJ. DNA-damage processing in blood lymphocytes of head-and-neck-squamous-cell-carcinoma patients is dependent on tumor site. **Int J Cancer** 1996; 68:26-9.

Colnaghi R, Carpenter G, Volker M, O'Driscoll M. The consequences of structural genomic alterations in humans: genomic disorders, genomic instability and cancer. **Semin Cell Dev Biol** 2011; 22:875-85.

Conley BA, Wright JJ, Kummar S. Targeting epigenetic abnormalities with histone deacetylase inhibitors. **Cancer** 2006; 107:832-40.

Copper MP, Jovanovic A, Nauta JJ, et al. Role of genetic factors in the etiology of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 1995; 121:157-60.

Coquelle A, Pipiras E, Toledo F, Buttin G, Debatisse M. Expression of fragile sites triggers intrachromosomal mammalian gene amplification and sets boundaries to early amplicons. **Cell** 1997; 89:215-25.

Croce CM, Sozzi G, Huebner K. Role of FHIT in human cancer. **J Clin Oncol**. 1999; 17:1618-24.

Croucher DR, Rickwood D, Tactacan CM, Musgrove EA, Daly RJ. Cortactin modulates RhoA activation and expression of Cip/Kip cyclin-dependent kinase inhibitors to promote cell cycle progression in 11q13-amplified head and neck squamous cell carcinoma cells. **Mol Cell Biol** 2010; 30:5057-70.

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

Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature** 2012; 486:346-52.

Czajkowski R, Placek W, Drewa G, Czajkowska A, Uchańska G. FAMMM syndrome: pathogenesis and management. **Dermatol Surg** 2004; 30:291-6.

Czerninski R, Krichevsky S, Ashhab Y, Gazit D, Patel V, Ben-Yehuda D. Promoter hypermethylation of mismatch repair genes, hMLH1 and hMSH2 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Dis** 2009; 15:206-13.

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

Daly RJ. Cortactin signalling and dynamic actin networks. **Biochem J** 2004; 382:13-25.

de Andrade M, Amos CI, Foulkes WD. Segregation analysis of squamous cell carcinoma of the head and neck: evidence for a major gene determining risk. **Ann Hum Genet** 1998; 62:505-10.

De Herdt MJ, Baatenburg de Jong RJ. HGF and c-MET as potential orchestrators of invasive growth in head and neck squamous cell carcinoma. **Front Biosci** 2008; 13:2516-26.

de Oliveira LR, Ribeiro-Silva A, Zucoloto S. Prognostic impact of p53 and p63 immunoexpression in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 2007; 36:191–197.

de Villiers EM, Gunst K, Stein H, Scherübl H. Esophageal squamous cell cancer in patients with head and neck cancer: Prevalence of human papillomavirus DNA sequences. **Int J Cancer** 2004; 109:253-8.

Debacker K, Kooy RF. Fragile sites and human disease. **Hum Mol Genet** 2007; 15;16 Spec No. 2:R150-8.

Deshpande AM, Wong DT. Molecular mechanisms of head and neck cancer. **Expert Rev Anticancer Ther** 2008; 8:799-809.

Dib A, Adélaïde J, Chaffanet M, et al. Characterization of the region of the short arm of chromosome 8 amplified in breast carcinoma. **Oncogene** 1995; 10:995-1001.

Drusco A, Pekarsky Y, Costinean S, et al. Common fragile site tumor suppressor genes and corresponding mouse models of cancer. **J Biomed Biotechnol** 2011; 2011:984505.

D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. **J Infect Dis** 2009; 199:1263-9.

D'Souza G, Dempsey A. The role of HPV in head and neck cancer and review of the HPV vaccine. **Prev Med** 2011; 1:53 Suppl 1:S5-S11.

Duvvuri U, Shiwarski DJ, Xiao D, et al. TMEM16A Induces MAPK and Contributes Directly to Tumorigenesis and Cancer Progression. **Cancer Res** 2012; 72:3270-3281.

Eckstein F. Small non-coding RNAs as magic bullets. **Trends Biochem Sci** 2005; 30:445-52.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A. **AJCC cancer staging manual**. 7th ed. New York: Springer-Verlag; 2009. Head and neck: introduction and general rules (Part II.); p.29-40.

Eke I, Deuse Y, Hehlhans S, et al. β_1 Integrin/FAK/cortactin signaling is essential for human head and neck cancer resistance to radiotherapy. **J Clin Invest** 2012; 122:1529-40.

Erber R, Conradt C, Homann N, et al. TP53 DNA contact mutations are selectively associated with allelic loss and have a strong clinical impact in head and neck cancer. **Oncogene** 1998; 16:1671-9.

Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nat Rev Genet** 2007; 8:286-98.

Esteller M. Epigenetics in cancer. **N Engl J Med** 2008; 358 :1148–59.

Estivill X, Armengol L. Copy number variants and common disorders: filling the gaps and exploring complexity in genome-wide association studies. **PLoS Genet** 2007; 3:1787-99.

Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. **Nature** 2002; 420:629-35.

Fakhry C, D'Souza G, Sugar E, et al. Relationship between prevalent oral and cervical human papillomavirus infections in human immunodeficiency virus-positive and -negative women. **J Clin Microbiol** 2006; 44, 4479-85.

Fanciulli M, Petretto E, Aitman TJ. Gene copy number variation and common human disease. **Clin Genet** 2010; 77:201-13.

Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. **Nat Rev Genet** 2006; 7:85-97.

Fisher E, Scambler P. Human haploinsufficiency--one for sorrow, two for joy. **Nat Genet** 1994; 7:5-7.

Foulkes WD, Brunet JS, Kowalski LP, Narod SA, Franco EL. Family history of cancer is a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil: a case-control study. **Int J Cancer** 1995; 63:769-73.

Foulkes WD, Brunet JS, Sieh W, Black MJ, Shenouda G, Narod SA. Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. **BMJ** 1996; 313:716-21.

Freeman JL, Perry GH, Feuk L, et al. Copy number variation: new insights in genome diversity. **Genome Res** 2006; 16:949-61.

Freier K, Knoepfle K, Flechtenmacher C, et al. Recurrent copy number gain of transcription factor SOX2 and corresponding high protein expression in oral squamous cell carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2010; 49:9-16.

Fukazawa T, Maeda Y, Durbin ML, et al. Pulmonary adenocarcinoma-targeted gene therapy by a cancer- and tissue-specific promoter system. **Mol Cancer Ther** 2007; 6:244-52.

Fung C, Grandis JR. Emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck. **Expert Opin Emerg Drugs** 2010; 15:355-73.

Gallagher PG, Forget BG. An alternate promoter directs expression of a truncated, muscle-specific isoform of the human ankyrin 1 gene. **J Biol Chem** 1998; 273:1339-48.

Garavello W, Foschi R, Talamini R, et al. Family history and the risk of oral and pharyngeal cancer. **Int J Cancer** 2008; 122:1827-31.

Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol** 1987; 196:261-82.

Garnis C, Baldwin C, Zhang L, Rosin MP, Lam WL. Use of complete coverage array comparative genomic hybridization to define copy number alterations on chromosome 3p in oral squamous cell carcinomas. **Cancer Res** 2003; 63:8582-5.

Gibcus JH, Kok K, Menkema L, et al. High-resolution mapping identifies a commonly amplified 11q13.3 region containing multiple genes flanked by segmental duplications. **Hum Genet** 2007; 121:187-201.

Gillison ML, Koch WM, Capone RB, et al. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:709-20.

Glover TW, Stein CK. Induction of sister chromatid exchanges at common fragile sites. **Am J Hum Genet** 1987; 41:882-90.

Glover TW, Stein CK. Chromosome breakage and recombination at fragile sites. **Am J Hum Genet** 1988; 43:265-73.

Gold KA, Lee HY, Kim ES. Targeted therapies in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer** 2009; 115:922-35.

Goldstein AM, Pastakia B, DiGiovanna JJ, et al. Clinical findings in two African-American families with the nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCC). **Am J Med Genet** 1994; 50:272-81.

Gollin SM. Chromosomal alterations in squamous cell carcinomas of the head and neck: window to the biology of disease. **Head Neck** 2001; 23:238-53.

Gotte K, Riedel F, Neubauer J, et al. The relationship between allelic imbalance on 17p, p53 mutation and p53 overexpression in head and neck cancer. **Int J Oncol** 2001; 19:331-6.

Ha PK, Califano JA. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. **Lancet Oncol** 2006; 7:77-82.

Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, et al. A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. **Int J Cancer** 2003; 107:394-400.

Hall PA, Reis-Filho JS, Tomlinson IP, Poulson R. An introduction to genes, genomes and disease. **J Pathol** 2010; 220:109-13.

Hara H, Ozeki S, Shiratsuchi Y, Tashiro H, Jingu K. Familial occurrence of oral cancer: report of cases. **J Oral Maxillofac Surg** 1988; 46:1098-102.

Harty LC, Caporaso NE, Hayes RB, et al. Alcohol dehydrogenase 3 genotype and risk of oral cavity and pharyngeal cancers. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:1698-705.

Hashibe M, Brennan P, Benhamou S, et al. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:777-89.

Hayatsu H. The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research. **Mutat Res** 2008; 659:77-82.

Henrichsen CN, Chaignat E, Reymond A. Copy number variants, diseases and gene expression. **Hum Mol Genet** 2009; 18:R1-8.

Hitchins MP. Inheritance of epigenetic aberrations (constitutional epimutations) in cancer susceptibility. **Adv Genet** 2010; 70:201-43.

Hocking JS, Stein A, Conway EL, et al. Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. **Br J Cancer** 2011; 104:886-91.

Hopkins J, Cescon DW, Tse D, et al. Genetic polymorphisms and head and neck cancer outcomes: a review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2008; 17:490-9.

Huang X, Godfrey TE, Gooding WE, McCarty KS Jr, Gollin SM. Comprehensive genome and transcriptome analysis of the 11q13 amplicon in human oral cancer and synteny to the 7F5 amplicon in murine oral carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2006; 45:1058-69.

Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, et al. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. **Clin Cancer Res** 2010; 16:1129-39.

Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:127-35.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2012 Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2011.

Ionita-Laza I, Rogers AJ, Lange C, Raby BA, Lee C. Genetic association analysis of copy-number variation (CNV) in human disease pathogenesis. **Genomics** 2009; 93:22-6.

Iwase S, Januma A, Miyamoto K, et al. Characterization of BHC80 in BRAF-HDAC complex, involved in neuron-specific gene repression. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 322:601-8.

Jakymiw A, Patel RS, Deming N, et al. Overexpression of dicer as a result of reduced let-7 MicroRNA levels contributes to increased cell proliferation of oral cancer cells. **Genes Chromosomes Cancer** 2010; 49:549-59.

Jares P, Nadal A, Fernández PL, et al. Disregulation of p16MTS1/CDK4I protein and mRNA expression is associated with gene alterations in squamous-cell carcinoma of the larynx. **Int J Cancer** 1999; 81:705-11.

Järvinen AK, Autio R, Haapa-Paananen S, et al. Identification of target genes in laryngeal squamous cell carcinoma by high-resolution copy number and gene expression microarray analyses. **Oncogene** 2006; 25:6997-7008.

Järvinen AK, Autio R, Kilpinen S, et al. High-resolution copy number and gene expression microarray analyses of head and neck squamous cell carcinoma cell lines of tongue and larynx. **Genes Chromosomes Cancer** 2008; 47:500-9.

Jazdzewski K, Liyanarachchi S, Swierniak M, et al. Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:1502-5.

Jefferies S, Edwards SM, Hamoudi RA, et al. No germline mutations in CDKN2A (p16) in patients with squamous cell cancer of the head and neck and second primary tumours. **Br J Cancer** 2001; 85:1383-6.

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

Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. **CA Cancer J Clin** 2011; 61:69-90.

Jiang J, Lee EJ, Gusev Y, Schmittgen TD. Real-time expression profiling of microRNA precursors in human cancer cell lines. **Nucleic Acids Res** 2005; 33:5394-403.

Jin C, Jin Y, Wennerberg J, Akervall J, Dictor M, Mertens F. Karyotypic heterogeneity and clonal evolution in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Cancer Genet Cytogenet** 2002; 132:85-96.

Jin C, Jin Y, Wennerberg J, Annertz K, Enoksson J, Mertens F. Cytogenetic abnormalities in 106 oral squamous cell carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet** 2006; 164:44-53.

Johnson CD, Esquela-Kerscher A, Stefani G, et al. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. **Cancer Res** 2007; 67:7713-22.

Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. **Cell** 2005; 120:635-47.

Johnstone CN, Castellví-Bel S, Chang LM et al. ARHGAP8 is a novel member of the RHOGAP family related to ARHGAP1/CDC42GAP/p50RHOGAP: mutation and expression analyses in colorectal and breast cancers. **Gene** 2004; 336:59-71.

Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. **Nat Rev Drug Discov** 2002; 1:287-99.

Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. **Nat Genet** 1999; 21:163-7.

Kaminagakura E, Villa LL, Andreoli MA, et al. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. **Int J Cancer** 2012; 130:1726-32.

Karsai S, Abel U, Roesch-Ely M, et al. Comparison of p16(INK4a) expression with p53 alterations in head and neck cancer by tissue microarray analysis. **J Pathol** 2007; 11:314-322.

Kehrer-Sawatzki H. What a difference copy number variation makes. **Bioessays** 2007; 29:311-3.

Kim L, King T, Agulnik M. Head and neck cancer: changing epidemiology and public health implications. **Oncology (Williston Park)** 2010; 24:915-9.

Kim VN, Nam JW. Genomics of microRNA. **Trends Genet** 2006; 22:165-73.

Klein JD, Grandis JR. The molecular pathogenesis of head and neck cancer. **Cancer Biol Ther** 2010; 9:1-7.

Kleinjan DA, van Heyningen V. Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. **Am J Hum Genet** 2005; 76:8-32.

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1971; 68:820-3.

Koch WM, Lango M, Sewell D, Zahurak M, Sidransky D. Head and neck cancer in nonsmokers: a distinct clinical and molecular entity. **Laryngoscope** 1999; 109:1544-51.

Koch WM, Nance M. Classification, clinical features, and molecular genetic models. In: Olshan AF, editor. **Epidemiology, pathogenesis, and preventions of head and neck cancer**. New York: Springer; 2010.p.1-22.

Kong Q, Wu M, Wang Z, et al. Effect of trichostatin A and 5-Aza-2'-deoxycytidine on transgene reactivation and epigenetic modification in transgenic pig fibroblast cells. **Mol Cell Biochem** 2011; 355:157-65.

Koolen DA, Vissers LE, Pfundt R, et al. A new chromosome 17q21.31 microdeletion syndrome associated with a common inversion polymorphism. **Nat Genet** 2006; 38:999-1001.

Kostrzewska-Poczekaj M, Giefing M, Jarmuz M, et al. Recurrent amplification in the 22q11 region in laryngeal squamous cell carcinoma results in overexpression of the CRKL but not the MAPK1 oncogene. **Cancer Biomark** 2010-2011; 8:11-9.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. **Cell** 2007; 128:693-705.

Koy S, Plaschke J, Luksch H, et al. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Head Neck** 2008; 30:1105-13.

Kreimer AR, Alberg AJ, Daniel R, et al. Oral human papillomavirus infection in adults is associated with sexual behavior and HIV serostatus. **J Infect Dis** 2004; 189:686-98.

Kreimer AR, Bhatia RK, Messeguer AL, González P, Herrero R, Giuliano AR. Oral human papillomavirus in healthy individuals: a systematic review of the literature. **Sex Transm Dis** 2010; 37:386-91.

Krepischi AC, Achatz MI, Santos EM, et al. Germline DNA copy number variation in familial and early-onset breast cancer. **Breast Cancer Res** 2012; 14:R24.

Kresse SH, Szuhai K, Barragan-Polania AH, et al. Evaluation of high-resolution microarray platforms for genomic profiling of bone tumours. **BMC Res Notes** 2010; 3:223.

