

IDENTIFICAÇÃO DE GENES HIPEREXPRESSOS EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE CAVIDADE ORAL

ROBERTA CARDIM LESSA

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. André Lopes Carvalho

**Co-orientador: Dr. André Luiz Vettore de
Oliveira**

São Paulo

2007

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
[Assinatura]
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE
BIBLIOTECA

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Lessa, Roberta Cardim

Identificação de genes hiperexpressos em carcinomas epidermóides de cavidade oral / Roberta Cardim Lessa – São Paulo, 2007.

92p.

Dissertação (Mestrado) - Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: André Lopes Carvalho

Descritores: 1. CÂNCER ORAL. 2. CARCINOMA EPIDERMÓIDE. 3. EXPRESSÃO GÊNICA.

*"A sabedoria não nos é dada.
É preciso descobri-la por nós mesmos,
depois de uma viagem que ninguém
nos pode poupar ou fazer por nós."*

Marcel Proust

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação a todos aqueles que, em algum momento da minha jornada, insistiram em afirmar que eu iria conseguir atingir meus objetivos e que eu era forte o suficiente para suportar o desafio.

Pai, Mãe, Dani.... vocês não me deixaram desistir!

AGRADECIMENTOS

Considerando que esta dissertação é o resultado de uma caminhada, agradecer pode não ser uma tarefa fácil. Para não correr o risco da injustiça, agradeço de antemão a todos que de alguma forma passaram pela minha vida e contribuíram para a construção de quem sou hoje.

Fazer um agradecimento a DEUS, para mim, é muito mais que necessário. Agradeço por Sua presença constante na minha vida, pelo auxílio nas minhas escolhas e pelo conforto nas horas difíceis.

Tenho que dedicar um espaço nestes agradecimentos aos meus primeiros mestres, Dr. Benedito Silva, Dra. Cátia Guanais, Dr. Roberto Santos que me introduziram aos ensinamentos sobre oncologia bucal.

Gostaria de agradecer a meu orientador, Dr. André Carvalho, por ter acreditado em mim, mesmo não me conhecendo; por ter aceitado me orientar; por todos os ensinamentos sobre biologia molecular, estatística e clínica, por todos os "puxões de orelha" e por todos os incentivos. Mais uma vez, muito obrigada.

Agradeço a meu co-orientador, Dr. André Vettore, por ter-me aceitado no Laboratório Genética do Câncer, por ser exigente na perfeição dos experimentos, por ser atencioso e paciente nas explicações, por ser dedicado na análise dos resultados e por ser um segundo orientador.

Dra. Ivana Nascimento, professora do Curso de pós-graduação de Imunologia da UFBA, não seria menos merecedora de meus agradecimentos, pois me incentivou e me auxiliou na conquista de uma vaga neste curso.

Agradeço imensamente aos amigos que conquistei em São Paulo, Cláudia Pereira, Ana Carolina, Valéria Andrade, Viviane Sonaglio, Luis Sakamoto, Alex, Graziela, Mariana. Sem vocês minha estada seria muito mais difícil.

A Cláudia Pereira, a minha grande e fiel companheira, pela amizade, desde os primeiros momentos em que cheguei ao laboratório, e pelo

companheirismo, nos finais de semana e nos turnos noturnos de experimentos. Por ser não só amiga, mas também conselheira companheira e fiel escudeira.

A Ana Carolina de Carvalho, por toda a ajuda técnica e por sua verdadeira amizade nestes dois longos anos. Por toda sua disposição em me ajudar dentro e fora do laboratório, pelas longas conversas, por todo o carinho, por cada abraço, por toda a preocupação e por toda a disposição de me fazer sentir um pouco mais em casa.

Agradeço a Valéria Andrade, por todos os momentos de atenção e carinho e por toda a alegria que cabe nesta grande pessoa que ela é.

A todos que passaram pelo Laboratório Genética do Câncer: Andréia Seixas, Fabrício Carvalho, Fabio Picolli, Fernanda Góes, Roberta Felix, Manuela, Luciana Pinto, Luciane, Danielle, Emerson, Beijamim, Mariana Ranzzoni, Ivete, Simone, pela convivência e por toda e qualquer ajuda por mim recebida.

Aos médicos do Departamento de Cabeça e Pescoço, pela disposição e preocupação em coletar as amostras para serem armazenadas no banco de tumores.

Ao Dr. Hugo Campos e ao Dr. Fernando Soares, e bem como a todos os funcionários do Departamento de Anatomia Patológica pelo suporte na obtenção e análise das amostras do banco de tumores.

Agradeço a Felipe Rodrigues da Silva, por realizar as análises de bioinformática deste trabalho e por esclarecer todas as nossas dúvidas.

À Dra. Helena Brentani, por sua disposição para esclarecimento das dúvidas sobre alguns passos deste trabalho.

À Dra. Dirce Carraro e a Louise do Banco de Ácido Nucléicos, pela extração do RNA das amostras e pela disponibilidade de solução dos problemas.

Agradeço ao Dr. Carlos Elias de Freitas, da Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública – Curso de Odontologia, meu eterno mestre, por ter disponibilizado e permitido a coleta das amostras normais.

Agradeço a Dra. Luisa Lina Villa, diretora do Instituto Ludwig, por permitir a conclusão do trabalho nesse instituto e por assegurar as condições excelentes de trabalho e aos funcionários do Instituto: Sr. Eudes, Sampaio, Rubens, Leila, Isabel, Juliana, e demais funcionários da limpeza, por todos os sorrisos e “bom-dia” distribuídos pelos corredores.

Agradeço ao Dr. Ricardo Renzo Brentani, Presidente do Hospital do Câncer A.C. Camargo, por manter esta instituição como centro de referência em tratamento e pesquisa.

Agradeço ao diretor da pós-graduação Dr. Luiz Fernando Lima Reis, e imensamente às funcionárias, Ana Maria Kuninari e Luciana Pitombeira, por todo carinho, pela atenção e por sempre estarem dispostas a ajudar.

Agradeço a toda a equipe da biblioteca: Suely Francisco, Francyne Pólen G. Lima e Rosinéia Aguiar Carneiro, pelo competente trabalho, pelo carinho e atenção, pela enorme ajuda, pela formatação da dissertação e pelas correções feitas na bibliografia.

A todos do Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME), especialmente à Sra. Irde Contesini, pela disposição na busca e coleta dos dados de pacientes incluídos neste estudo, bem como a todos os funcionários do Hospital.

Aos membros da banca de qualificação desta dissertação: Dra. Dirce Maria Carraro e Dra. Gisele Wally Braga Colleoni, pelo tempo atribuído à leitura dos relatórios e pelas proveitosas sugestões. À Banca Julgadora, pelo tempo atribuído à leitura desta dissertação.

Agradeço à CAPES, pela bolsa de estudos concedida, ao CNPQ, pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa e ao Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, pelo apoio financeiro e pela oportunidade de desenvolver nosso projeto.

À *Applied Biosystems*, por todo suporte técnico e, principalmente, pelo uso do ABI7000 para a realização das reações de PCR em tempo real.

Não poderia deixar de agradecer a todos aqueles que em algum momento desta jornada me disseram um “não”, pois me deram força para

seguir em frente e acreditar ainda mais que seria capaz de realizar o meu ideal.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço aos meus pais, Gustavo e Norma, por sempre insistirem que minha maior herança seria toda a educação que conseguiriam me proporcionar; por serem meus maiores fãs, meus incentivadores e meus maiores admiradores. Sem eles, eu não teria chão para me suportar e modelos em que me espelhar.

A meu irmão, Gustavo Jorge e a minha cunhada Alessandra, que me apresentaram, no meio destes dois anos de turbilhão, a uma pessoinha linda que alegrou muito os meus dias.

Agradeço imensamente ao meu sol, Daniel, por ter entrado na minha vida tão sorrateiro e tê-la preenchido completamente de luz, amor, compreensão e carinho. A ele, não só dedico todo o meu sucesso, como também agradeço e eternamente admiro a sua força e entusiasmo pelo nosso projeto.

Aos meus tios, Sebastião e Adnólia, e a meus primos, João Vicente, Mariana, Alexandre e Carine, que me acolheram em São Paulo e me transmitiram todo carinho e atenção nestes dois anos de estada nesta cidade.

A Dra. Gildete Sales Lessa, não só pelo apoio financeiro, mas principalmente pelo exemplo de que é possível conquistar um objetivo através dos seus próprios méritos, dos seus próprios esforços.

Agradeço ao exemplo deixado por Dona Lindaura Sales Lessa e que todos nós possamos assimilar seus ensinamentos e atitudes, como também a todos da minha imensa família que me deram força e admiraram minha coragem durante esta jornada.

RESUMO

Lessa RC. **Identificação de genes hiperexpressos em carcinomas epidermóides de cavidade oral.** São Paulo; 2007. [Dissertação de mestrado-Fundação Antônio Prudente].

O carcinoma epidermóide de cavidade oral é uma das maiores causa de morbidade e mortalidade no mundo, sendo a sexta neoplasia mais comum. Mundialmente, são diagnosticados, a cada ano, 500.000 novos casos de câncer da cavidade oral e da faringe. Apesar dos avanços no tratamento destas neoplasias, alguns pacientes apresentam evoluções distintas no curso da doença e evoluem com metástases locoregionais e óbito. As diferenças na evolução clínica de tumores morfologicamente iguais e em um mesmo estágio clínico estão relacionadas a diversas vias de carcinogênese que são responsáveis pelo progresso dos carcinomas epidermóides; sendo assim, esses tumores podem apresentar comportamentos distintos devido a diversos padrões de expressão gênica. A análise do perfil de expressão gênica dos tumores, em relação ao tecido normal, poderá identificar novos potenciais marcadores de diagnóstico, prognóstico e no desenvolvimento de alvos terapêuticos. O objetivo desta pesquisa foi identificar, por meio da busca em bancos de dados públicos de bibliotecas de ORESTES provenientes de cabeça de pescoço, genes que apresentavam expressão diferencial em tecidos normais e neoplásicos. Posteriormente, estas diferenças foram confirmadas por RT-PCR em tempo real, através da análise dos níveis de expressão gênica em amostras de carcinomas epidermóides de cavidade oral. Foram identificados 109 genes diferencialmente expressos através desta análise, sendo que destes 40 genes apresentavam hiperexpressão quando comparados os tecidos tumorais com os normais. Estes genes tiveram sua hiperexpressão confirmada através dos dados de EST's, sendo então selecionados 10 genes (*ALDOA*, *AHSA1*, *ARHGAP1*, *HDAC1*, *KRT5*, *KRT6A*, *POLQ*,

PABPC1, *RPL19* e *RPL23*) em que foi levado em consideração o nível de expressão dos transcritos, comparação entre regiões cromossômicas conhecidas como regiões de ganho, descritas na literatura, o processo biológico e função celular em que o gene está envolvido, e a disponibilidade de anticorpos comerciais, para terem sua expressão diferencial avaliada em quarenta e oito amostras de carcinomas epidermóides de cavidade oral e em vinte e cinco amostras de tecidos normais de mucosa de cavidade oral. Este trabalho permitiu demonstrar que a estratégia de escolha de genes, a partir a análise das bibliotecas de ORESTES, foi adequada, pois genes selecionados para validação apresentaram aumento de expressão nas amostras tumorais analisadas. A quantificação da expressão desses genes revelou que três deles (*ALDOA*, *AHSA1* e *POLQ*) apresentaram-se com aumento da expressão de pelo menos duas vezes em mais de 40% das amostras testadas, em relação à média dos valores de Ct das amostras de tecidos normais. O aumento de expressão destes genes nas amostras tumorais pode indicar uma associação destes com o processo de carcinogênese, porém estudos mais amplos devem ser realizados a fim de elucidar e confirmar os achados.

SUMMARY

Lessa RC. **[Identification of overexpression genes in oral squamous cells carcinomas]**. São Paulo; 2007. [Dissertação de mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Oral squamous cells carcinoma is one of the most reasons of morbidity and mortality in the world, being the sixth most common malignancy. Annually, about 500000 new oral and pharyngeal cancers have been diagnosed in the world. Although the advances in treatment of these neoplasias, some patients present distinct evolutions in the course of the illness and evolve with metastases locoregional and death. The differences in clinical evolution of match morfological tumors and showing same clinical stage are related to several ways of carcinogenesis that are responsible for the squamous cells carcinomas progress, thus, these tumors may play distinct behaviors due several standards of gene expression. The tumors gene expression analysis may identify new potentials marking of diagnosis, prognostic and in the development of therapeutical targets. The aim of this research was to identify genes that are differentially expressed in normal and tumors tissues in public databases of head and neck ORESTES libraries. Later, these differences had been confirmed by quantitative real time PCR through the analysis of the gene expression levels in samples of oral squamous cells carcinomas. This first analysis had been identified a set of 109 distinguishing express genes, for a subset of 40 genes were overexpressed when comparing the tumor tissues with the normal ones. These genes had had its overexpression confirmed through the database of EST' s, and we selected 10 (*ALDOA*, *AHSA1*, *ARHGAP1*, *HDAC1*, *KRT5*, *KRT6A*, *POLQ*, *PABPC1*, *RPL19* and *RPL23*) best genes candidates for further validation in forty-eight samples of oral squamous cells carcinomas and in twenty-five normal oral samples. We demonstrate that the strategy of genes choice through the ORESTES libraries analysis was adjusted, therefore genes selected for validation had