Kristensen LS, Wojdacz TK, Thestrup BB, Wiuf C, Hager H, Hansen LL. Quality assessment of DNA derived from up to 30 years old formalin fixed paraffin embedded (FFPE) tissue for PCR-based methylation analysis using SMART-MSP and MS-HRM. **BMC Cancer** 2009; 9:453.

Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, De La Chapelle A, Peltomäki P. Genetic and epigenetic modification of mlh1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. **Am J Pathol** 2000; 156:1773-9.

Kulis M, Esteller M. Dna methylation and cancer. **Adv genet** 2010; 70:27-56.

Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, et al. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105:3903-8.

Kutler DI, Wreesmann VB, Goberdhan A, et al. Human papillomavirus DNA and p53 polymorphisms in squamous cell carcinomas from Fanconi anemia patients. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:1718-21.

Lai EC. MicroRNAs: runts of the genome assert themselves. **Curr Biol** 2003; 13:R925-36.

Lajer CB, von Buchwald C. The role of human papillomavirus in head and neck cancer. **APMIS** 2010; 118:510-9.

Lan F, Collins RE, De Cegli R, et al. Recognition of unmethylated histone H3 lysine 4 links BHC80 to LSD1-mediated gene repression. **Nature** 2007; 448:718-22.

Lange JC, Borchers J, Danahey D, et al. Mutational status of overexpressed p16 in head and neck cancer: evidence for germline mutation of p16/p14arf. **Int J Oncol** 2002; 21:401-8.

Latchford A, Volikos E, Johnson V, et al. APC mutations in FAP-associated desmoid tumours arenon-random but not 'just right'. **Hum Mol Genet.** 2007; 16(1):78-82.

Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor micrornalet-7 re-presses the HMGA2 oncogene. **Genes Dev** 2007; 21:1025-30.

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

Li B, Gogol M, Carey M, Lee D, Seidel C, Workman JL. Combined action of PHD and chromo domains directs the Rpd3S HDAC to transcribed chromatin. **Science** 2007; 316:1050-4.

Li H, Fischle W, Wang W, et al. Structural basis for lower lysine methylation state-specific readout by MBT repeats of L3MBTL1 and an engineered PHD finger. **Mol Cell** 2007; 28:677-91.

Lin SY, Johnson SM, Abraham M, et al. The C elegans hunchback homolog, hbl-1, controls temporal patterning and is a probable microRNA target. **Dev Cell** 2003; 4:639-50.

Lindemann RK, Gabrielli B, Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. **Cell Cycle** 2004; 3:779-88.

Liu CJ, Lin SC, Chen YJ, Chang KM, Chang KW. Array-comparative genomic hybridization to detect genomewide changes in microdissected primary and metastatic oral squamous cell carcinomas. **Mol Carcinog** 2006; 45:721-31.

Liu K, Zuo C, Luo QK, Suen JY, Hanna E, Fan CY. Promoter hypermethylation and inactivation of hMLH1, a DNA mismatch repair gene, in head and neck squamous cell carcinoma. **Diagn Mol Pathol** 2003; 12:50-6.

Lockwood WW, Chari R, Chi B, Lam WL. Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. **Eur J Hum Genet** 2006; 14:139-48.

Long XB, Sun GB, Hu S, et al. Let-7a microRNA functions as a potential tumor suppressor in human laryngeal cancer. **Oncol Rep** 2009; 22:1189-95.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. **Pathology and genetics of head and neck tumors**. IARC Press: Lyon; 2007. (WHO Classification of Tumours, v. 9; IARC WHO Classification of Tumours, n° 9).

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

Lu L, Katsaros D, de la Longrais IA, Sochirca O, Yu H. Hypermethylation of let-7a-3 in epithelial ovarian cancer is associated with low insulin-like growth factor-II expression and favorable prognosis. **Cancer Res** 2007; 67:10117-22.

Lukusa T, Fryns JP. Human chromosome fragility. **Biochim Biophys Acta** 2008; 1779:3-16.

Lynch HT, Brand RE, Hogg D, et al. Phenotypic variation in eight extended CDKN2A germline mutation familial atypical multiple mole melanoma-pancreatic carcinoma-prone families: the familial atypical mole melanoma-pancreatic carcinoma syndrome. **Cancer** 2002; 94:84-96.

Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science** 1990; 250:1233-8.

Marichalar-Mendia X, Rodriguez-Tojo MJ, Acha-Sagredo A, Rey-Barja N, Aguirre-Urizar JM. Oral cancer and polymorphism of ethanol metabolising genes. **Oral Oncol** 2010; 46:9-13.

Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. **J Cell Biochem** 2009; 107:600-8.

Marron M, Boffetta P, Zhang ZF, et al. Cessation of alcohol drinking, tobacco smoking and the reversal of head and neck cancer risk. **Int J Epidemiol** 2010; 39:182-96.

Marsh D, Zori R. Genetic insights into familial cancers-- update and recent discoveries. **Cancer Lett** 2002; 181:125-64.

Martin CL, Reshmi SC, Ried T, et al. Chromosomal imbalances in oral squamous cell carcinoma: examination of 31 cell lines and review of the literature. **Oral Oncol** 2008; 44:369-82.

Martone T, Gillio-Tos A, De Marco L, et al. Association between hypermethylated tumor and paired surgical margins in head and neck squamous cell carcinomas. **Clin Cancer Res** 2007; 13:5089-94.

Matthews AG, Kuo AJ, Ramón-Maiques S, et al. RAG2 PHD finger couples histone H3 lysine 4 trimethylation with V(D)J recombination. **Nature** 2007; 450:1106-10.

Mattick JS, Makunin IV. Small regulatory RNAs in mammals. **Hum Mol Genet** 2005; 14:R121-32.

McCarroll SA, Hadnott TN, Perry GH, et al. Common deletion polymorphisms in the human genome. **Nat Genet** 2006; 38:86-92.

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

Mellor J. It takes a PHD to read the histone code. **Cell** 2006; 126:22-4.

Mertens F, Johansson B, Höglund M, Mitelman F. Chromosomal imbalance maps of malignant solid tumors: a cytogenetic survey of 3185 neoplasms. **Cancer Res** 1997; 57:2765-80.

Meurman JH. Infectious and dietary risk factors of oral cancer. **Oral Oncol** 2010; 46:411-3.

Mi S, Lu J, Sun M, et al. MicroRNAexpression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:19971-6.

Miller AJ, Mihm MC Jr. Melanoma. **N Engl J Med** 2006; 355:51-65.

Mimori K, Druck T, Inoue H, et al. Cancer-specific chromosome alterations in the constitutive fragile region FRA3B. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:7456-61.

Mitelman F, Johansson BE, Mertens F. **Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer**. 2008. Available from: <URL:<http://cgap.nci.nih.gov/chromosomes/mitelman>>. [2012 mai 12]

Mitelman F, Bertil J, Fredrik M. **Mitelman database of chromosome aberrations and gene fusions in cancer**. Available from: <URL:http://www.research.med.lu.se/en_projektdetaljer.php?Proj=203> [2012 jan 25].

Miyakawa A, Wang XL, Nakanishi H, et al. Allelic loss on chromosome 22 in oral cancer: possibility of the existence of a tumor suppressor gene on 22q13. **Int J Oncol** 1998; 13:705-9.

Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. **Oral Oncol** 2009; 45:324-34.

Musco G, Peterson P. PHD finger of autoimmune regulator: an epigenetic link between the histone modifications and tissue-specific antigen expression in thymus. **Epigenetics** 2008; 3:310-4.

Musselman CA, Kutateladze TG. PHD fingers: epigenetic effectors and potential drug targets. **Mol Interv** 2009; 9:314-23.

Nadal A, Jares P, Pinyol M, et al. Association of CDK4 and CCND1 mRNA overexpression in laryngeal squamous cell carcinomas occurs without CDK4 amplification. **Virchows Arch** 2007; 450:161-7.

Naidu A, Wright JM. The role of the human papillomavirus in oropharyngeal cancer. **Tex Dent J** 2011; 128:447-54.

Nam S, Kim B, Shin S, Lee S. MirGator: an integrated system for functional annotation of micrnas. **Nucleic Acids Res** 2008; 36:D159-64.

Negri E, Boffetta P, Berthiller J, et al. Family history of cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Int J Cancer** 2009; 124:394-401.

Oliveira C, Sousa S, Pinheiro H, et al. Quantification of epigenetic and genetic 2nd hits in CDH1 during hereditary diffuse gastric cancer syndrome progression. **Gastroenterology** 2009; 136:2137-48.

Oliver RJ, Dearing J, Hindle I. Oral cancer in young adults: report of three cases and review of the literature. **Br Dent J** 2000; 188:362-5.

Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2010; 2:a001008.

Ollikainen M, Hannelius U, Lindgren CM, Abdel-Rahman WM, Kere J, Peltomäki P. Mechanisms of inactivation of mlh1 in hereditary nonpolyposis colorectalcarcinoma: a novel approach. **Oncogene** 2007; 26:4541-9.

Olshan AF, Weissler MC, Watson MA, Bell DA. GSTM1, GSTT1, GSTP1, CYP1A1, and NAT1 polymorphisms, tobacco use, and the risk of head and neck cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2000; 9:185-91.

O'Regan EM, Toner ME, Smyth PC, et al. Distinct array comparative genomic hybridization profiles in oral squamous cell carcinoma occurring in young patients. **Head Neck** 2006; 28:330-8.

Parise O, Janot F, Guerry R, et al. Chromosome-11q13 gene amplifications in head and neck squamous-cell carcinomas - relation with lymph-node invasion. **Int J Oncol** 1994; 5:309-13.

Park SM, Shell S, Radjabi AR, et al. Let-7 prevents early cancer progression by suppressing expression of the embryonic gene HMGA2. **Cell Cycle** 2007; 6:2585-90.

Pehlivan D, Gunduz E, Gunduz M, et al. Loss of heterozygosity at chromosome 14q is associated with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. **J Cancer Res Clin Oncol** 2008; 134:1267-76.

Pelucchi C, Tramacere I, Boffetta P, Negri E, La Vecchia C. Alcohol consumption and cancer risk. **Nutr Cancer** 2011; 63:983-90.

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

Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Res** 2001; 29:e45.

Pfeifer K. Mechanisms of genomic imprinting. **Am J Hum Genet** 2000; 67:777-87.

Pinkel D, Albertson DG. Comparative genomic hybridization. **Annu Rev Genomics Hum Genet** 2005; 6:331-54.

Piovezan GC. **Prevalência do alelo TP53 R337H no Estado do Paraná.** Paraná; 2006. [Dissertação Mestrado-Universidade Federal do Paraná].

Piriyapongsa J, Jordan IK. A family of human microRNA genes from miniature inverted-repeat transposable elements. **PLoS One** 2007; 2:e203.

Pohl G, Shih IeM. Principle and applications of digital PCR. **Expert Rev Mol Diagn** 2004; 4:41-7.

Poli-Frederico RC, Bergamo NA, Reis PP, et al. Chromosome 22q a frequent site of allele loss in head and neck carcinoma. **Head Neck** 2000; 22:585-90.

Poliseno L, Salmena L, Zhang J, Carver B, Haveman WJ, Pandolfi PP. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. **Nature** 2010; 465:1033-8.

Press JZ, DE Luca A, Boyd N, et al. Ovarian carcinomas with genetic and epigenetic brca1 loss have distinct molecular abnormalities. **BMC Cancer** 2008; 8:17.

Prime SS, Thakker NS, Pring M, Guest PG, Paterson IC. A review of inherited cancer syndromes and their relevance to oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2001; 37:1-16.

Prystowsky MB, Adomako A, Smith RV, et al. The histone deacetylase inhibitor LBH589 inhibits expression of mitotic genes causing G2/M arrest and cell death in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. **J Pathol** 2009; 218:467-77.

Puri SK, Si L, Fan CY, Hanna E. Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in head and neck squamous cell carcinoma. **Am J Otolaryngol** 2005; 26:12-7.

Ramdas L, Giri U, Ashorn CL, Coombes KR, El-Naggar A, Ang KK, Story MD. miRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue. **Head Neck** 2009; 31:642-54.

Rampias T, Sasaki C, Weinberger P, Psyrris A. E6 and e7 gene silencing and transformed phenotype of human papillomavirus 16-positive oropharyngeal cancer cells. **J Natl Cancer Inst** 2009; 101:412-23.

Rasamny JJ, Allak A, Krook KA, et al. Cyclin D1 and FADD as biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma. **Otolaryngol Head Neck Surg.** 2012; 146:923-31.

Rassool FV, McKeithan TW, Neilly ME, et al. Preferential integration of marker DNA into the chromosomal fragile site at 3p14: an approach to cloning fragile sites. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1991; 88:6657-61.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al. Global variation in copy number in the human genome. **Nature** 2006; 444:444-54.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature** 2000; 403:901-6.

Reis PP, Poli-Frederico RC, dos Santos RM, Nishimoto IN, Kowalski LP, Rogatto SR. Distinct regions of loss of heterozygosity on 22q in different sites of head and neck squamous cell carcinomas. **Med Sci Monit** 2002a; 8:BR89-94.

Reis PP, Rogatto SR, Kowalski LP, et al. Quantitative real-time PCR identifies a critical region of deletion on 22q13 related to prognosis in oral cancer. **Oncogene** 2002b; 21:6480-7.

Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:9330-5.

Robertson KD, Wolffe AP. DNA methylation in health and disease. **Nat Rev Genet** 2000; 1:11-9.

Rodrigo JP, García-Carracedo D, García LA, et al. Distinctive clinicopathological associations of amplification of the cortactin gene at 11q13 in head and neck squamous cell carcinomas. **J Pathol** 2009; 217:516-23.

Rodrigo JP, Coto E, Gonzalez MV, Maldonado M, Suarez C. P53 allelic loss and outcome in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2001; 258:255-8.

Rodriguez T, Altieri A, Chatenoud L, et al. Risk factors for oral and pharyngeal cancer in young adults. **Oral Oncol** 2004; 40:207-13.

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:1758-62.

Rodriguez-Revena L, Mila M, Rosenberg C, Lamb A, Lee C. Structural variation in the human genome: the impact of copy number variants on clinical diagnosis. **Genet Med** 2007; 9:600-6.

Roh HJ, Shin DM, Lee JS, et al. Visualization of the timing of gene amplification during multistep head and neck tumorigenesis. **Cancer Res** 2000; 60:6496-502.

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

Rothhammer T, Bosserhoff AK. Epigenetic events in malignant melanoma. **Pigment Cell Res** 2007; 20:92-111.

Roush S, Slack FJ. The let-7 family of microRNAs. **Trends Cell Biol** 2008; 18:505-16.

Ruano Y, Mollejo M, de Lope AR, Hernández-Moneo JL, Martínez P, Meléndez B. Microarray-based comparative genomic hybridization (array-CGH) as a useful tool for identifying genes involved in Glioblastoma (GB). **Methods Mol Biol** 2010; 653:35-45.

Ruby JG, Jan C, Player C, et al. Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. **Cell** 2006; 127:1193-207.

Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J. Methylation of lysine 4 on histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. **Mol Cell** 2007; 25:15-30.

Sampson VB, Rong NH, Han J, et al. MicroRNAlet-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. **Cancer Res** 2007; 67:9762-70.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1977; 74:5463-7.

Scherer SW, Lee C, Birney E, et al. Challenges and standards in integrating surveys of structural variation. **Nat Genet** 2007; 39:S7-15.

Schindler U, Beckmann H, Cashmore AR. HAT3.1, a novel Arabidopsis homeodomain protein containing a conserved cysteine-rich region. **Plant J** 1993; 4:137-50.

Schultz J, Lorenz P, Gross G, Ibrahim S, Kunz M. MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. **Cell Res** 2008; 18:549-57.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 2: chromosomal aberrations. **Oral Oncol** 2000; 36:311-27.