conferred increase of expression in the tumors samples. The quantification of these genes expression revealed that three of them (*ALDOA*, *AHSA1* and *POLQ*) had been presented with increase of the expression at least two times in more than 40% of tested samples, in relation to average Ct's values of the normal tissues samples. The genes overexpression in the tumors samples can indicate an association of these with the process of carcinogenesis, however ampler studies must be carried to elucidate and confirm the findings.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Gráfico de amplificação do gene ALDOA em duas amostras de tecido da cavidade bucal. 28
- Figura 2** Gel de agarose a 1% mostrando a qualidade do RNA extraído de alguma das amostras. 42
- Figura 3** Amplificação de um fragmento de 311pb do gene NOCTH2, gel de poliacrilamida 8% atestando a qualidade da síntese do cDNA sintetizado de algumas das amostras. 43
- Figura 4** Gráfico que mostra a determinação do melhor número de genes a serem utilizados para normalização. 47
- Figura 5** Gráfico que representa a média de estabilidade da expressão dos genes normalizadores testados para todas as amostras do estudo. 50
- Figura 6** Gráfico de dispersão que compara o nível de expressão das amostras tumorais com o nível de expressão das amostras normais. 59
- Figura 7** Os gráficos de dispersão demonstram a análise de cada um dos genes com relação à localização. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Localização e identificação das bibliotecas de ORESTES incluídas na análise.	21
Tabela 2	Primes para os genes selecionados para validação em RT-PCR em tempo real.	23
Tabela 3	<i>Primes</i> utilizados como normalizadores nos experimentos de RT-PCR em tempo real.	24
Tabela 4	Ferramentas disponíveis <i>on-line</i> utilizadas para a avaliação dos genes candidatos.	34
Tabela 5	Informações sobre os genes hiperexpressos em Carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço identificados pelo estudo.	35
Tabela 6	Valores de quantificação do RNA das amostras tumorais.	40
Tabela 7	Valores da quantificação dos RNAs das amostras de normais.	41
Tabela 8	Genes utilizados para as análises de seleção do controle interno mais estáveis que foram utilizados como referência na quantificação relativa da expressão gênica.	46
Tabela 9	Classificação gerada através da análise dos dados de expressão pelo programa GeNorm.	49

Tabela 10	Classificação gerada através da análise dos dados de expressão pelo programa NormFinder.	50
Tabela 11	Classificação dos genes normalizadores quanto à estabilidade, sugerida pelos programas de GeNorm e NormFinder nos três experimentos.	52
Tabela 12	Ciclagem da RT-PCR em tempo real e concentração de $MgCl_2$ padronizadas para os genes do estudo.	53
Tabela 13	Ciclagem da RT-PCR em tempo real e concentração de $MgCl_2$ padronizadas para os genes normalizadores.	54
Tabela 14	Valores de eficiência de amplificação obtidos para cada um dos genes incluídos no estudo.	55
Tabela 15	Porcentagem de amostras com hiperexpressão nos genes incluídos no estudo.	56
Tabela 16	Características dos pacientes incluídos no estudo.	58

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTB	<i>Homo sapiens actin, beta</i>
AJCC	<i>The American Joint Committee on Cancer</i>
B2M	<i>Homo sapiens beta-2-microglobulin</i>
cDNA	DNA complementar
c-erbB2	<i>Homo sapiens epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian) (EGFR)</i>
cm	Centímetro
cm²	centímetro quadrado
CGAP	<i>cancer genome anatomy project</i>
CO₂	dióxido de carbono
Ct	<i>threshold cycle</i>
cTNM	classificação clínica dos tumores por meio do sistema TNM
DEPC	di-etil pirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	deoxinucleotídeos fosfato
DTT	di-etiltreitol
EGFR	receptor de fator de crescimento
EST	etiquetas de seqüências expressas, <i>cuja sigla do inglês é Expressed Sequence Tags</i>
E.U.A.	Estados Unidos da América
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
GAPDH	<i>Homo sapiens glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
HCGP	Projeto Genoma Humano do Câncer
HPRT1	<i>Homo sapiens hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1 (Lesch-Nyhan syndrome)</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
M	Molar

µg	Micrograma
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm³	milímetros cúbicos
µM	Micromolar
MAPK	quinase ativada por mitógeno
MgCl₂	cloreto de magnésio
mRNA	RNA mensageiro
NaOH	hidróxido de sódio
NaCl	cloreto de sódio
NCBI	<i>National Center For Biotechnology Information</i>
ng	Nanograma
NOTCH2	<i>Homo sapiens Notch homolog 2 (Drosophila)</i>
ORESTES	<i>Open Reading Frames Expressed Sequences Tags</i>
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polimerase Chain Reaction</i>
PPIA	<i>Homo sapiens peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A) (PPIA), transcript</i>
p53	<i>tumor protein p53 [Homo sapiens]</i>
pTNM	classificação histopatológica dos tumores por meio do sistema TNM
RPL0	<i>Homo Sapiens ribosomal protein, large, P0</i>
RPM	rotações por minuto
PGK	<i>Homo sapiens phosphoglycerate kinase</i>
pH	potencial hidrogeniônico
RNA	ácido ribonucléico
RT-PCR	<i>reverse transcriptase PCR</i>
SAGE	<i>serial analysis of gene expression</i>
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
TBP	<i>Homo sapiens TATA box binding protein</i>

<i>T_m</i>	<i>melting temperature</i>
<i>TMA</i>	<i>tissue microarray</i>
TNM	Sistema de classificação de tumores malignos
<i>TP53</i>	<i>Homo sapiens tumor protein p53 (Li-Fraumeni syndrome)</i>
U	Unidades
UICC	União Internacional Contra o Câncer
uv	Ultravioleta