Seidinger AL, Mastellaro MJ, Paschoal Fortes F, et al. Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil. **Cancer** 2011; 117:2228-35.

Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. **Genome Biol** 2004; 5:R13.

Sempere LF, Christensen M, Silaharoglu A, et al. Altered microRNA expression confined to specific epithelial cell sub-populations in breast cancer. **Cancer Res** 2007; 67:11612-20.

Sengupta S, Chakrabarti S, Roy A, Panda CK, Roychoudhury S. Inactivation of human mutL homolog 1 and mutS homolog 2 genes in head and neck squamous cell carcinoma tumors and leukoplakia samples by promoter hypermethylation and its relation with microsatellite instability phenotype. **Cancer** 2007; 109:703-12.

Shanesmith R, Allen RA, Moore WE, et al. Comparison of 2 line blot assays for defining HPV genotypes in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. **Diagn Microbiol Infect Dis** 2011; 70:240-5.

Shao Y, Gao Z, Marks PA, Jiang X. Apoptotic and autophagic cell death induced by histone deacetylase inhibitors. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004; 101:18030–5.

Shaw-Smith C, Pittman AM, Willatt L, et al. Microdeletion encompassing MAPT at chromosome 17q21.3 is associated with developmental delay and learning disability. **Nat Genet** 2006; 38:1032-7.

Sherr CJ. G1 phase progression: cycling on cue. **Cell** 1994; 79:551–555.

Shi H, Wang MX, Caldwell CW. CpG islands: their potential as biomarkers for cancer. **Expert Rev Mol Diagn** 2007; 7:519-31.

Shikauchi Y, Saiura A, Kubo T, et al. SALL3 interacts with DNMT3A and shows the ability to inhibit CpG island methylation in hepatocellular carcinoma. **Mol Cell Biol** 2009; 29:1944-58.

Shukla S, Bharti AC, Mahata S, et al. Infection of human papillomaviruses in cancers of different human organ sites. **Indian J Med Res** 2009; 130:222-33.

Smith EM, Swarnavel S, Ritchie JM, Wang D, Haugen TH, Turek LP. Prevalence of human papillomavirus in the oral cavity/oropharynx in a large population of children and adolescents. **Pediatr Infect Dis J** 2007; 26:836-40.

Smith J, Tho LM, Xu N, Gillespie DA. The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer. **Adv Cancer Res** 2010; 108:73-112.

Snijders AM, Schmidt BL, Fridlyand J, et al. Rare amplicons implicate frequent deregulation of cell fate specification pathways in oral squamous cell carcinoma. **Oncogene** 2005; 24:4232-42.

Solinas-Toldo S, Lampel S, Stilgenbauer S, et al. Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. **Genes Chromosomes Cancer** 1997; 20:399-407.

Sparano A, Quesnelle KM, Kumar MS, et al. Genome-wide profiling of oral squamous cell carcinoma by array-based comparative genomic hybridization. **Laryngoscope** 2006; 116:735-41.

Stanich JE, Gibbons SJ, Eisenman ST, et al. Ano1 as a regulator of proliferation. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2011; 301:G1044-51.

Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, et al. Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. **Science** 2007; 315:848-53.

Struski S, Doco-Fenzy M, Cornillet-Lefebvre P. Compilation of published comparative genomic hybridization studies. **Cancer Genet Cytogenet** 2002; 135:63-90.

Suárez C, Rodrigo JP, Ferlito A, Cabanillas R, Shaha AR, Rinaldo A. Tumours of familial origin in the head and neck. **Oral Oncol** 2006; 42:965-78.

Sun W, Wright FA, Tang Z, et al. Nordgard SH, Van Loo P, Yu T, Kristensen VN, Perou CM. Integrated study of copy number states and genotype calls using high-density SNP arrays. **Nucleic Acids Res** 2009; 37:5365-77.

Sy SM, Fan B, Lee TW, et al. Spectral karyotyping indicates complex rearrangements in lung adenocarcinoma of nonsmokers. **Cancer Genet Cytogenet** 2004; 153:57-9.

Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics. **CA Cancer J Clin** 2010; 60:376-92.

Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. **Cancer Res** 2004; 64:3753-6.

Tan KD, Zhu Y, Tan HK, et al. Amplification and overexpression of PPF1A1, a putative 11q13 invasion suppressor gene, in head and neck squamous cell carcinoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2008; 47:353-62.

Tashiro H, Abe K, Tanioka H. Familial occurrence of cancer of the mouth. **J Oral Maxillofac Surg** 1986; 44:322-3.

Tawfik HM, El-Maqsoud NM, Hak BH, El-Sherbiny YM. Head and neck squamous cell carcinoma: mismatch repair immunohistochemistry and promoter hypermethylation of hMLH1 gene. **Am J Otolaryngol** 2011; 32:528-36.

Termine N, Giovannelli L, Matranga D, et al. Oral human papillomavirus infection in women with cervical HPV infection: new data from an Italian cohort and a metanalysis of the literature. **Oral Oncol** 2011; 47:244-50.

Thiagalingam S, Laken S, Willson JK, et al. Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:2698-702.

Thomson JM, Parker J, Perou CM, Hammond SM. A custom microarray platform for analysis of microRNA gene expression. **Nat Methods** 2004; 1:47-53.

Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. **Genes Dev** 2006; 20:2202-7.

Toner M, O'Regan EM. Head and neck squamous cell carcinoma in the young: a spectrum or a distinct group? Part 2. **Head Neck Pathol** 2009; 3:249-51.

Torossian JM, Beziat JL, Philip T, Bejui FT. Squamous cell carcinoma of the tongue in a 13-year-old boy. **J Oral Maxillofac Surg** 2000; 58:1407-10.

Torrisani J, Bournet B, du Rieu MC, et al. Let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. **Hum Gene Ther** 2009; 20:831-44.

Toyota M, Suzuki H. Epigenetic drivers of genetic alterations. **Adv Genet** 2010; 70:309-23.

Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. **Oral Oncol** 2007; 43:523-34.

Tuzun E, Sharp AJ, Bailey JA, et al. Fine-scale structural variation of the human genome. **Nat Genet** 2005; 37:727-32.

Tycko B, Ashkenas J. Epigenetics and its role in disease. **J Clin Invest** 2000; 105:245-6.

Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:153-8.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol** 2002; 3:RESEARCH0034.

Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). **Dis Colon Rectum** 1991; 34:424-5.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. **Gastroenterology** 1999; 116:1453-6.

Verma RS, Triantafillou NG. Oncogenetic map of human genome. **Cancer Genet Cytogenet** 1998; 100:88-90.

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

Vinarsky V, Fine RL, Assaad A, et al. Head and neck squamous cell carcinoma in FAMMM syndrome. **Head Neck** 2009; 31:1524-7.

Virgin JB, Hurley PM, Nahhas FA, et al. Isochromosome 8q formation is associated with 8p loss of heterozygosity in a prostate cancer cell line. **Prostate** 1999; 41:49-57.

Vissers LE, Veltman JA, van Kessel AG, Brunner HG. Identification of disease genes by whole genome CGH arrays. **Hum Mol Genet** 2005; 14:R215-23.

Viswanathan M, Tsuchida N, Shanmugam G. Promoter hypermethylation profile of tumor-associated genes p16, p15, hMLH1, MGMT and E-cadherin in oral squamous cell carcinoma. **Int J Cancer** 2003; 105:41-6.

Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:9236-41.

Walsh JE, Lathers DM, Chi AC, Gillespie MB, Day TA, Young MR. Mechanisms of tumor growth and metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. **Curr Treat Options Oncol** 2007; 8:227-38.

Weinberg RA. Tumor suppressor genes. **Science** 1991; 254:1138-46.

Weiss D, Basel T, Sachse F, Braeuninger A, Rudack C. Promoter methylation of cyclin a1 is associated with human papillomavirus 16 induced head and neck squamous cell carcinoma independently of p53 mutation. **Mol Carcinog** 2011; 50:680-8.

Welkoborsky HJ, Bernauer HS, Riazimand HS, et al. Patterns of chromosomal aberrations in metastasizing and nonmetastasizing squamous cell carcinomas of the oropharynx and hypopharynx. **Ann Otol Rhinol Laryngol** 2000; 109:401-10.

Werness BA, Levine AJ, Howley PM. Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. **Science** 1990; 248:76-9.

Westra WH, Taube JM, Poeta ML, Begum S, Sidransky D, Koch WM. Inverse relationship between human papillomavirus-16 infection and disruptive p53 gene mutations in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Clin Cancer Res** 2008; 14:366-9.

Wijnhoven SW, Kool HJ, van Teijlingen CM, van Zeeland AA, Vrieling H. Loss of heterozygosity in somatic cells of the mouse. An important step in cancer initiation? **Mutat Res** 2001; 473:23-36.

Wilke CM, Guo SW, Hall BK, et al. Multicolor FISH mapping of YAC clones in 3p14 and identification of a YAC spanning both FRA3B and the t(3;8) associated with hereditary renal cell carcinoma. **Genomics** 1994; 22:319-26.

Wojdacz TK, Dobrovic A. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. **Nucleic acids Res** 2007; 35:e41.

Wojdacz TK, Dobrovic A, Algar EM. Rapid detection of methylation change at H19 in human imprinting disorders using methylation-sensitive high-resolution melting. **Hum Mutat** 2008; 29:1255-60.

Worm J, Aggerholm A, Guldborg P. In-tube DNA methylation profiling by fluorescence melting curve analysis. **Clin Chem** 2001; 47:1183-9.

Worsham MJ, Chen KM, Stephen JK, Havard S, Benninger MS. Novel approaches to global mining of aberrantly methylated promoter sites in squamous head and neck cancer. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2010; 143:116-21.

Wu ZS, Wu Q, Wang CQ, et al. MiR-339-5p inhibits breast cancer cell migration and invasion in vitro and may be a potential biomarker for breast cancer prognosis. **BMC Cancer** 2010; 10:542.

Wulczyn FG, Smirnova L, Rybak A, et al. Post-transcriptional regulation of the let-7 microRNA during neural cell specification. **FASEB J** 2007; 21:415-426.

Wyandt HE, Tonk VS, editors. **Atlas of human chromosome heteromorphisms**. Boston: Kluwer Academic Publishers; 2004. Plates; p.279.

Xu WS, Perez G, Ngo L, Gui CY, Marks PA. Induction of polyploidy by histone deacetylase inhibitor: a pathway for antitumor effects. **Cancer Res** 2005; 65:7832-9.

Yakut T, Schulten HJ, Demir A, et al. Assessment of molecular events in squamous and non-squamous cell lung carcinoma. **Lung Cancer** 2006; 54:293-301.

Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. **Cancer Cell** 2006; 9:189-98.

Yarbrough WG. The ARF-p16 gene locus in carcinogenesis and therapy of head and neck squamous cell carcinoma. **Laryngoscope** 2002; 112:2114-28.

Yeung AT, Patel BB, Li XM, et al. One-hit effects in cancer: altered proteome of morphologically normal colon crypts in familial adenomatous polyposis. **Cancer Res** 2008; 68:7579-86.

Yoshihara K, Tajima A, Adachi S, et al. Germline copy number variations in BRCA1-associated ovarian cancer patients. **Genes Chromosomes Cancer** 2011; 50:167-77.

Yu CC, Chen YW, Chiou GY, et al. MicroRNA let-7a represses chemoresistance and tumorigenicity in head and neck cancer via stem-like properties ablation. **Oral Oncol** 2011; 47:202-10.

Yu GP, Zhang ZF, Hsu TC, Spitz MR, Schantz SP. Family history of cancer, mutagen sensitivity, and increased risk of head and neck cancer. **Cancer Lett** 1999; 146:93-101.

Yu KK, Zanation AM, Moss JR, Yarbrough WG. Familial head and neck cancer: molecular analysis of a new clinical entity. **Laryngoscope** 2002; 112:1587-93.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. **Dev Biol** 2007; 302:1-12.

Zhang ZF, Morgenstern H, Spitz MR, et al. Environmental tobacco smoking, mutagen sensitivity, and head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2000; 9:1043-9.

Zhang ZF, Morgenstern H, Spitz MR, et al. Environmental tobacco smoking, mutagen sensitivity, and head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2000; 9:1043-9.

zur Hausen H. Papillomaviruses in human cancers. In: Rigby PWJ, Wilkie NM, editors. **Viruses and cancer**. Cambridge: Cambridge Univ. Press: 1986. p.83-90. (Society for General Microbiology Symposia).

zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. **Biochim Biophys Acta** 1996; 1288:F55-78.

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

**Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Procedimento:
Exerese de Carcinoma de Cabeça e Pescoço**

**HOSPITAL DO CÂNCER A.C. CAMARGO – SÃO PAULO - SP
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Você foi admitido neste hospital para exames ou cirurgia de cabeça e pescoço. Como parte do tratamento, você foi submetido a uma biópsia ou cirurgia, sendo prática rotineira a remoção de fragmentos que serão utilizados em exames clínicos laboratoriais necessários para um diagnóstico definitivo.

Para obter um maior conhecimento clínico e científico das neoplasias, o corpo clínico deste hospital (médicos e pesquisadores) desenvolve pesquisa clínica e científica. Por esta pesquisa será possível conhecer melhor os mecanismos da doença e portanto, futuramente, oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Ainda mais, este trabalho envolve a busca, nestas doenças, de novos genes ou alterações em genes já existentes.

Muitas destas pesquisas exigem material proveniente de tumores a fresco ao invés de células cultivadas em laboratório, pois estas não estão sob as mesmas influências que aquelas no corpo humano (hormônios, fatores de crescimento, outros). Assim, a obtenção de tecido é desejável e fundamental, bem como pequena amostra de sangue e tecido normal adjacente ao tumor. Os riscos são inerentes aos procedimentos.

Após a cirurgia ou biópsia, o seu médico irá remover um fragmento do tecido, que seria retirado de qualquer forma, sem prejuízo para o diagnóstico. O material biológico (sangue e fragmento de tecido coletado) foi congelado e posteriormente utilizado para pesquisa científica. A obtenção deste fragmento e da amostra de sangue não implicou em riscos adicionais na sua cirurgia e não implicou em aumento no tempo da operação, do exame, ou na extensão da cirurgia. O projeto de pesquisa “Caracterização do gene *PHF21B* como supressor tumoral em carcinomas de cabeça e pescoço” foi previamente apresentado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do hospital.

Este fragmento de tecido foi identificado no Banco de Tecidos do Depto. de Patologia, Hospital do Câncer A.C. Camargo, por códigos formados por números e letras e portanto sua privacidade e identidade foram preservadas. O tecido foi preservado no laboratório e poderá, sob os mesmos termos, ser utilizado em eventuais pesquisas futuras. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter o anonimato do paciente.

Concordando com o uso deste fragmento de tecido e do sangue periférico, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. Se você não concordar em doar o fragmento da peça para pesquisa, sua decisão não influenciará, de modo algum, o seu tratamento. Salientamos que você tem a

liberdade de retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa sem prejuízos a seu cuidado e que você terá direito de acesso sobre os eventuais resultados desta pesquisa e toda assistência necessária caso assim o desejar. Os pesquisadores estarão à sua disposição para quaisquer esclarecimentos e no endereço abaixo especificado.

Se o pesquisador principal não fornecer informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Coordenador do **Comitê de Ética do Hospital do Câncer** – SP, pelo telefone (11)2189-5000, ramal 1080 ou 5017.

Para quaisquer dúvidas entre em contato com o **Hospital do Câncer A.C. Camargo (HACC)** – Rua Prof. Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo/SP – CEP: 01509-900 – PABX: (11) 2189-5000.