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer Oral	1
1.2	Prognóstico	6
1.3	Alterações Citogenéticas e Marcadores Moleculares	9
1.4	Projeto Genoma Humano do Câncer	12
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivos Gerais	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1	Casuística e Obtenção das Amostras de Tecidos	16
3.2	Extração de RNA	17
3.3	Síntese de cDNA	18
3.4	Avaliação da Qualidade dos cDNAs	19
3.5	Análises de Bioinformática	20
3.6	Desenho dos <i>primers</i>	22
3.7	Cálculo da Expressão Relativa e Escolha do Gene Normalizador	25
3.8	Quantificação da Expressão Gênica por Meio de RT-PCR em tempo real	27
3.9	Cálculo de Eficiência de Amplificação	30
3.10	Análises Estatísticas	31
4	RESULTADOS	32
4.1	Seleção dos Genes Candidatos	32
4.2	Coleta das Amostras de Tecido e Extração de RNA	39
4.3	Avaliação da Síntese de cDNA	42
4.4	Escolha do Gene Normalizador	44

4.5	Quantificação da Expressão Gênica por meio de RT-PCR em tempo real	52
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÕES	79
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80

ANEXOS

- Anexo 1** Classificação clínica (TNM) para o câncer de cavidade oral baseada na extensão do tumor primário, na ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais e a ausência ou presença de metástase à distância.
- Anexo 2** Grupamento de Estádios para o câncer de cavidade oral baseada na classificação clínica (TNM) - extensão do tumor primário, presença ou ausência de comprometimento de linfonodos regionais e a ausência ou presença de metástase à distância.
- Anexo 3** Lista dos genes hiperexpressos identificados pela análise de bioinformática. São fornecidos os valores de hiperexpressão para cada gene nas bibliotecas de ORESTES e nas bibliotecas de EST's.
- Anexo 4** Medida da expressão diferencial através do método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras tumorais em relação à média dos valores de Cts das amostras normais, normalizadas pela media de expressão dos genes *RPLO*, *TBP* e *PPIA*.
- Anexo 5** Ficha de dados clínicos utilizada para coleta dos dados clínicos e patológicos dos pacientes incluídos na pesquisa.
- Anexo 6** Termo de consentimento pós informado utilizado para a coleta das amostras normais incluídos na pesquisa.

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER ORAL

O câncer de cavidade oral refere-se ao subgrupo de neoplasias de cabeça e pescoço as quais se desenvolvem em lábio, mucosa jugal, áreas retromolares, sulcos buco-alveolares, superior e inferior, língua, rebordo alveolar superior e inferior, assoalho de boca e palato duro, de acordo com a Classificação Internacional de Doenças (ICD versão 10 Categorias C06).

Das neoplasias que acometem a cavidade oral, o carcinoma epidermóide representa de 90% a 95% dos tumores malignos que afetam este sítio anatômico, sendo considerados as neoplasias epiteliais mais agressivas. Outras histologias menos freqüentes que podem acometer esta localização são os carcinomas de glândulas salivares menores, linfomas, melanomas e sarcomas (GREENLEE et al. 2001; JOHNSON 2003; TSANTOULIS et al. 2007; PEREIRA et al. 2007).

O carcinoma epidermóide é geralmente caracterizado como exofítico ou ulcerativo ou ainda uma combinação destas duas características. Os carcinomas exofíticos são mais raros, apresentam crescimento mais lento e são menos infiltrativos do que as lesões ulceradas. Estas, por sua vez, são mais comuns, e geralmente aparecem como úlceras vermelhas ou acinzentadas, com bordos elevados e fácil sangramento. Estas lesões ulceradas podem ser profundamente infiltrativas (DAS e NAGPAL 2002).

Estas lesões são classificadas também por seu grau de diferenciação como: bem diferenciado ou grau I, moderadamente diferenciado ou grau II e pouco diferenciado ou grau III (PEREIRA et al. 2007).

Estimativas do INCA para o ano de 2006 apresentam o câncer de cavidade oral como à quinta neoplasia mais comum em homens, no Brasil, contabilizando 10.060 novos casos. Nas mulheres esta estimativa é de 3.410 casos, sendo a oitava neoplasia mais freqüente (Ministério da Saúde 2005).

No período entre 1979 e 2002, houve 38.263 mortes por câncer oral no Brasil. Isto corresponde a 1,8% do total de mortes devido a neoplasias neste período (BOING et al. 2006). Estudo realizado por BIAZEVIC et al. (2006), neste mesmo período, mostrou uma tendência global de incremento do aumento na mortalidade por câncer de boca e orofaringe na cidade de São Paulo, sendo que o câncer de língua foi responsável por mais de um terço desses óbitos. Esta neoplasia apresenta taxas de mortalidade entre homens e mulheres em uma proporção de 4:1.

O câncer oral apresenta-se entre a oitava posição na incidência de câncer no mundo, com variações epidemiológicas entre as diferentes regiões geográficas. Estas neoplasias são, na sua maioria, diagnosticadas em em estágios avançados da doença, constituindo, assim, um grande problema de saúde pública (PARKIN et al. 1993; MASSANO et al. 2006).

Apesar dos modernos avanços nos métodos de diagnóstico e tratamento, incluindo a maior utilização dos regimes quimioterápicos, as taxas de sobrevida globais entre os pacientes com câncer de cabeça e pescoço, incluindo os tumores de cavidade oral, não têm sido modificadas

(VARTANIAN et al. 2006). Nas últimas décadas, ocorreu uma diminuição na taxa de mortalidade em alguns sítios anatômicos para estes carcinomas, porém a cavidade oral não seguiu esta tendência (BOING et al. 2006).

A etiologia do câncer de boca e orofaringe é multifatorial, integrando fatores endógenos, como a predisposição genética e fatores exógenos ambientais e comportamentais, porém os maiores determinantes para o risco de câncer oral no Brasil são o tabaco e o consumo de bebidas alcoólicas.

A maior incidência do carcinoma de cavidade oral deve-se à exposição ao tabaco, considerada como responsável por 50 a 90% dos casos em todo o mundo. A incidência desta neoplasia em fumantes de cigarro é de 4 a 7 vezes maior do que em não fumantes (NAGLER et al. 2004). BOSETTI et al. (2006) mostraram que o risco para desenvolvimento de neoplasias em ex-fumantes mantinha-se elevado por pelo menos 10 anos após estes pararem de fumar, diminuindo em torno de 40% depois destes período. Além disso, os ex-fumantes apresentavam duas vezes mais risco de desenvolverem a doença do que pessoas que nunca fumaram (SCULLY e BAGAN 2007).