NOME DO PACIENTE OU REPRESENTANTE LEGAL

ASSINATURA DO PACIENTE OU REPRESENTANTE LEGAL

DATA

MÉDICO RESPONSÁVEL

Profa. Dra. Silvia Regina Rogatto - Rua Prof. Antonio Prudente, 211 – Liberdade - São Paulo/SP – CEP: 01509-010 Fone: (11) 2189-5082 - e-mail: silvia.rogatto@hcancer.org.br
Fernanda Bernardi Bertonha - Rua Prof. Antonio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo/SP – CEP: 01509-010

Fone (11) 2189-5163 - e-mail: fernanda.bertonha@hcancer.org.br

Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski – Rua Prof. Antonio Prudente, 211 – Liberdade - São Paulo/SP – CEP: 01509-010

Fone: (11) 3341-0325 – e-mail: lp_kowalski@uol.com.br

Prof. Dr. Benedito Mauro Rossi – Rua Prof. Antonio Prudente, 211 – Liberdade - São Paulo/SP – CEP: 01509-010

Fone: (11) 3272-5000 R 5100 – e-mail: bmrossi@hcancer.org.br

Prof. Dr. Fernando Soares – Rua Prof. Antonio Prudente, 109, 1º andar - Liberdade - São Paulo/SP – CEP: 01509-010

Fone: (11) 2189-5185 – e-mail: fasoares@hcancer.org.br

Anexo 2 - Aprovação do projeto no Comitê de Ética e Pesquisa



**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 31 de Outubro de 2008.

À
Dra. Silvia Regina Rogatto

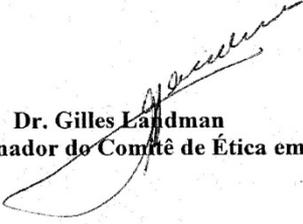
Ref.: Projeto de Pesquisa n.º. 792/06
"O Gene PHF21B como candidato a predisposição familiar em cânceres de cabeça e
pescoço".

Prezada Doutora:

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua última reunião de 28/10/2008, **tomaram conhecimento e aprovaram** a seguinte solicitação:

- Solicitação de dispensa da apreciação do estudo intitulado "Caracterização do gene *PHF21B* como supressor tumoral em carcinomas de cabeça e pescoço" em razão de este estudo estar inserido em projeto supracitado previamente aprovado por este comitê, carta datada de 08/10/2008.

Atenciosamente,


Dr. Gilles Landman
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 3 - Dados clínicos dos 102 pacientes com CCECP estudados. ID: identificação alternativa para os casos. VSD: vivo sem doença; MOC: morte por outras causas; MPD: morte pela doença; VSR: vivo sem recorrência; PS: perda de seguimento; A: Genotipagem HPV, B: qPCR no tumor, C: qPCR no sangue, D: Sequenciamento em 1 a 6 éxons, E: Análise de HRM, F: Análise de aCGH, G: Análise de miRNA.

ID	Caso	Escolaridade	Gênero	Cor	Idade	Sítio tumoral	Localização	Grau tumoral	TNM
1	36		M	Branco	39	Cavidade oral	Área retromolar direita	I	T4N2aM0
2	40	1º grau completo	M	Branco	68	Cavidade oral	Língua	I	T3N0M0
3	55		M	Branco	49	Cavidade oral	Soalho de boca	I	T2N0M0
4	75	Analfabeto	M	Branco	64	Cavidade oral	Soalho de boca+língua	I	T4N1M0
5	98	1º grau completo	M	Branco	64	Cavidade oral	Soalho de boca	II	T4N2cM0
6	104	1º grau incompleto	M	Branco	48	Cavidade oral	Soalho de boca+língua	I	T3N2aM0
7	115	Analfabeto	M	Branco	54	Cavidade oral	Língua+gengiva inferior+mandíbula	II	T4N1M0
8	128		M	Branco	46	Cavidade oral	Soalho de boca	I	T4N2bM0
9	178	Analfabeto	M	Pardo	53	Cavidade oral	Área retromolar	I	T3N0M0
10	202	1º grau incompleto	M	Negro	35	Cavidade oral	Língua	II	T4N0M0
11	204	1º grau incompleto	M	Branco	63	Cavidade oral	Região jugal	I	T4N0M0
12	207	1º grau incompleto	F	Branco	74	Cavidade oral	Língua	II	T2N0M0
13	208		M	Negro	39	Cavidade oral	Soalho de boca	I	T3N0M0
14	214	1º grau incompleto	M	Branco	43	Cavidade oral	Área retromolar	I	T3N1M0
15	229		M	Branco	63	Cavidade oral	Soalho de boca + rebordo gengival	II	T2N0M0
16	263	1º grau completo	F	Branco	87	Cavidade oral	Língua	II	T3N0M0
17	326		M		73	Cavidade oral	Língua	II	T2N0M0
18	336	1º grau incompleto	F	Branco	68	Cavidade oral	Lábio inferior	II	T2N0M0
19	339	1º grau incompleto	M	Branco	61	Cavidade oral	Soalho de boca+língua+gengiva	II	T4N1M0
20	343	Fundamental incompleto	M	Branco	55	Cavidade oral	Área retromolar direita	II	T2N0M0
21	349	1º grau completo	M	Branco	40	Cavidade oral	Soalho de boca	I	T4N2bM0
22	398	Superior completo	M	Branco	33	Cavidade oral	Língua	I	T1N0M0
23	547		M		56	Cavidade oral	Língua	II	T2N0M0
24	564		M		43	Cavidade oral	Língua	III	T2N1M0
25	565		M		61	Cavidade oral	Área retromolar		T3N1M0
26	578		M		50	Cavidade oral	Língua	III	T3N0M0
27	581		M		51	Cavidade oral	Área retromolar	III	T3N0M0

28	586		M		62	Cavidade oral	Língua	I	T4N1M0
29	588		F		86	Cavidade oral	Língua	I	T2N0M0
30	600		M		39	Cavidade oral	Língua	II	T3N1M0
31	BT 881		F		48	Cavidade oral	Soalho de boca	II	T1N0M0
32	BT1215		F		73	Cavidade oral	Língua	I	TxNXM0
33	BT1287		F		68	Cavidade oral	Língua	I	T3N0M0
34	BT1426		M		66	Cavidade oral	Língua	I	T4N1M0
35	BT878		F		48	Cavidade oral	Língua	III	T3N1M0
36	27.1		M	Pardo	56	Cavidade oral	Gengiva inferior direita	I	T4N1M0
37	58.1	2º grau completo	M	Branco	55	Cavidade oral	Lábio inferior	II	T1N0M0
38	61.1		M	Branco	68	Cavidade oral	Soalho de boca	II	T3N0M0
39	74	Fundamental incompleto	M	Branco	68	Orofaringe	Loja amigdaliana	II	T1N0M0
40	92	1º grau completo	M	Branco	52	Orofaringe	Valécula	II	T3N3M0
41	114	1º grau completo	M	Branco	44	Orofaringe	Úvula	II	T4N0M0
42	168		M	Branco	68	Orofaringe	Faringe	II	T3N3M0
43	169	1º grau completo	M	Branco	78	Orofaringe	Loja amigdaliana direita	I	T3N1aM0
44	328		M	Branco	55	Orofaringe	Loja amigdaliana esquerda	I	T2N0M0
45	334	Superior completo	M	Branco	48	Orofaringe	Loja amigdaliana esquerda	II	T3N0M0
46	338		M	Negro	48	Orofaringe	Valécula+base de língua+supraglote	II	T2N2cM0
47	348	1º grau incompleto	F	Branco	47	Orofaringe	Loja amigdaliana direita	III	T4N2M0
48	576		M		37	Orofaringe	Orofaringe		T3N1M0
49	584		M		70	Orofaringe	Loja amigdaliana		T2N1M0
50	BT1475	1º grau completo	M	Branco	66	Orofaringe	Base de língua	III	T3N1M0
51	26.1	1º grau completo	M	Pardo	53	Orofaringe	Palato mole esquerdo	II	T3N0M0
52	67.1	Superior completo	M	Branco	69	Orofaringe	Tonsila	II	T2N2M0
53	72.1		M	Pardo	73	Orofaringe	Base de língua	II	T3N0M0
54	74.1		M	Pardo	51	Orofaringe	Base de língua	II	T4N1M0
55	53	2º grau incompleto	M	Branco	45	Hipofaringe	Seio piriforme	II	T3N3M0
56	71	2º grau completo	M		61	Hipofaringe	Seio piriforme	III	T4N3M0
57	244		M	Branco	61	Hipofaringe	Seio piriforme	II	T3N3M0
58	261	1º grau completo	M		39	Hipofaringe	Seio piriforme	I	T2N1M0
59	605		M		57	Hipofaringe	Seio piriforme	III	T3N1M0
60	606		M		42	Hipofaringe	Seio piriforme	II	T3N1M0

61	638		M		38	Hipofaringe	Seio piriforme	II	T3N2M0
62	640		M		61	Hipofaringe	Seio piriforme		T3N1M0
63	72	1º grau completo	F	Branco	76	Laringe	Transglote (infra e supra)	II	T3N0M0
64	91	2º grau completo	M	Branco	38	Laringe	Transglote	II	T3N0M0
65	163	Superior completo	M	Branco	51	Laringe	Glote+infraglote	I	T3N1M0
66	212	1º grau completo	M	Pardo	64	Laringe	Epiglote	II	T3N0M0
67	242	1º grau completo	M	Branco	49	Laringe	Transglote	I	T3N0M0
68	324		F		57	Laringe	Laringe	I	T4N0M0
69	331		F		71	Laringe	Epiglote	III	T1N0M0
70	353	1º grau incompleto	M	Branco	72	Laringe	Corda vocal direita	I	T1aN0M0
71	579		M		63	Laringe	Ventrículo de Morgani	II	T3N2M0
72	585		F		43	Laringe	Supraglote		T3N0M0
73	587		M		57	Laringe	Supraglote	III	T4N0M0
74	603		M		73	Laringe	Corda vocal	II	T1N0M0
75	637		F		76	Laringe	Corda vocal		T2bN0M0
76	2.1		M		47	Cavidade oral	Região jugal	II	
77	14.1		M		62	Cavidade oral	Língua		
78	19.1		F		41	Cavidade oral	Língua	II	T2N3M0
79	37.1	2º grau completo	M	Branco	53	Cavidade oral	Soalho de boca	I	T2N3M0
80	44.1		M		62	Cavidade oral	Soalho de boca+gengiva inferior	II	T2pN0cM0
81	45.1		M		59	Cavidade oral	Soalho de boca	I	T2N0M0
82	51.1		F		61	Cavidade oral	Área retromolar	I	
83	54.1		M	Branco	56	Cavidade oral	Mucosa Jugal	II	T4N2M0
84	59.1		M		64	Cavidade oral	Base de língua	I	pT4N2cM0
85	60.1		M	Branco	65	Cavidade oral	Língua	II	T2N1M0
86	73.1		F	Amarelo	78	Cavidade oral	Língua		T2N0M0
87	100.1		F	Branco	72	Cavidade oral	Mucosa Jugal	I	T4aN0M0
88	103.1		F	Branco	28	Cavidade oral	Borda de língua+soalho de boca	II	T2M0N0
89	66	Superior completo	M	Branco	61	Cavidade oral	Língua+soalho de boca+mandíbula	I	T4N0M0
90	436		M		61	Cavidade oral	Língua	II	T3N2M0
91	8.1	2º grau completo	M	Branco	58	Orofaringe	Amígdala+língua		T3N0M0
92	15.1		M		58	Orofaringe	Palato mole	I	T2N0M0
93	43.1	2º grau completo	M	Branco	51	Orofaringe	Loja amigdaliana	II	T3N2M0

94	84.1		M		49	Orofaringe	Orofaringe	II	
95	11.1		M	Branco	57	Hipofaringe	Seio piriforme	II	T3N3M0
96	13.1		M	Branco	65	Hipofaringe	Seio piriforme	III	T4N2cM0
97	65.1		F		63	Hipofaringe	Seio piriforme	II	
98	1.1	2º grau completo	F	Amarelo	90	Laringe	Infraglote	I	T2N2aM0
99	28.1		F		71	Laringe	Epiglote+subglote	II	T4N0M0
100	70.1		M		58	Laringe	Cordas vocais		T3N0M0
101	71.1		M		59	Laringe	Cordas vocais	I	T4N0M0
102	583		M		49	Laringe	Corda vocal		T2N0M0

Cont/ Anexo 3 - Dados clínicos dos 102 pacientes com CCECP estudados. VSD: vivo sem doença; MOC: morte por outras causas; MPD: morte pela doença; VSR: vivo sem recorrência; PS: perda de seguimento; A: Genotipagem HPV, B: qPCR no tumor, C: qPCR no sangue, D: Sequenciamento em 1 a 6 éxons, E: Análise de HRM, F: Análise de aCGH, G: Análise de miRNA.

Amostra	Estadio clínico	Radioterapia	Quimioterapia	Tabaco	Álcool	Tabaco+álcool	followup	Sobrevida (meses)
36	4	sim	sim	sim	sim	sim	MPD	13,9
40	3	sim	não	sim	sim	sim	MPD	109,6
55	2	não	não	sim	sim	sim	vivo, PS	114,6
75	4	sim	não				vivo, PS	150,6
98	4	sim	não	sim	sim	sim	MPD	16,5
104	4	sim	não	sim	sim	sim	MPD	8,3
115	4	sim	não	sim	sim	sim	MPD	15,8
128	4	sim	não	sim	sim	sim	MPD	7,8
178	3	sim	não	sim	sim	sim	MPD	12,6
202	4	sim	sim	não	sim	não	MPD	6,4
204	4	não	não	sim	sim	sim	vivo, PS	13,9
207	2	não	não	não	não	não	MPD	109,6
208	3	sim	não	sim	sim	sim	MPD	5,4
214	3	sim	não	sim	sim	sim	MPD	46,4
229	2	não	não	não	sim	não	MOC	125,5
263	3	sim	não	sim	não	não	MPD	35,8
326	2						PS	21,3
336	2	não	não	não	não	não	VSD	173,8

339	4	sim	sim	sim	sim	sim	vivo, PS	146,0
343	2	sim	não	sim	sim	sim	VSD	177,3
349	4	sim	não	sim	sim	sim	MPD	4,5
398	1	não	não	não	sim	não	VSD	162,0
547	2						PS	43,3
564	3						MPD	26,5
565	3						MOC	0,6
578	3						MOC	16,2
581	3						MPD	76,2
586	4						MOC	4,3
588	2						MOC	19,9
600	3						VSR	77,3
BT 881	1			sim	sim	sim	VSR, PS	33,5
BT1215							VSR, PS	84,5
BT1287	3						VSR, PS	36,8
BT1426	4			sim	sim	sim	morto, PS	14,6
BT878	3						MPD	3,1
27.1	4	sim	não	sim	sim	sim	VSD	19,8
58.1	1	não	não	sim	sim	sim	VSD	66,1
61.1	3	sim	sim	sim	não	não	MOC	31,4
74	2	sim	não	sim	sim	sim	PS	10,5
92	4	sim	sim	sim	sim	sim	MPD	5,0
114	4	não	não	sim	sim	sim	MPD	13,8
168	4	sim	não	sim	sim	sim	MPD	6,9
169	3	sim	não	sim	sim	sim	MPD	3,7
328	2	não	não	sim	não	não	MPD	85,3
334	3	sim	não	sim	sim	sim	vivo, PS	115,9
338	4	sim	não	sim	sim	sim	MPD	147,4
348	4	sim	não	não	não	não	MPD	41,0
576	3						VSR	77,4
584	3						MOC	132,0
BT1475	3	sim	não	não	não	não	MPD	14,7
26.1	3	sim	sim	sim	sim	sim	VSD	54,8