No tabaco, podem ser identificadas cerca de 4.700 substâncias tóxicas tanto na fumaça como no próprio tabaco. Dentre estas, 60 apresentam ação carcinogênica conhecida, destacando-se as nitrosaminas e os hidrocarbonetos que estão presentes em altos níveis em fumantes. Além destes, outros compostos são formados durante o processo de combustão do tabaco, como o cádmio, polônio-210, benzopirenos e formaldeído. Além

da ação das substâncias cancerígenas, a exposição contínua ao calor desprendido pela combustão do fumo potencializa as agressões sobre a mucosa da cavidade bucal (WINN 1997; RODU e JANSSEN 2004).

O ato de fumar e/ou mascar tabaco aumenta a permeabilidade da mucosa bucal promovida pela ação destes vários agentes carcinógenos. Este evento facilita a penetração das nitrosaminas na mucosa bucal, desencadeando as reações oxidativas, que têm sido implicadas na iniciação de reações que produzem radicais livres nos eventos celulares. Assim, a presença de oxigênio reativo pode causar dano ao DNA, o que pode resultar em mutagênese e em alteração no ciclo celular (ZAIN 2001; WARNAKULASURIYA et al. 2005).

O consumo de álcool apresenta um aumento do risco de 9,2 vezes para ocorrência do câncer de boca, faringe e supraglote entre etilistas que nunca fumaram, quando comparados com não etilistas (VISWANATHAN e WILSON 2004). BROUHA et al. em 2005 mostraram que etilistas e fumantes são os que mais retardam o diagnóstico das lesões de cavidade oral e faringe.

O álcool pode ter uma ação direta ou indireta sobre a mucosa oral; este evento ocorre pela conversão do etanol em acetaldeído promovido pelas bactérias da microflora oral, principalmente entre os consumidores de bebida e tabaco. O álcool age como um solvente que aumenta a penetração dos compostos carcinógenos na mucosa, devido à alteração molecular das membranas celulares. Além disso, o alcoolismo crônico provoca alteração das glândulas salivares e, com isso, há um impacto no fluxo e na

composição salivar. Deste modo, a mucosa bucal torna-se lubrificada insuficientemente, levando a uma maior exposição aos carcinógenos (SCHWARTZ et al. 2001; POSCHL e SEITZ 2004; HUNTER et al. 2005).

A ação de agentes virais HPV-Human papillomaviruses - e o HSV-Herpes simplex viruses - tem sido relacionada com a patogênese dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, mas este contexto ainda mantém controvérsias. Podem ainda ser identificados como fatores de risco para desenvolvimento destas neoplasias o status socioeconômico, a moradia em áreas rurais, a idade, os hábitos alimentares, a exposição ocupacional, o uso de enxaguatórios bucais, os mecanismos humorais ou celulares do sistema imunológico, porém estes ainda não apresentam seu papel bem estabelecido (ELMORE e HORWITZ 1995; GAGARI e KABANI 1995; HASHIBE et al. 2003; BSOUL et al. 2005).

A doença periodontal crônica, a má higiene oral, próteses mal adaptadas, ou má conservação dental, têm sido sugeridas como co-fatores para o desenvolvimento destas neoplasias (BSOUL et al. 2005). O desenvolvimento dos carcinomas epidermóides de cavidade oral pode ainda estar relacionado com predisposição genética familiar (FRANCO et al. 1989; BIAZEVIC et al. 2006; SCULLY e BAGAN 2007).

1.2 PROGNÓSTICO

O estadiamento do câncer oral é convencionalmente realizado com o uso do sistema de classificação TNM (Tumor, Nódulo, Metástase) e sua variante pTNM, que são baseados na avaliação clínica e patológica do tamanho do tumor e envolvimento linfonodal. Contudo, o tradicional estadiamento é, na maioria das vezes, inadequado e nem sempre fornece informações precisas sobre o prognóstico. Modelos prognósticos que consideram múltiplos parâmetros e sistemas de *scoring* baseados em variáveis histológicas como espessura máxima do tumor, profundidade de invasão, grau de diferenciação e invasão linfovascular e perineural, estão sendo utilizados para redefinir o prognóstico e permitir a seleção do tratamento mais apropriado (KANE et al. 2006; TSANTOULIS et al. 2007).

KOWALSKI e CARVALHO (2001) citam, em sua revisão de literatura, que o prognóstico das lesões de cabeça e pescoço de uma forma em geral, incluindo as lesões de cavidade oral, está diretamente relacionado ao estágio clínico em que estas neoplasias foram diagnosticadas. Pacientes com lesões em estágios avançados (Estadio III ou IV) apresentam um prognóstico pior do que aqueles que são clinicamente diagnosticados com lesões em estágio inicial (Estadio I ou II).

MASSANO et al. (2006) citam em sua revisão que o atraso no diagnóstico destas neoplasias aumenta a possibilidade de um maior crescimento e progressão tumoral e, conseqüentemente, o agravamento do prognóstico. Este fator está diretamente associado ao mau prognóstico

destas lesões, uma vez que a taxa média de sobrevida em cinco anos para os estágios iniciais é de 80%, enquanto que, nos estágios avançados, esta taxa cai para 49%. A metástase linfonodal é o fator prognóstico mais forte para os carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, sendo que sua presença está associada à diminuição da sobrevida global pela metade, assim como o aumento das taxas de recorrências (MASSANO et al. 2006).

Baseando-se nestes fatos, é altamente recomendado que o tratamento do câncer deva ser iniciado logo após o diagnóstico, para que não haja progressão da lesão e para que esta progressão não afete o planejamento do tratamento, com possibilidade de influência negativa no prognóstico (FREEMAN 1998).

Para que haja confirmação da suspeita clínica de câncer, os exames complementares são essenciais para o diagnóstico e estadiamento. No entanto, os dados clínicos e histopatológicos, utilizados na prática clínica para o planejamento terapêutico, mesmo quando analisados em conjunto, não são preditivos da evolução clínica pós-tratamento em um número significativo de casos. A identificação de outros fatores preditivos do prognóstico é, portanto, imperativa (CARVALHO et al. 2000, 2004).

Atualmente, o tratamento dos carcinomas epidermóides envolve a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia ou a integração destas terapias. A cirurgia é o tratamento de escolha para as neoplasias de cavidade oral e é indicada para a ressecção de lesões em estágio inicial, sendo que, para as lesões em estágio avançado, incluem-se a remoção dos linfonodos regionais

do pescoço, e associação com a radioterapia (DAS e NAGPAL 2002; CHIN et al. 2005; KORNBERG et al. 2005).