67.1	4	sim - pós biópsia	sim - pós biópsia	não	sim	não	VSD	13,7
72.1	3	sim - pós biópsia	sim - pós biópsia	sim	não	não	VSD	23,8
74.1	4	sim - pós biópsia	sim - pós biópsia	sim	sim	sim	VSD	24,5
53	4	sim	sim	sim	sim	sim	MPD	7,8
71	4	sim	não	sim	sim	sim	MPD	31,9
244	4	sim	sim	sim	sim	sim	MPD	28,1
261	3	sim	não	sim	sim	sim	VSD	185,0
605	3						MPD	8,3
606	3						VSR, PS	33,1
638	4						MPD	12,2
640	3						MOC	24,7
72	3	não	sim	não	não	não	MOC	0,2
91	3	não	sim	sim	sim	sim	MOC	43,6
163	3	não	não	sim	sim	sim	MPD	47,3
212	3	não	não	sim	sim	sim	VSD	176,9
242	3	não	não	sim	sim	sim	OS	71,0
324	4						PS	108,0
331	1		sim	sim		não	vivo	165,2
353	1	sim	não	não	sim	não	VSD	168,2
579	4						MOC	7,2
585	3						VSR	80,0
587	4						VSR	80,8
603	1						MPD	8,1
637	2						VSR	25,3
2.1	1	não	não	sim	sim	sim	VSD	
14.1	3	sim	não	sim	sim	sim	VSD	
19.1	4	sim	não	não	não	não	VSD	15,4
37.1	4	sim	não	sim	sim	sim	VSD	
44.1	1	não	não	sim	sim	sim	VSD	20,0
45.1	2	não	não	sim	sim	sim	VSD	74,6
51.1	2	não	não	sim	sim	sim	VSD	
54.1	4	sim	sim	sim	sim	sim	MPD	14,6
59.1	4	sim	sim	sim	sim	sim	MOC	4,7

60.1	3	sim	não	sim	sim	sim	VSD	42,1
73.1	2	sim	não	não	não	não	VSD	42,6
100.1	4	sim	não	não	não	não	VSD	0,5
103.1	2	sim	não	não	sim	não	VSD	11,5
66	4	sim	não	não	sim	não	MPD	8,7
436	4						PS	
8.1	3	sim - pós biópsia	sim - pós biópsia	sim	sim	sim	VSD	80,6
15.1	2	não	não	sim	sim	sim	VSD	35,3
43.1	4	sim	sim	não	sim	não	VSD	65,2
84.1	4	sim - pós biópsia	sim - pós biópsia	sim	não	não	VSD	
11.1	4	não	sim - pós biópsia	sim	sim	sim	VCD	6,0
13.1	4	sim	sim	sim	sim	sim	VSD	29,2
65.1	4	sim	não	sim	sim	sim	VSD	
1.1	4	sim - pós biópsia		não	não	não	MPD	20,1
28.1	4	sim	não	não	não	não	VSD	22,5
70.1	3	sim - pós biópsia	sim - pós biópsia	sim	sim	sim	VSD	16,3
71.1	4	sim	não	sim	sim	sim	VSD	104,1
583	2						VSR	77,0
203	4	sim	não	sim	sim	sim	MPD	30,1
582	3						MPD	38,4
575	4						MPD	26,2

Cont/ Anexo 3 - Dados clínicos dos 102 pacientes com CCECP estudados. VSD: vivo sem doença; MOC: morte por outras causas; MPD: morte pela doença; VSR: vivo sem recorrência; PS: perda de seguimento; A: Genotipagem HPV, B: qPCR no tumor, C: qPCR no sangue, D: Sequenciamento em 1 a 6 éxons, E: Análise de HRM, F: Análise de aCGH, G: Análise de miRNA.

Amostra	História familiar	História em 1º grau	História CP 1º grau	1 critério	2 critérios
36	não	não	não	sim	não
40	Irmã/mama (bilateral)	sim	não	sim	não
55	não	não	não	não	não
75	Tio/boca	não	não	não	não
98	Avó/útero	não	não	não	não
104	Avô/esôfago	não	não	não	não

115	Pai/laringe; irmã/mama; Irmão/pulmão	sim	sim	sim	não
128	Tio/câncer gástrico; tio/garganta	não	não	não	não
178	Irmão/esôfago; irmão/não determinado	sim	não	sim	não
202	Primo/estômago	não	não	sim	não
204	Irmã/útero	sim	não	sim	não
207	Pai/melanoma; Avó/cólo uterino	sim	não	sim	sim
208	não	não	não	sim	não
214	avó/esôfago; tio/laringe	não	não	sim	não
229	Irmão/não determinado	sim		sim	não
263	Irmão/pulmão	sim	não	sim	não
326	não	não	não	não	não
336	não	não	não	sim	não
339	Irmão/esôfago	sim	não	sim	não
343	Irmã/mama; mãe/intestino	sim	não	sim	não
349	não	não	não	sim	não
398	Mãe/melanoma	sim	não	sim	sim
547	não	não	não	não	não
564				sim	não
565				não	não
578				não	não
581				não	não
586				não	não
588				não	não
600				sim	não
BT 881	não	não	não	não	não
BT1215	não	não	não	não	não
BT1287	não	não	não	não	não
BT1426	não	não	não	não	não
BT878	não	não	não	não	não
27.1	Irmã/cólon; irmã/tireóide	sim	não	sim	não
58.1	Pai/língua	sim	sim	sim	não
61.1	Mãe/mama; filho/estômago	sim	não	sim	não
74	Irmão/laringe	sim	sim	sim	não

92	Pai/boca; mãe/garganta	sim	sim	sim	não
114	não	não	não	sim	não
168	Pai/pâncreas; irmão/pulmão	sim	não	sim	não
169	Pai e irmão/câncer gástrico	sim	não	sim	não
328	Pai/garganta	sim	sim	sim	não
334	Pai/cólon; mãe/esôfago	sim	não	sim	não
338	Irmão/garganta	sim	sim	sim	não
348	não	não	não	sim	não
576				sim	não
584				não	não
BT1475	não	não	não	sim	não
26.1	Mãe/útero; irmã/cólon	sim	não	sim	não
67.1	Irmão/pulmão	sim	não	sim	não
72.1	Irmão/esôfago	sim	não	sim	não
74.1	Pai/próspata; irmão e tio/garganta; mãe/pâncreas	sim	sim	sim	não
53	Mãe/mama; Tias/mama	sim	não	sim	sim
71	Tio/bexiga	não	não	não	não
244	Avó/intestino	não	não	não	não
261	não	não	não	sim	não
605				não	não
606				sim	não
638				sim	não
640	Sobrinha/linfoma; pai/intestino; irmã/intestino; 2 irmãos/câncer pele não melanoma	sim	não	não	não
72	não	não	não	sim	não
91	Avó/garganta	não	não	sim	não
163	Tio/câncer gástrico; mãe/endometriose	sim	não	não	não
212	não	não	não	não	não
242	Mãe/intestino	sim	não	sim	não
324	Irmão/não determinado	sim		sim	não
331	Tio/garganta	não	não	não	não
353	Mãe e 3 irmãs/cólo uterino	sim	não	sim	não
579				não	não
585				sim	não

587				não	não
603				não	não
637	não	não	não	não	não
2.1	Irmã/mama; tio/esôfago; outro/pâncreas	sim	não	sim	não
14.1	Irmão/boca	sim	sim	sim	não
19.1	Tia/mama	não	não	sim	sim
37.1	Pai/cólon; mãe/útero; outro/cólon	sim	não	sim	não
44.1	Irmão/laringe	sim	sim	sim	não
45.1	Irmã/útero	sim	não	sim	não
51.1	Pai/bexiga; irmão/próstata; irmão/pescoço (?); irmão/pâncreas; irmão/esôfago	sim	sim	sim	não
54.1	Pai/fígado	sim	não	sim	não
59.1	Mãe e filha/útero	sim	não	sim	não
60.1	Irmão/boca e garganta	sim	sim	sim	não
73.1	Pai/estômago; mãe/mama	sim	não	sim	sim
100.1	Mãe/útero	sim	não	sim	sim
103.1	Tio/boca; outro/cólon	não	não	sim	sim
66	irmão/sarcoma de rim	sim	não	sim	não
436	Irmãos/cólon e esôfago	sim	não	sim	não
8.1	Mãe/cólon; tio/boca; primo/estômago	sim	não	sim	não
15.1	Tio/boca	não	não	não	não
43.1	Tio/estômago	não	não	sim	não
84.1	Irmão/linfoma; tia/mama	sim	não	sim	não
11.1	Tio/pulmão; tio/estômago; tio/estômago; primo/boca; outro/estômago	não	não	não	não
13.1	Pai/estômago; irmão/rim	sim	não	sim	não
65.1	Pai/boca e garganta; irmão/pulmão; tio/cólon	sim	sim	sim	não
1.1	Filha/mama	sim	não	sim	sim
28.1	Mãe/útero	sim	não	sim	sim
70.1	Irmão/boca; tio/estômago; tia/mama	sim	sim	sim	não
71.1	Pai/cólon; outro/esôfago	sim	não	sim	não
583				não	não
203	Pai/esôfago	sim	não	sim	sim
582				não	não
575				não	não

Cont/ Anexo 3 - Dados clínicos dos 102 pacientes com CCECP estudados. VSD: vivo sem doença; MOC: morte por outras causas; MPD: morte pela doença; VSR: vivo sem recorrência; PS: perda de seguimento; A: Genotipagem HPV, B: qPCR no tumor, C: qPCR no sangue, D: Sequenciamento em 1 a 6 éxons, E: Análise de HRM, F: Análise de aCGH, G: Análise de miRNA.

Amostra	Recorrência	2º tu primário	Metástase linfonodal	Invasão perineural	Invasão vascular sanguínea
36	sim		sim	sim	sim
40	não	não	não	sim	não
55	sim	não	não	sim	não
75	sim	sim	não	sim	não
98	sim	não	sim	sim	não
104	não	não	sim	sim	sim
115	não	não	sim	não	não
128	não	não	sim	sim	não
178	sim	não	sim	sim	não
202	sim	não	não	sim	não
204	não	não	não	não	não
207	sim	sim	não	não	não
208	sim	não	sim	sim	não
214	sim	não	não	sim	não
229	não	não	não	sim	não
263	sim	não	não	não	não
326					
336	não	sim	não	não	não
339	não	não	sim	sim	não
343	sim	sim	não		
349	sim	não	sim	não	não
398	sim	não	não	não	não
547					
564					
565					
578					
581					
586					

588					
600					
BT 881					
BT1215					
BT1287					
BT1426					
BT878					
27.1	não			não	não
58.1	não			não	não
61.1	sim			sim	sim
74	sim	sim	sim	não	não
92	não	não	sim	não	não
114	não	sim	não	não	não
168	não	não	sim	não	não
169	não	não	sim	sim	não
328	sim		não	não	não
334	não	não	não	não	não
338	não	não	sim	não	não
348	não	não	sim	não	não
576					
584					
BT1475	sim			sim	não
26.1	não			não	não
67.1	não				
72.1	não				
74.1	sim				
53	não	não	sim	não	sim
71	não	sim	sim	sim	
244	não	sim	sim	não	não
261	não	não	sim	sim	não
605					
606					
638					

640					
72	não	não	não		
91	não	não	não	sim	não
163	não	sim	sim	não	não
212	não	não	não	não	não
242	não	não	não	não	não
324					
331	não	sim			
353	não	não			
579					
585					
587					
603					
637					
2.1	não			não	não
14.1	sim				
19.1	não		sim	sim	não
37.1	não			não	sim
44.1	não			não	não
45.1	não		não	não	não
51.1	não			não	não
54.1	sim		sim	sim	não
59.1	não			sim	não
60.1	não			não	sim
73.1	não			não	não
100.1	não			sim	não
103.1	não			não	sim
66	não	não	sim	sim	não
436					
8.1	não				
15.1	não	sim		não	não
43.1	não			não	não
84.1	não			não	não

11.1	sim				
13.1	não			sim	não
65.1	não			sim	não
1.1	sim			não	não
28.1	não			sim	não
70.1	não				
71.1	não		não	sim	não
583					
203	não	não	sim		
582					
575					

Cont/ Anexo 3 - Dados clínicos dos 102 pacientes com CCECP estudados. VSD: vivo sem doença; MOC: morte por outras causas; MPD: morte pela doença; VSR: vivo sem recorrência; PS: perda de seguimento; A: Genotipagem HPV, B: qPCR no tumor, C: qPCR no sangue, D: Sequenciamento em 1 a 6 éxons, E: Análise de HRM, F: Análise de aCGH, G: Análise de miRNA.

Amostra	Invasão vascular linfática	Margens cirúrgicas livres	Metodologias Aplicadas
36	sim	sim	B
40	sim	sim	BCD
55	não	sim	ABCD
75	não	sim	BCD
98	sim	sim	BE
104	sim	sim	AB
115	sim	sim	AB
128	sim	sim	ABCDE
178	sim	sim	ABCDE
202	não	sim	B
204	não	sim	B
207	não	sim	ABCDEF
208	não	sim	ABCE
214	não	sim	B
229	não	sim	ABCDEF
263	não	sim	BC

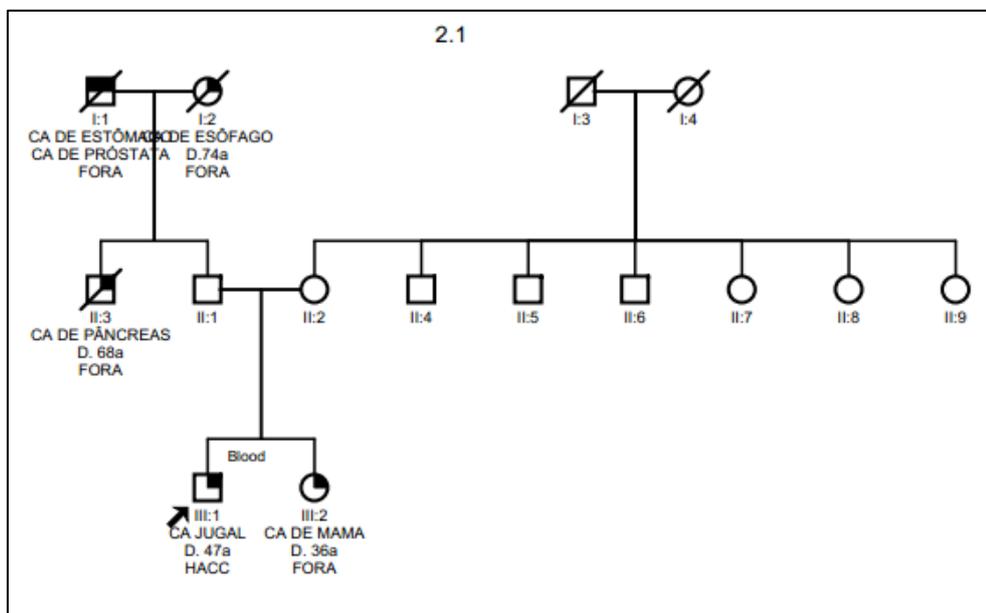
326			ABDE
336	não	sim	ABCD
339	não	sim	ABCDEF
343		sim	ABE
349	não	sim	ABDE
398	não	sim	ABCDE
547			BC
564			ABCE
565			ABCE
578			ABCE
581			ABCDE
586			BCDE
588			ABCDE
600			ABCDE
BT 881			AB
BT1215			BD
BT1287			ABCDE
BT1426			ABCDE
BT878			BCDE
27.1	não	sim	ABCEF
58.1	não	sim	ABEFG
61.1	sim	sim	ABCEFG
74	sim	não	B
92	sim	sim	BC
114	não	sim	ABCDE
168	não	não	ABCDEF
169	sim	sim	ABD
328	não	sim	AB
334	sim	sim	AB
338	sim	sim	ABE
348	não	sim	ABDE
576			ABC
584			ABC

BT1475	não	sim	ABCDE
26.1	sim	sim	ABCFG
67.1			ABCEF
72.1			ABCFG
74.1			ABCFG
53	sim	sim	ABCDEF
71	sim	sim	AB
244	não	sim	AB
261	sim	sim	ABE
605			ABCE
606			ABCDE
638			ABC
640			ABC
72		sim	BD
91	não	sim	ABC
163	sim	sim	ABCD
212	não	sim	ABD
242	não	sim	AB
324			AB
331			BCD
353			ABCDE
579			ABCE
585			AB
587			ABC
603			ABCDE
637			ABCD
2.1	não		AF
14.1			FG
19.1	não	não	G
37.1	sim	sim	G
44.1	não	sim	G
45.1	não	sim	G
51.1	não		AFG

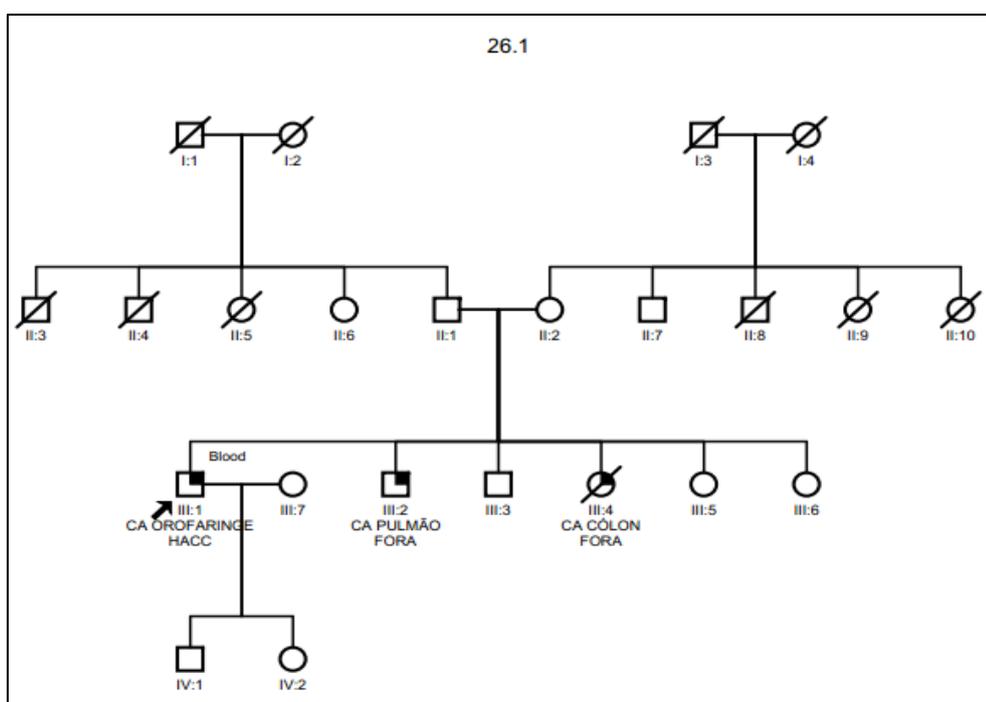
54.1	não	não	G
59.1	não	sim	G
60.1	sim	sim	G
73.1	não	sim	G
100.1	não	sim	G
103.1	sim	sim	G
66	sim	sim	ADF
436			
8.1			G
15.1	não	sim	G
43.1	não	sim	G
84.1	não		FG
11.1			G
13.1	não	sim	G
65.1	não		AFG
1.1	não		G
28.1	não	sim	G
70.1			G
71.1	não	sim	G
583			A
203		sim	CD
582			C
575			AC

Anexo 4 - Exemplos de heredogramas de sete famílias com história de câncer de cabeça e pescoço e cânceres relacionados.

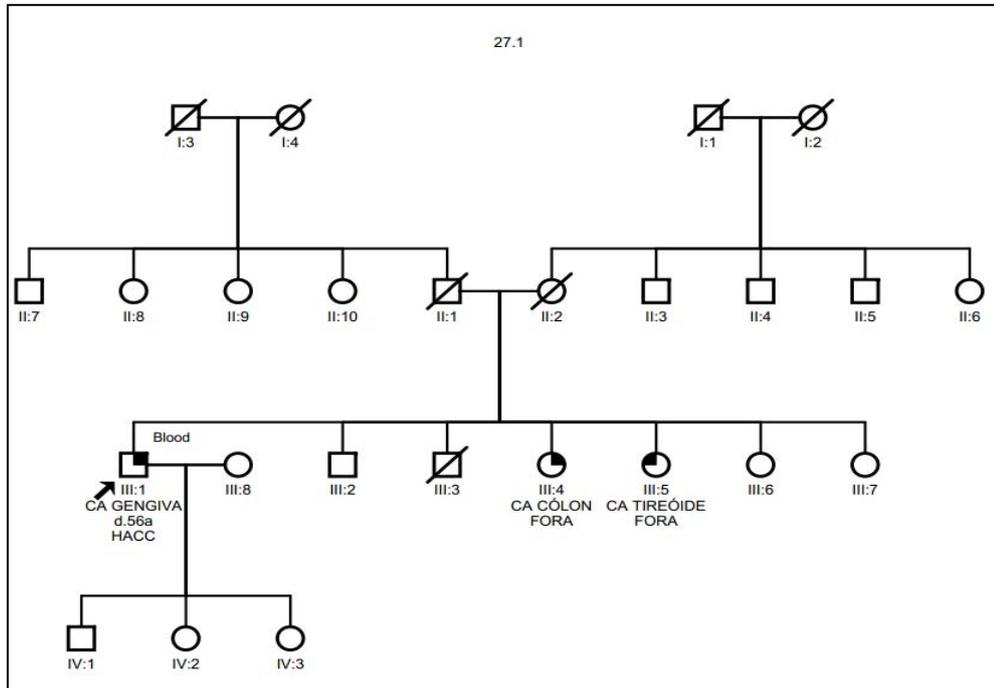
Caso 2.1



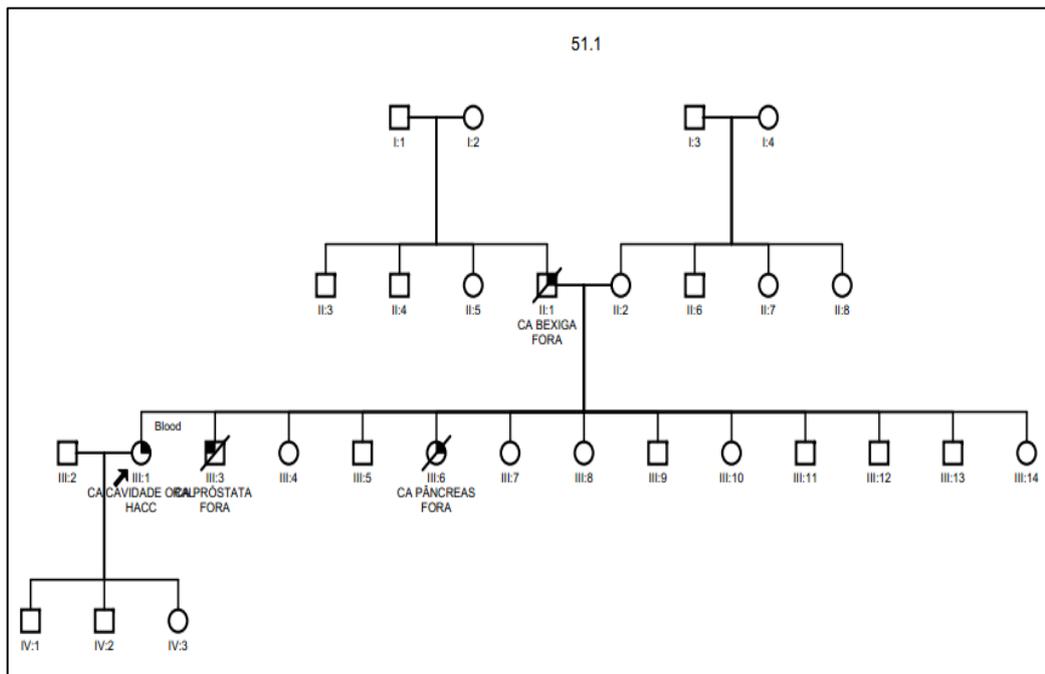
Caso 26.1



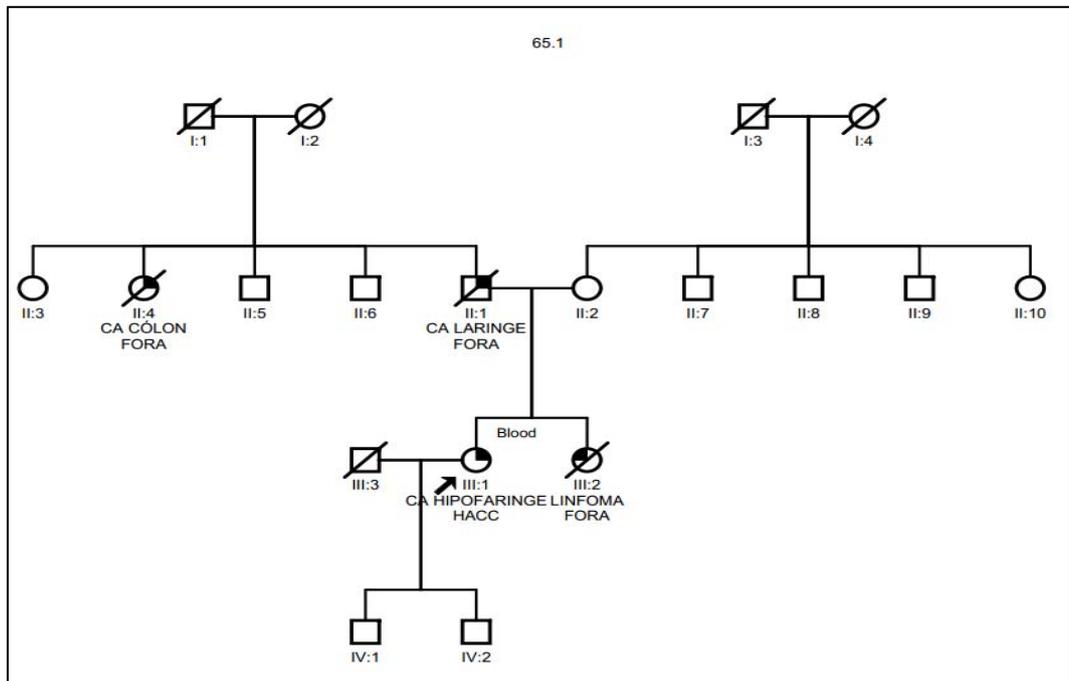
Caso 27.1



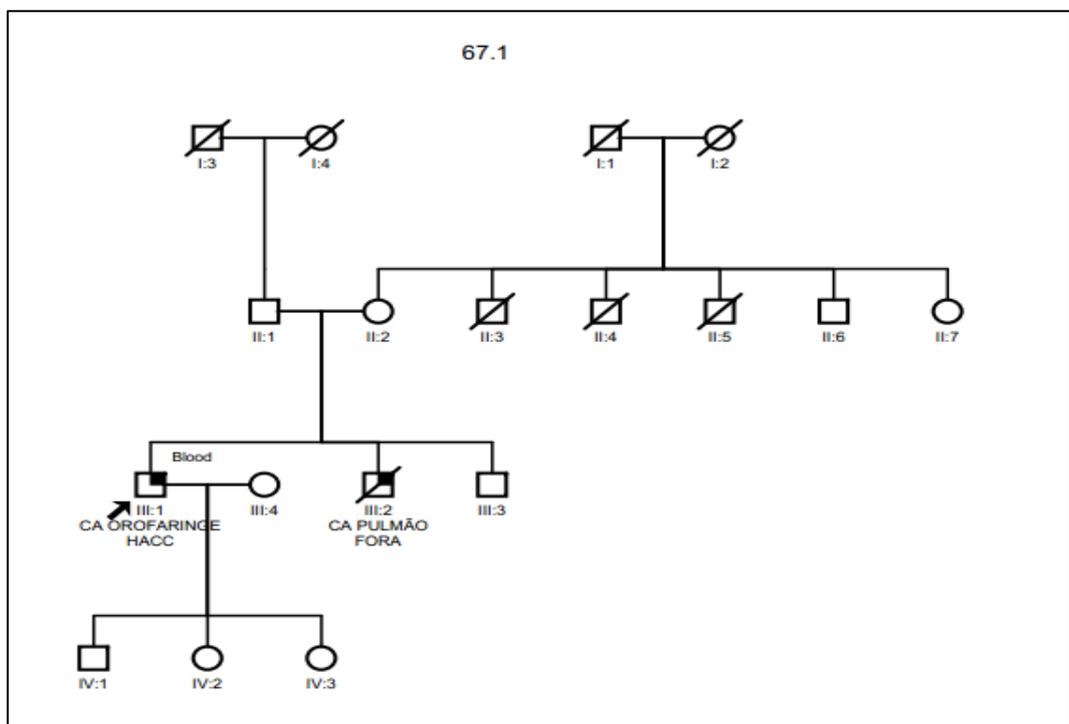
Caso 51.1



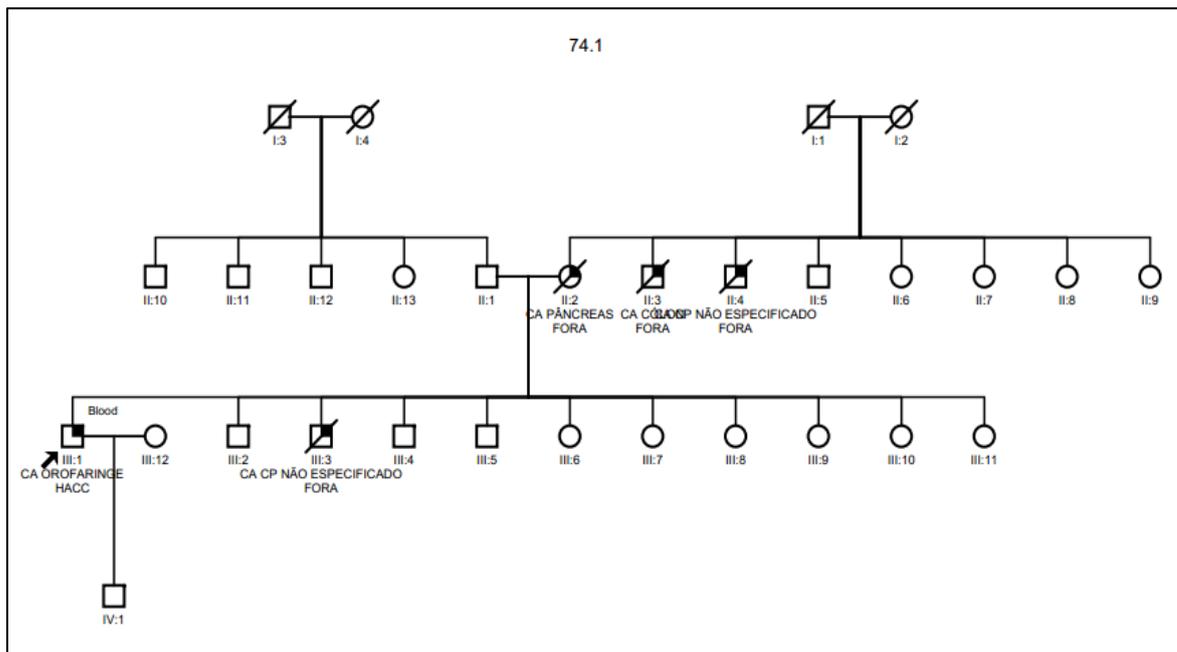
Caso 65.1



Caso 67.1



Caso 74.1



Anexo 5 - Parâmetros de qualidade (QC Metrics), fornecidos pela Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA), a serem seguidos após os experimentos de marcação, hibridação e extração dos dados de aCGH.