Devido ao melhor entendimento do comportamento biológico das neoplasias houve mudança no seu tratamento, com a implementação de altas doses de terapia radioterápica pós-operatória, os avanços na tecnologia da radiação localizada e técnicas cirúrgicas, houve uma melhoria no tratamento destas neoplasias, conseguindo assim um acréscimo na sobrevida dos pacientes. Apesar de todas essas alterações que ocorreram no tratamento das neoplasias, a biologia do tumor representa a mais importante causa da recorrência das lesões (CARVALHO et al. 2003).

A cura destes pacientes depende do estágio da doença e o sítio específico do tumor. As taxas de recorrências locais e regionais, atualmente, são os maiores problemas terapêuticos destas neoplasias. Não só tumores avançados, mas também alguns tumores em estágios iniciais apresentam altas taxas de recorrência e, conseqüentemente, altas taxas de mortalidade (BUNDGAARD et al. 1996; GARZINO-DEMO et al. 2006; LUNG et al. 2006). As taxas de metástases à distância, para estas neoplasias, variam de 4% a 26%, sendo relativamente menor quando comparado a outras neoplasias. Estas metástases clinicamente se manifestam dois anos após o diagnóstico do tumor primário, e a taxa de sobrevida do paciente é de aproximadamente cinco meses (GARAVELLO et al. 2006).

Observa-se na clínica uma diferença no curso da doença de determinados pacientes: alguns tumores pequenos seguem um curso agressivo com desfecho fatal, enquanto que tumores maiores podem

apresentar um curso livre de recorrência. Além disso, podem ser observados, também, pacientes com mesmo estágio clínico, apresentando evolução clínica diferente, evoluindo para quadros metastáticos, seguidos de óbito.

Por este motivo, pesquisas na área de biologia molecular têm sido realizadas, a fim de elucidar eventos na progressão dos tumores que promovam estas alterações de prognóstico, para que se possa adequar o tratamento e proporcionar uma taxa de sobrevida melhor para todos os pacientes portadores destes carcinomas.

1.3 ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E MARCADORES MOLECULARES

Em 2000, SCULLY et al. Demonstraram, através de uma revisão de literatura, que o desenvolvimento do câncer oral parece ser consequência de múltiplos eventos genéticos em muitos cromossomos e genes. A consequência deste dano nos cromossomos é a alteração na regulação celular e nos sinais celulares, do ciclo de divisão celular e dos mecanismos de reparo aos danos celulares ou eliminação de células não funcionais. Estas alterações genéticas resultam na inativação de genes supressores tumorais e ativação de proto-oncogenes por deleções, mutações pontuais, e amplificações gênicas.

O acúmulo destas alterações genéticas, durante um período de tempo, parece levar à perda da regulação celular, até o ponto em que o

crescimento se torna autônomo e os mecanismos invasivos conduzem ao desenvolvimento do carcinoma.

DAS e NAGPAL (2002) citaram, em uma revisão de literatura, que a instabilidade genômica reflete a susceptibilidade do genoma em adquirir múltiplas alterações, como a perda de heterozigosidade e a instabilidade microsatélite, as quais pode contribuir para a inativação dos genes supressores do tumor. A freqüente perda de heterozigosidade nos cromossomos 3p, 6p, 7p, 8q, 9p, 13q, 17p e 18q tem sido demonstrada em diversos estudos, como o evento inicial no carcinoma epidermóides de cavidade oral, e tem sido associada com o prognóstico de lesões pré-malignas para estes carcinomas (BERGAMO et al. 2000; SINGH et al. 2002; KIM e CALIFANO 2004).

HUANG et al. (2002) demonstraram que as regiões mais comuns de ganho cromossômico envolviam 3q, 8q, 5p, 11q12-13 e 9q nos carcinomas epidermóides de cavidade oral. A amplificação da região 11q13 e a superexpressão da *ciclina D1* foram observados em 30 a 60% dos casos destes carcinomas e têm sido associadas com o aumento das taxas de metástases linfonodais e pior prognóstico (HUANG et al. 2002; PEREZ-ORDONEZ et al. 2006).

Observou-se, ainda, a amplificação e hiperexpressão do *c-myc/N-myc* em 20 a 40% dos cânceres orais, enquanto que os *int-2*, *hst-1*, em 30 a 50% dos carcinomas epidermóides de cavidade oral. Estas amplificações estão associadas com o mau prognóstico destas neoplasias e exercem um papel importante na tumorigênese destes carcinomas, estando relacionados com a

perda de diferenciação dos tumores (NAGAI 1999). Recentemente, a ativação constitutiva do *Stat-3* tem sido proposta como sendo o evento inicial na carcinogênese oral (DAS e NAGPAL 2002).

Investigações recentes têm demonstrado numerosos alvos biológicos para terapia de vários cânceres. Novos tratamentos têm sido desenvolvidos com base nestas novas descobertas, incluindo o adenovirus como mediador do *p53* para o interior celular, os inibidores de tirosina quinase *bcr-abl* e o bloqueio do receptor do fator epidermal de crescimento por anticorpos monoclonais (GONZALEZ et al. 2003).

Os carcinomas de cavidade oral apresentam expressão do receptor do fator de crescimento epidermal (*EGFR*), o qual tem sido proposto como um importante alvo terapêutico. A superexpressão deste fator tem sido associada com pior prognóstico, resistência ao tratamento, maior angiogênese, aumento da proliferação e pela expressão de mediadores do fenótipo metastático (DAS e NAGPAL 2002; MODJTAHEDI 2005).

O uso dos inibidores do *EGFR* pode exercer um importante papel no tratamento destas lesões, em combinação com outros agentes biológicos, radioterapia ou quimioterapia. Apenas 20 a 30% dos pacientes que apresentam tumores *EGFR* dependentes são beneficiados por esta terapia, além disso o tratamento crônico pode levar ao desenvolvimento de resistência a estes inibidores. Por isso, é importante a busca por novos marcadores para estabelecer um painel de valor clínico e biológico os quais possa ser usado não só para selecionar quais os pacientes que podem ganhar melhores benefícios com o uso dos inibidores do *EGFR*, como

também atender aqueles que apresentem outros perfis de alterações moleculares (MODJTAHEDI 2005; BONNER et al. 2006).

A análise e identificação de alvos moleculares têm o potencial de poder auxiliar na prevenção, diagnóstico e planejamento terapêutico do câncer de cabeça e pescoço. Não há, atualmente, nenhum marcador molecular específico em uso que possa predizer o comportamento dos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço. A identificação de marcadores com relevância biológica pode levar ao desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficientes contra uma população específica de pacientes que não apresentem resposta satisfatória aos tratamentos convencionais (MODJTAHEDI 2005).

A atividade de genes expressos em neoplasias malignas em comparação com seus correspondentes em tecidos normais, pode ajudar a delinear a extensão da origem das alterações moleculares e elucidar os mecanismos da tumorigênese (BRENTANI et al. 2003).

1.4 PROJETO GENOMA HUMANO DO CÂNCER

Em 1991, ADAMS et al. propuseram o método de seqüenciamento parcial das moléculas de RNA mensageiro, o qual permitiu o aumento no número de genes humanos conhecidos e a identificação de uma grande série de genes importantes em diversas patologias e processos celulares. Esta técnica é denominada *EST sequencing* (seqüenciamento de “etiquetas de genes expressos”) e consiste na obtenção de uma seqüência parcial,

derivada de uma das extremidades dos RNAs mensageiros transcritos a partir dos genes. Estas seqüências, ainda que parciais, são armazenadas em bibliotecas e refletem a população de genes transcritos em uma célula. Nesta técnica, geralmente, a informação gerada é oriunda das extremidades dos genes, portanto a porção central destes não é representada.

DIAS NETO et al. (1997) desenvolveram uma técnica de seqüenciamento da região central dos transcritos gênicos que foi denominada de ORESTES (*Open Reading Frames Expressed Sequences Tags*). Este método permite a obtenção de seqüências de DNA extremamente ricas em informações complementares, sendo que os dados obtidos podem ser somados com dados disponíveis em base de dados públicos para melhor caracterização das seqüências gênicas (DE SOUZA et al. 2000; DIAS NETO et al. 2000; CAMARGO et al. 2001).

A técnica de ORESTES baseia-se na geração de pequenos fragmentos de cDNA através de RT-PCR, usando primers com seqüências arbitrárias, sobre condições de baixa estringência. Esta técnica permite uma melhor amostragem dos transcritos raros, o que se reflete em uma tendência de normalização dos dados obtidos (DIAS NETO et al. 2000; CAMARGO et al. 2001).

Em 1999, o Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer e a FAPESP financiaram a realização do Projeto Genoma Humano do Câncer (HCGP), o qual tinha por objetivo descobrir novos genes envolvidos na formação dos tumores de maior importância epidemiológica no Brasil, através da análise de bibliotecas de ORESTES. Neste projeto, foram gerados mais de um

milhão de ORESTES, provenientes de 31 tipos de tecidos, sendo que, dentre estes, cerca de 30% representavam seqüências humanas inéditas. Todas as seqüências produzidas neste projeto foram depositadas em bancos de dados públicos, permitindo o seu uso por toda a comunidade científica internacional (www.ncbi.nlm.nih.gov) (DE SOUZA et al. 2000; DIAS NETO et al. 2000). Através do método de ORESTES, foram geradas cerca de 200.000 seqüências oriundas de tecidos tumorais e normais de cabeça e pescoço.

REIS et al. (2005) realizaram um estudo de expressão gênica global, baseado nos dados de ORESTES, disponíveis no banco de dados públicos, provenientes de amostras de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e tireóide. Neste estudo, foram selecionadas as seqüências que mapeavam regiões genômicas onde já havia sido descrita a perda de heterozigossidade ou amplificações em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e tireóide. Dentre estas seqüências, foram identificados genes diferencialmente expressos nos tumores em relação ao tecido normal. Alguns dos genes candidatos foram validados por RT-PCR em tempo real e foi confirmada a hiperexpressão de dois destes genes em tumores de laringe e de cavidade oral. Estes resultados demonstram o potencial da estratégia de utilização dos dados de ORESTES para a identificação de genes humanos diferencialmente expressos e que podem ser candidatos a marcadores moleculares para diagnóstico ou prognóstico destas neoplasias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAL

O objetivo deste estudo é identificar novos genes que apresentem hiperexpressão em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar genes hiperexpressos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, através da comparação dos dados públicos de ORESTES, gerados a partir de amostras de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e tecidos normais.
- Validar a hiperexpressão destes genes selecionados em amostras de carcinomas epidermóides de cavidade oral, comparando com a expressão em mucosa normal.
- Identificar genes constitutivos mais estáveis para serem utilizados como normalizadores em estudos de expressão gênica de RT-PCR em tempo real, em amostras de cavidade oral.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS DE TECIDO

Para seleção das amostras utilizadas na validação dos genes candidatos, foi realizado um levantamento de dados no Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital do Câncer A.C. Camargo, por meio de análise dos prontuários de pacientes atendidos neste hospital, no período de 2000 a 2005. Foram selecionados os pacientes portadores de carcinomas epidermóides primários de cavidade oral, os quais não receberam nenhum tratamento prévio e que possuíam amostras disponíveis no banco de tumores.

A utilização das amostras foi autorizada pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo (Processo nº738/05) e o termo de consentimento pós-informado foi devidamente assinado por todos os pacientes. As amostras foram colhidas a fresco durante o ato cirúrgico e submetidas a exame intra-operatório pelo método de congelamento para a seleção de áreas tumorais representativas e livres de necrose. As amostras foram submetidas a congelamento rápido em nitrogênio líquido e armazenadas a -70° C no Banco de Tumores do Hospital do Câncer A.C. Camargo.

Através de uma colaboração com a Escola Baiana de Medicina e Saúde Pública – Curso de Odontologia, também puderam ser utilizadas no

estudo 25 amostras de mucosa normal provenientes de indivíduos sadios e que não apresentavam nenhuma alteração patológica na cavidade oral. Estes indivíduos foram submetidos a cirurgias pré-protéticas ou cirurgia de 3° molares inclusos. Estas amostras foram colhidas no momento da cirurgia e foram congeladas imediatamente em banho de gelo seco e etanol e, em seguida, foram estocadas em freezer -70°C.

Dentre as amostras tumorais, encontravam-se amostras de assoalho bucal (11 casos), língua oral (28 casos), e área retromolar (4 casos). As amostras normais estavam divididas entre os sítios anatômicos de área retromolar (15 casos), gengiva inferior (6 casos) e gengiva superior (4 casos).

As amostras tumorais representam todos os estádios clínicos, sendo que 4% dos casos eram estadio I, 30% estadio II, 28% estadio III e 38% estadio IV. Estes dados refletem a descrição da literatura de que os tumores de cavidade oral são geralmente diagnosticados em estádios avançados.