Parâmetro	O que avalia	Excelente	Bom	Ruim
<i>BGNoise</i>	Desvio padrão dos sinais verde e vermelho subtraídos do <i>background</i>	<5	5-10	>10
<i>Signal Intensity</i>	Mediana de sondas não controle dos sinais verde e vermelho subtraídos do <i>background</i>	>150	50-150	< 50
<i>Signal to Noise</i>	Razão da mediana da intensidade do sinal ao <i>background</i> verde e vermelho	> 100	30-100	< 30
<i>Reproducibility</i>	Mediana do coeficiente de variação das replicatas de sondas não controle dos sinais verde e vermelho subtraídos do <i>background</i>	< 0.05	0.05-0.2	> 0.2
<i>DLRSpread</i>	Indicador de barulho para razões de <i>baseline</i>	< 0.2	0.2-0.3	> 0.3

Anexo 6 - Parâmetros utilizados na análise dos dados de aCGH pelo *Software Nexus 6.0*).

Parâmetro	Valor
Analysis	
<i>Significance Threshold</i>	5.0E ⁻⁴
<i>Max Contiguous Probe Spacing (Kbp)</i>	1000
<i>Min number of probes per segment</i>	3
<i>High Gain</i>	1.0
<i>Gain</i>	0.4
<i>Loss</i>	-0.4
<i>Big Loss</i>	-1.2
<i>3:1 sex chromosomes gain</i>	1.2
<i>4:1 sex chromosomes gain</i>	1.7
Robust Variance Sample QC Calculation	
<i>Percent Outliers to remove</i>	3.0

Anexo 7 - Variáveis clínico-patológicas avaliadas nos 102 pacientes com CCECP.

Variável	Nº pacientes	%	Mediana (mínimo-máximo)
Idade			
≤ 45 anos	18	17,6%	
> 45 anos	84	82,4%	
Raça			
Branco	47	46,1%	
Não branco	11	10,8%	
Nd	44	43,1%	
Educação			
Analfabeto	3	2,9%	
Ensino fundamental incompleto	11	10,8%	
Ensino fundamental completo	13	12,7%	
Ensino médio incompleto	1	1,0%	
Ensino médio completo	7	6,9%	
Ensino superior incompleto	0	0,0%	
Ensino superior completo	5	4,9%	
Nd	62	60,8%	
Seguimento (meses)			28,1 (0,20 a 185)
História familiar em 1º grau			
Sim	51	50,0%	
Não	34	33,3%	
Nd	17	16,7%	
História familiar de CCECP em 1º grau			
Sim	9	11,8%	
Não	71	69,6%	
Nd	19	18,6%	
Estádio clínico			
I	7	7,8%	
II	17	16,7%	
III	34	33,3%	
IV	42	41,2%	
Nd	1	1,0%	
Grau histológico			
I	34	33,3%	
II	46	45,1%	
III	11	10,8%	
IV	0	0,0%	
Nd	11	10,8%	
Radioterapia			
Sim (adjuvante)	46	45,1%	
Neoadjuvante	7	6,9%	
Não	20	19,6%	
Nd	29	28,4%	

Quimioterapia		
Sim (adjuvante)	15	14,7%
Neoadjuvante	7	6,9%
Não	51	50,0%
Nd	29	28,4%
Invasão perineural		
Presente	28	27,5%
Ausente	35	34,3%
Nd	39	38,2%
Invasão vascular sanguínea		
Presente	7	6,9%
Ausente	55	53,9%
Nd	40	39,2%
Invasão vascular linfática		
Presente	22	21,6%
Ausente	41	40,2%
Nd	39	38,2%
Margens cirúrgicas livres		
Sim	56	54,9%
Não	4	3,9%
Nd	42	41,2%
Comprometimento linfonodal		
Sim	23	22,5%
Não	21	20,6%
Nd	58	56,9%
Recidiva		
Sim	22	21,6%
Não	52	51,0%
Nd	28	27,5%
Segundo tumor primário		
Sim	11	10,8%
Não	30	29,4%
Nd	61	59,8%
<i>Nd: Informação não disponível</i>		

Anexo 8 - Resultados da análise de qPCR para o gene *PHF21B* nas 75 amostras tumorais avaliadas.* casos HPV16 positivos.

Amostra	Sítio tumoral	História familiar em 1º grau	História familiar de CCECP em 1º grau	Pelo menos 1 dos critérios	qPCR tumor	Status tumor
36	oral	0	0	+	0,63	P
40	oral	+	0	+	0,67	P
55	oral	0	0	0	1,40	N
75	oral	0	0	0	0,54	P
98	oral	0	0	0	0,87	N
104	oral	0	0	0	1,28	N
115	oral	+	+	+	0,36	P
128	oral	0	0	0	0,77	N
178	oral	+	0	+	1,08	N
202	oral	0	0	+	0,89	N
204	oral	+	0	+	0,26	P
207	oral	+	0	+	0,62	P
208	oral	0	0	+	0,63	P
214	oral	0	0	+	0,23	P
229	oral	+	nd	+	0,65	P
263	oral	+	0	+	0,25	P
326	oral	0	0	0	0,61	P
336	oral	0	0	+	0,69	N
339	oral	+	0	+	0,51	P
343	oral	+	0	+	0,65	P
349*	oral	0	0	+	0,65	P
398	oral	+	0	+	0,64	P
547	oral	0	0	0	0,40	P
564	oral	nd	nd	+	0,72	N
565	oral	nd	nd	0	0,84	N
578	oral	nd	nd	0	0,64	P
581	oral	nd	nd	0	0,51	P
586	oral	nd	nd	0	0,48	P
588	oral	nd	nd	0	0,95	N
600	oral	nd	nd	+	0,84	N
BT 881	oral	0	0	0	0,41	P
BT1215	oral	0	0	0	1,13	N
BT1287	oral	0	0	0	0,74	N
BT1426	oral	0	0	0	1,29	N
BT878	oral	0	0	0	0,63	P
27.1	oral	+	0	+	0,46	P
58.1	oral	+	+	+	1,11	N
61.1	oral	+	0	+	1,08	N
74	orofaringe	+	+	+	0,53	P
92	orofaringe	+	+	+	0,88	N
114	orofaringe	0	0	+	0,88	N
168	orofaringe	+	0	+	0,56	P
169	orofaringe	+	0	+	0,40	P
328	orofaringe	+	+	+	0,37	P
334	orofaringe	+	0	+	0,40	P
338	orofaringe	+	+	+	0,53	P

348*	orofaringe	0	0	+	0,81	N
576	orofaringe	nd	nd	+	0,71	N
584	orofaringe	nd	nd	0	0,10	P
BT1475*	orofaringe	0	0	+	0,65	P
26.1	orofaringe	+	0	+	0,76	N
67.1*	orofaringe	+	0	+	0,92	N
72.1*	orofaringe	+	0	+	0,41	P
74.1	orofaringe	+	0	+	0,87	N
53	hipofaringe	+	0	+	0,50	P
71	hipofaringe	0	0	0	0,97	N
244	hipofaringe	0	0	0	0,64	P
261	hipofaringe	0	0	+	0,77	N
605	hipofaringe	nd	nd	0	0,94	N
606	hipofaringe	nd	nd	+	0,49	P
638	hipofaringe	nd	nd	+	0,79	N
640	hipofaringe	+	0	0	0,95	N
72	laringe	0	0	+	1,02	N
91	laringe	0	0	+	1,23	N
163	laringe	+	0	0	0,31	P
212	laringe	0	0	0	0,26	P
242	laringe	+	0	+	0,31	P
324	laringe	+	nd	+	0,42	P
331	laringe	0	0	0	0,49	P
353	laringe	+	0	+	0,47	P
579	laringe	nd	nd	0	0,60	P
585	laringe	nd	nd	+	0,94	N
587	laringe	nd	nd	0	0,93	N
603	laringe	nd	nd	0	0,62	P
637	laringe	0	0	0	0,37	P

Legenda:

- nd Informações não disponíveis
- N Perfil normal de amplificação do gene *PHF21B* pela qPCR
- P Perda para o gene *PHF21B* pela qPCR
- 0 Ausente
- +

Anexo 9 - Resultados da análise de qPCR para o gene *PHF21B* nas 49 amostras de sangue periférico dos pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço.* casos HPV16 positivos.

Amostra	Sítio tumoral	História familiar em 1º grau	História familiar de CCECP em 1º grau	Pelo menos 1 dos critérios	Status tumor	qPCR sangue	Status sangue
40	oral	+	0	+	P	0,73	N
55	oral	0	0	0	N	0,76	N
75	oral	0	0	0	P	0,25	P
128	oral	0	0	0	N	0,86	N
178	oral	+	0	+	N	1,12	N
203	oral	+	0	+	nd	1,30	N
207	oral	+	0	+	P	1,13	N
208	oral	0	0	+	P	1,10	N
229	oral	+	nd	+	P	1,05	N
263	oral	+	0	+	P	0,99	N
336	oral	0	0	+	N	0,88	N
339	oral	+	0	+	P	1,11	N
398	oral	+	0	+	P	1,15	N
547	oral	0	0	0	P	1,28	N
564	oral	nd	nd	+	N	1,11	N
565	oral	nd	nd	0	N	0,81	N
578	oral	nd	nd	0	P	0,77	N
581	oral	nd	nd	0	P	0,83	N
586	oral	nd	nd	0	P	0,95	N
588	oral	nd	nd	0	N	0,80	N
600	oral	nd	nd	+	N	0,99	N
27.1	oral	+	0	+	P	1,08	N
61.1	oral	+	0	+	N	1,46	N
BT1287	oral	0	0	0	N	1,05	N
BT1426	oral	0	0	0	N	1,46	N
BT878	oral	0	0	0	P	0,46	P
92	orofaringe	+	+	+	N	0,69	N
114	orofaringe	0	0	+	N	0,82	N
168	orofaringe	+	0	+	P	1,46	N
576	orofaringe	nd	nd	+	N	1,00	N
584	orofaringe	nd	nd	0	P	0,64	P
26.1	orofaringe	+	0	+	N	1,01	N
67.1*	orofaringe	+	0	+	N	0,61	P
72.1*	orofaringe	+	0	+	P	1,19	N
74.1	orofaringe	+	0	+	N	0,69	N
BT1475	orofaringe	0	0	+	P	0,68	P
53	hipofaringe	+	0	+	P	0,87	N
582	hipofaringe	nd	nd	0	nd	1,17	N

605	hipofaringe	nd	nd	0	N	0,90	N
606	hipofaringe	nd	nd	+	P	0,95	N
638	hipofaringe	nd	nd	+	N	0,78	N
640	hipofaringe	+	0	0	N	0,69	N
91	laringe	0	0	+	N	0,82	N
163	laringe	+	0	0	P	1,06	N
331	laringe	0	0	0	P	1,13	N
353	laringe	+	0	+	P	1,20	N
575	laringe	nd	nd	0	nd	1,02	N
579	laringe	nd	nd	0	P	0,65	P
585	laringe	nd	nd	+	N	0,81	N
587	laringe	nd	nd	0	N	0,88	N
603	laringe	nd	nd	0	P	0,90	N
637	laringe	0	0	0	P	0,74	N

Legenda:

nd Informações não disponíveis

N Perfil normal de amplificação do gene *PHF21B* pela qPCR

P Perda para o gene *PHF21B* pela qPCR

G Ganho para o gene *PHF21B* pela qPCR

0 Ausente

+ Presente

Anexo 10 - Avaliação pelo software GeNorm da estabilidade de expressão dos miRNA testados em um subgrupo de 14 amostras. Como o coeficiente de estabilidade de expressão (M) para nenhum dos miRNAs foi menor que 1,5, o fator de normalização (FN) não foi calculado pelo programa.

	<i>RNU48</i>	<i>RNU44</i>	<i>RNU6B</i>	<i>U47</i>	<i>hsa-miR-16</i>
pool	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00
13.1T	1,08E+00	1,03E+01	1,07E+00	4,43E+00	1,20E-02
70.1T	5,18E-01	2,78E-01	3,72E-01	2,21E+00	1,30E-02
11.1T	4,75E-01	4,28E+00	2,84E-01	1,20E+00	1,40E-02
19.1T	4,90E-01	4,68E+00	1,42E+00	3,15E+00	2,30E-02
54.1T	1,30E+00	4,77E+00	2,21E+00	6,34E+00	2,80E-02
44.1T	1,49E+00	8,70E+00	1,04E+00	5,23E+00	3,00E-02
3N	3,07E-01	6,00E-01	6,78E-01	4,32E-01	1,83E-01
6N	1,43E+00	1,80E+00	9,09E-01	1,30E+00	6,55E-01
7N	1,11E+00	6,15E-01	8,43E-01	1,69E-01	6,79E-01
1N	6,97E-01	5,47E-01	1,13E+00	2,96E-01	7,72E-01
2N	8,47E-01	1,01E+00	1,23E+00	6,39E-01	1,03E+00
5N	9,80E-01	8,48E-01	1,13E+00	5,12E-01	1,27E+00
4N	8,65E-01	6,17E-01	1,45E+00	2,18E-01	1,35E+00
M < 1.5	1,697	2,134	1,730	2,270	3,475

Legenda:

FN: fator de normalização

M: coeficiente de estabilidade de expressão

T: amostras tumorais

N: amostras de sangue de indivíduos saudáveis

Anexo 11 - Avaliação pelo software GeNorm dos miRNAs normalizadores mais estáveis. Como o coeficiente de estabilidade de expressão (M) para os miRNAs não era menor que 1,5, o fator de normalização (FN) não foi calculado pelo programa.

CASO	<i>RNU48</i>	<i>RNU44</i>	<i>RNU6B</i>
pool	1,00E+00	1,00E+00	1,00E+00
1N	6,97E-01	5,47E-01	1,13E+00
1.1SG	3,83E-02	2,54E-02	3,50E-01
1.1T	2,13E+00	1,42E+01	6,56E+00
10N	6,98E-01	4,84E-01	6,29E-01
100.1SG	2,61E-01	4,91E-01	7,18E-01
100.1T	2,99E-01	1,03E+00	2,55E+00
103.1T	3,74E-01	2,25E+00	1,60E+00
11.1 SG	3,13E+00	1,37E+01	3,89E+00
11.1T	4,75E-01	4,28E+00	2,84E-01
13.1 SG	5,84E-01	2,36E-01	9,14E+00
13.1T	1,08E+00	1,03E+01	1,07E+00
14.1T	4,98E-01	1,41E+00	9,82E+00
15.1 SG	8,84E-01	6,15E+00	3,90E-01
15.1T	2,96E+00	2,00E+01	6,55E+00
19.1 SG	4,69E-01	2,25E+00	6,56E+00
19.1T	4,90E-01	4,68E+00	1,41E+00
2N	8,47E-01	1,01E+00	1,23E+00
26.1 SG	1,17E-03	3,32E-03	9,60E-03
26.1T	1,90E+00	2,17E+00	2,35E+01
28.1SG	1,84E-04	4,10E-05	7,15E-04
28.1T	1,48E+00	2,86E+00	1,86E+00
3N	3,07E-01	6,00E-01	6,78E-01
37.1 SG	2,34E+00	2,79E+00	2,83E+00
37.1T	4,09E-01	1,79E+00	1,08E+01
4N	8,65E-01	6,17E-01	1,45E+00
43.1 SG	2,08E+00	1,22E+01	2,79E-01
43.1T	2,66E+00	2,63E+01	1,49E+00
44.1 SG	9,89E-01	3,68E+00	4,92E-01
44.1T	1,49E+00	8,70E+00	1,04E+00
45.1 SG	3,78E-04	1,03E-03	9,60E-03
45.1T	4,61E-01	6,67E-01	8,18E+00
5N	9,80E-01	8,48E-01	1,13E+00
51.1 SG	3,76E+00	6,49E+00	1,03E+01
51.1T	1,25E+00	7,02E+00	7,34E+01
54.1 SG	4,27E-01	1,48E+00	1,98E-01
54.1T	1,30E+00	4,77E+00	2,21E+00
58.1 SG	3,43E+00	4,52E+00	6,70E+01
58.1T	1,21E+00	1,43E+00	1,51E+01

59.1SG	1,40E+00	1,85E+00	3,88E+00
59.1T	1,06E+00	3,76E+00	3,62E+00
6N	1,43E+00	1,80E+00	9,09E-01
60.1 SG	3,05E+00	6,24E+00	8,80E+00
60.1T	1,24E+00	6,27E+00	7,45E+01
61.1T	1,53E+00	6,10E+00	2,65E+00
65.1T	2,11E+00	5,07E+01	1,52E+00
7N	1,11E+00	6,15E-01	8,43E-01
70.1 SG	1,81E+00	3,30E+00	3,33E+00
70.1T	5,18E-01	2,78E-01	3,72E-01
71.1 SG	1,30E+00	2,19E+00	9,85E+00
71.1T	1,51E+00	6,21E-01	2,09E+01
72.1SG	5,64E-01	6,67E-01	1,15E+00
72.1T	5,92E-01	2,89E+00	1,63E+00
73.1 SG	1,11E+00	3,08E+00	1,26E+00
74.1SG	6,38E-02	1,92E-01	3,18E-01
74.1T	3,90E-01	1,88E+00	1,20E+00
8N	1,18E+00	1,40E+00	2,87E+00
8.1 SG	6,69E-01	1,00E+00	7,22E+00
8.1T	2,01E+00	6,57E+00	2,62E+01
84.1SG	1,24E+00	1,81E+00	3,44E-01
9N	3,13E-01	7,78E-01	1,53E+00
M < 1.5	1,650	1,925	2,224

Legenda:

FN: fator de normalização

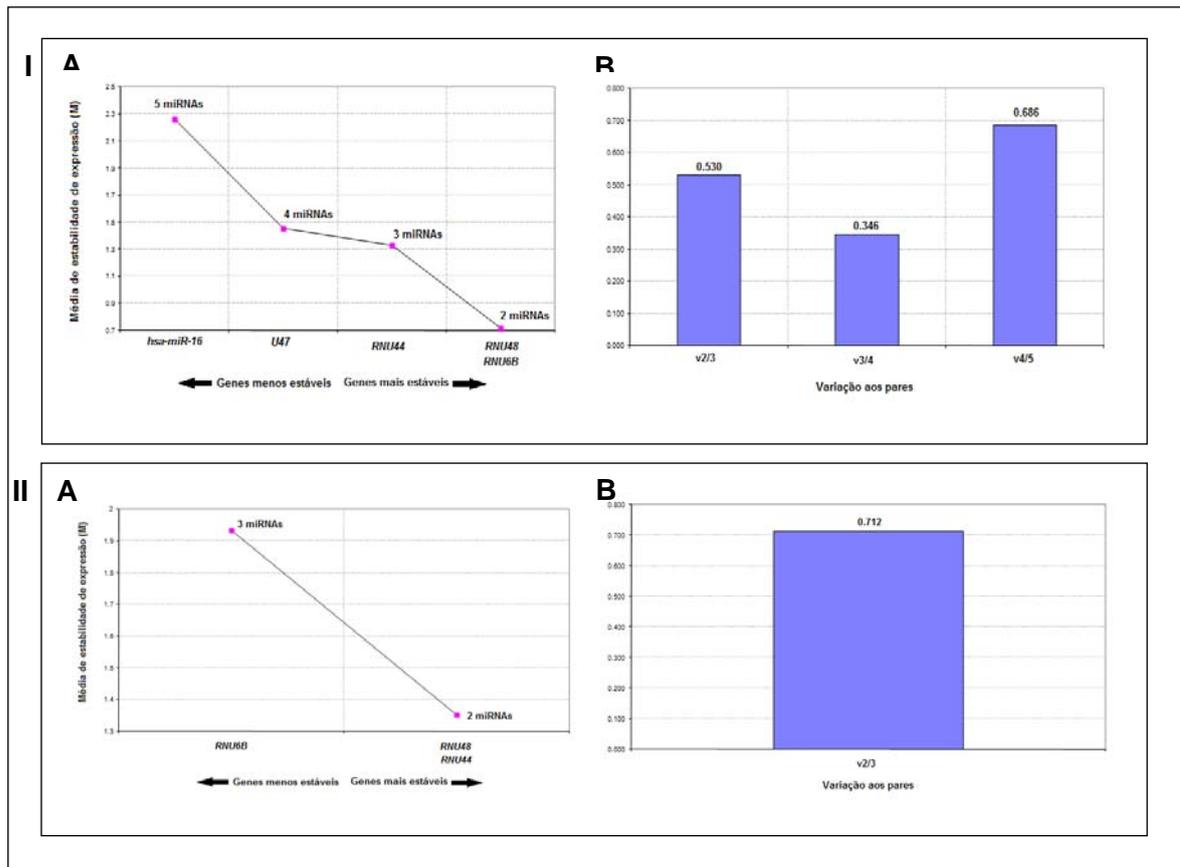
M: coeficiente de estabilidade de expressão

T: amostras tumorais

N: amostras de sangue de indivíduos saudáveis

SG: amostras de sangue do pacientes

Anexo 12 - Análise para determinação de normalizadores. Este método permite a estimar o número apropriado pelo impacto da adição em sequência dos mais estáveis na relação dos fatores de normalização. A) Média do coeficiente de estabilidade de expressão (M). Cálculo para determinação dos melhores miRNAs normalizadores, após a exclusão consecutiva dos menos estáveis. B) Determinação do número adequado de miRNAs normalizadores, demonstrando que é mais apropriado o uso de três miRNAs (I) ou dois miRNAs (II) de expressão mais estáveis. A adição do quarto miRNA de expressão mais estável não causa muita variação no fator de normalização (0.346), sugerindo que pouca diferença nos resultados seria obtido incluindo U47 (I). A inclusão de RNU6B parece alterar os fatores de normalização (II). Heredogramas disponíveis para alguns dos casos avaliados pela aCGH.



Anexo 13 - Avaliação pelo GeNorm dos miRNAs normalizadores mais estáveis nas amostras avaliadas.

CASO	<i>RNU48</i>	<i>RNU44</i>	FN
pool	1,00E+00	1,00E+00	1,0675
1N	6,97E-01	5,47E-01	0,6589
1.1SG	3,83E-02	2,54E-02	0,0333
1.1T	2,13E+00	1,42E+01	5,8665
10N	6,98E-01	4,84E-01	0,6207
100.1SG	2,61E-01	4,91E-01	0,3817
100.1T	2,99E-01	1,03E+00	0,5925
103.1T	3,74E-01	2,25E+00	0,9805
11.1 SG	3,13E+00	1,37E+01	6,9828
11.1T	4,75E-01	4,28E+00	1,5219
13.1 SG	5,84E-01	2,36E-01	0,3965
13.1T	1,08E+00	1,03E+01	3,5567
14.1T	4,98E-01	1,41E+00	0,8959
15.1 SG	8,84E-01	6,15E+00	2,4891
15.1T	2,96E+00	2,00E+01	8,2218
19.1 SG	4,69E-01	2,25E+00	1,0967
19.1T	4,90E-01	4,68E+00	1,6165
2N	8,47E-01	1,01E+00	0,9869
26.1 SG	1,17E-03	3,32E-03	0,0021
26.1T	1,90E+00	2,17E+00	2,1643
28.1SG	1,84E-04	4,10E-05	0,0001
28.1T	1,48E+00	2,86E+00	2,1939
3N	3,07E-01	6,00E-01	0,4577
37.1 SG	2,34E+00	2,79E+00	2,7269
37.1T	4,09E-01	1,79E+00	0,9138
4N	8,65E-01	6,17E-01	0,7798
43.1 SG	2,08E+00	1,22E+01	5,3742
43.1T	2,66E+00	2,63E+01	8,9286
44.1 SG	9,89E-01	3,68E+00	2,0383
44.1T	1,49E+00	8,70E+00	3,8430
45.1 SG	3,78E-04	1,03E-03	0,0007
45.1T	4,61E-01	6,67E-01	0,5919
5N	9,80E-01	8,48E-01	0,9732
51.1 SG	3,76E+00	6,49E+00	5,2722
51.1T	1,25E+00	7,02E+00	3,1669
54.1 SG	4,27E-01	1,48E+00	0,8478
54.1T	1,30E+00	4,77E+00	2,6592
58.1 SG	3,43E+00	4,52E+00	4,2023
58.1T	1,21E+00	1,43E+00	1,4060
59.1SG	1,40E+00	1,85E+00	1,7219

59.1T	1,06E+00	3,76E+00	2,1348
6N	1,43E+00	1,80E+00	1,7169
60.1 SG	3,05E+00	6,24E+00	4,6578
60.1T	1,24E+00	6,27E+00	2,9732
61.1T	1,53E+00	6,10E+00	3,2607
65.1T	2,11E+00	5,07E+01	11,0242
7N	1,11E+00	6,15E-01	0,8802
70.1 SG	1,81E+00	3,30E+00	2,6093
70.1T	5,18E-01	2,78E-01	0,4051
71.1 SG	1,30E+00	2,19E+00	1,8022
71.1T	1,51E+00	6,21E-01	1,0351
72.1SG	5,64E-01	6,67E-01	0,6552
72.1T	5,92E-01	2,89E+00	1,3956
73.1 SG	1,11E+00	3,08E+00	1,9721
74.1SG	6,38E-02	1,92E-01	0,1183
74.1T	3,90E-01	1,88E+00	0,9138
8N	1,18E+00	1,40E+00	1,3733
8.1 SG	6,69E-01	1,00E+00	0,8747
8.1T	2,01E+00	6,57E+00	3,8798
84.1SG	1,24E+00	1,81E+00	1,6001
9N	3,13E-01	7,78E-01	0,5268
M < 1.5	1,351	1,351	

Legenda:

FN: fator de normalização

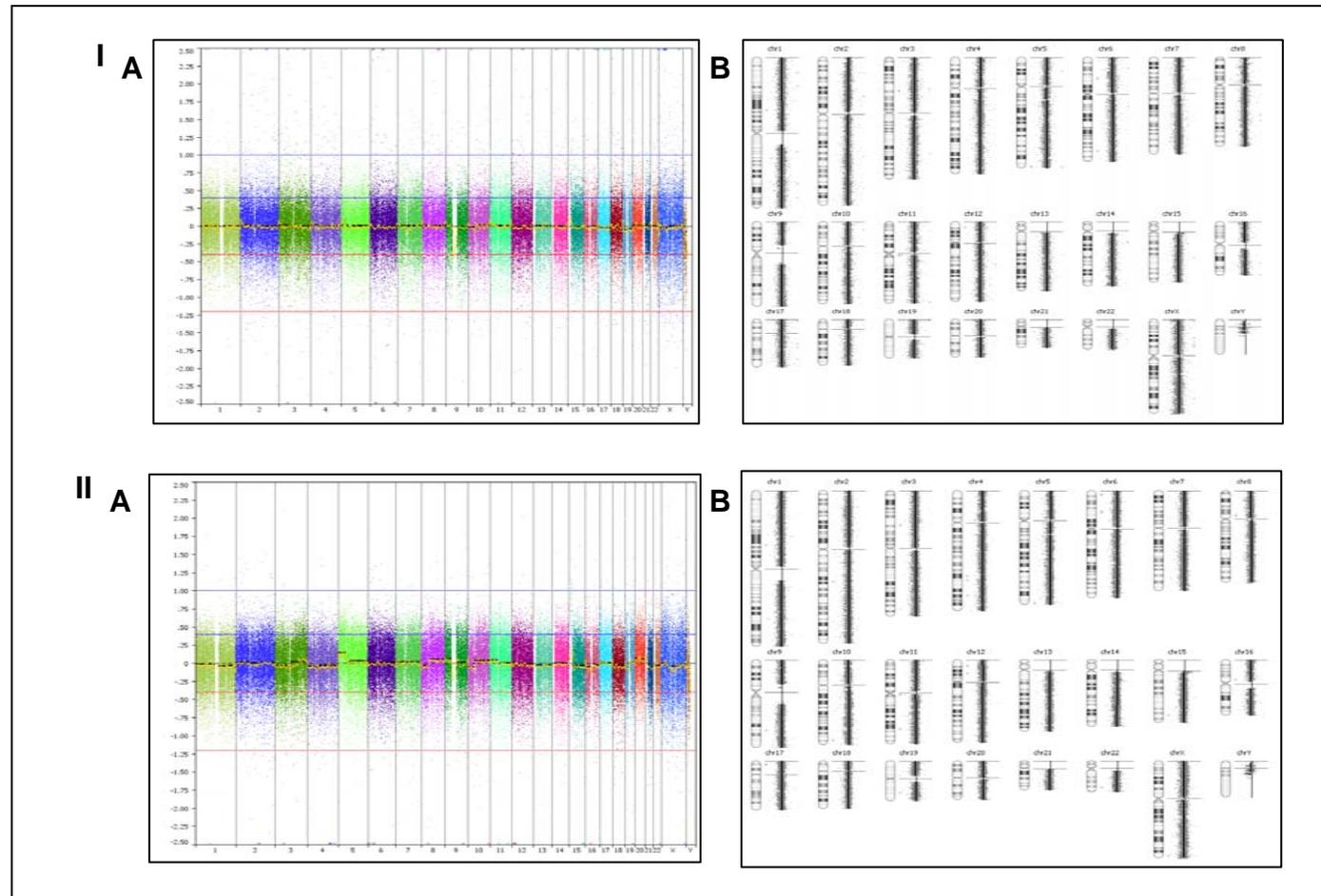
M: coeficiente de estabilidade de expressão

T: amostras tumorais

N: amostras de sangue de indivíduos saudáveis

SG: amostras de sangue do pacientes

Anexo 14 – Perfis de hibridação de um caso pareado (caso 66) entre a amostra sangue periférico e do tumor. (I): Amostra de sangue periférico. (II): Amostra tumoral. Em A) perfil de hibridação mostrando todos os cromossomos e os limites para ganho/alto nível de ganho e perda/perda homozigota. Em B) perfil de hibridação mostrando os cromossomos em ideograma.



Anexo 15 - Variações no número de cópias para o gene *PHF21B* segundo o banco de dados *Database of Genomic Variation (Human genome build GRCh 37 – Hg19)*. Chr: cromossomo; *InDel*: variações do tipo inserção/deleção; *Copy number*: variações do tipo número de cópias.

#	Locus	Identificação no DGV	Tipo	Banda	Posição (Mb)
1	chr22:45,379,780..45,380,506	103192	<i>InDel</i>	22q13.31	45,4
2	chr22:45,376,460..45,429,974	115241	<i>CopyNumber</i>	22q13.31	45,4
3	chr22:45,379,553..45,566,540	31095	<i>CopyNumber</i>	22q13.31	45,4
4	chr22:45,300,323..45,300,916	42951	<i>InDel</i>	22q13.31	45,3
5	chr22:45,280,162..45,280,372	46236	<i>InDel</i>	22q13.31	45,3
6	chr22:45,300,155..45,300,942	62012	<i>InDel</i>	22q13.31	45,3

A alteração do número de cópias, descrita como número 2 neste anexo, cobre os éxons e íntrons 1 e 2 (este último parcialmente) e apresenta 53.514 pb. Esta CNV ainda abrange a região promotora do gene. A alteração descrita como 3 neste anexo cobre éxon e íntron 1, éxon 2 e parte do íntron 2. Esta CNV abrange uma região maior (com 186.987 pb) do que a primeira, além da região promotora.

A variação *InDel*, descrita como número 1, está dentro do íntron 2 e possui 726 bases. A variação *InDel*, descrita como 4, está inserida no íntron 6 e possui tamanho de 593 bases. A outra CNV (número 5) do tipo *InDel* está inserida no íntron 12 e possui 210 bases. A variação *InDel* de número 6 está dentro do íntron 5 e possui 787 bases.