3.2 EXTRAÇÃO DE RNA

A extração dos RNAs das amostras foi realizada utilizando-se o reagente Trizol (*Invitrogen*), seguindo as recomendações do fabricante. Basicamente, cada amostra foi homogeneizada com 800 µl de trizol e 20 µl de glicogênio (10 µg/µl) e em seguida incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Após esta incubação, foram adicionados 160 µl de clorofórmio e após centrifugação por 5 minutos para separar as fases, a fase aquosa

(superior) foi transferida para um novo tubo e re-extraída com 800 µl de Trizol e 160 µl de clorofórmio. Após nova centrifugação por 5 minutos para separar as fases, a fase aquosa (superior) foi novamente transferida para um outro tubo e os RNAs foram precipitados pela adição de 0,7 volumes de isopropanol gelado, e incubados a -20°C, por 12 horas. Após este período, os tubos foram centrifugados por 30 minutos a 4°C a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* de RNA foi lavado com 500 µl de etanol 70%. O *pellet* foi seco e dissolvido em 40 µl de água livre de RNAase.

Após a extração, todos os RNAs obtidos foram quantificados em espectrofotômetro (*NANO DROP-ND1000*) e suas integridades foram avaliadas através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio. Para isso, utilizou-se 1µg de cada RNA, em um volume de 5 µl, acrescentando-se igual volume de tampão desnaturante (2X TAE, 7M de Uréia e 30% de Glicerol). As amostras foram incubadas a 65°C por 10 minutos antes de serem submetidas à eletroforese.

Os RNAs das amostras tumorais foram extraídos pelo Banco de Ácidos Nucléicos do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

3.3 SÍNTESE DE CDNA

Após a extração e avaliação da qualidade, os RNAs das amostras foram utilizados para a síntese de cDNAs. Para isso, 2µg de RNA total foram misturados a 1µL de Oligo dT (0,5 µg/µl - Invitrogen), 1µL de dNTPs (10 mM) e água livre de RNAase em um volume de 13µL. A mistura foi incubada a

65°C durante 5 minutos e incubada em gelo por aproximadamente 1 minuto. Em seguida, foram adicionados 4 µL de 5X *First Strand Buffer*, 1 µL de DTT 0,1M, 1 µL de *RNAse out* inibidor de RNAase (40 unidades/µL) e 1 µL da enzima *SuperScript III* (200U/µL Invitogen), perfazendo um volume final de reação de 20 µL. A reação foi incubada a 50°C por 1 hora e depois a 70°C por 15 minutos. Após o término da reação, todos os cDNAs foram diluídos 10 vezes através da adição de 180 µL de água autoclavada.

3.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DOS CDNAS

Após a síntese, a qualidade dos cDNAs foi verificada por meio da amplificação de um fragmento de 311pb na região 5' do gene *NOTCH2* (NM 024408) utilizando-se os *primers* Direto 5'-TGTGGCCAACCAGTTCTCCT-3' e Reverso 5'-GGCAGTCATCAATATTCCTC-3'. As seguintes condições de amplificação foram utilizadas: 2 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,5 µL dNTPs (10mM), 1,6 µL de cada *primer* (5µM), 2,5 µL de tampão de reação 10X, 0,25 µL de *TaKaRa Ex Taq Polimerase* (5 U/µl -TaKaRa Biomedicals) e 2 µL de cDNA como molde em um volume final de reação de 25 µL.

O programa da PCR consistiu-se de 5 minutos iniciais de desnaturação à temperatura de 94°C, 35 ciclos de 30 segundos a 94°C, 45 segundos a 60°C e 45 segundos a 72°C. Por fim, um passo único de 7 minutos a 72°C. O produto obtido foi visualizado por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida 8%, com posterior coloração por prata (SANGUINETTI et al. 1994).

3.5 ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

As análises de Bioinformática foram realizadas através de uma coloboração com o Dr. Felipe Rodrigues da Silva (Cenargen – Embrapa), utilizando-se os dados de ORESTES disponíveis nos bancos de dados públicos.

Nesta análise, as 946.260 seqüências ORESTES depositadas no *NCBI* em formato FASTA foram comparadas com as 29.529 seqüências-referência de genes humanos, presentes no banco de dados *RefSeq*, utilizando-se a ferramenta *blastn* (PRUITT et al. 2005). O melhor *hit* da seqüência ORESTES com um gene humano foi utilizado para definir o gene do qual ela se originou, sem nenhuma inspeção visual. Apenas *hits* com *e-values* melhores que 1×10^{-10} foram considerados, com isso, apenas 570.214 ORESTES prosseguiram na análise. O resultado da comparação foi carregado em um banco de dados relacional.

Para identificar genes com expressão alterada entre os tumores de cabeça e pescoço e os seus correspondentes normais, foram analisadas apenas as bibliotecas de ORESTES oriundas destes tecidos, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Localização e identificação das bibliotecas de ORESTES incluídas na análise.

Localização	Bibliotecas incluídas	Nº Bibliotecas incluídas
Hipofaringe normal	HN0001 a HN0015	15
Laringe normal	HN0016 a HN0032	16
Tumor de laringe 1	HT0030 a HT0135 HT0400	106
Tumor de laringe 2	HT0815 a HT0963	148
Tumor de laringe 3	HT0964 a HT1026	62
Tumor de laringe 4	HT1128 a HT1172	44
Tumor de laringe 5	HT1189 a HT1231	42
Tumor de hipofaringe	HT0627 a HT0814	187
Tumores de Cavidade Oral	HT0001 a HT0029, HT0136 a HT0399	291

Estas bibliotecas foram utilizadas para as análises de comparação entre carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e tecidos normais.

Para permitir a identificação de genes diferencialmente expressos nos carcinomas epidermóides, foram realizadas as seguintes comparações entre as bibliotecas:

- × Laringe Normal + Hipofaringe Normal x Tumor de Cavidade Oral
- × Laringe Normal x Tumor de Laringe 1
- × Laringe Normal x Tumor de Laringe 2
- × Laringe Normal x Tumor de Laringe 3
- × Laringe Normal x Tumor de Laringe 4
- × Laringe Normal x Tumor de Laringe 5
- × Hipofaringe Normal x Tumor de Hipofaringe

Para identificar genes diferencialmente expressos dentro dos conjuntos formados, foi empregado o Teste Exato de Fischer (SIEGEL

1956). Foram considerados genes diferencialmente expressos, aqueles que apresentavam diferença de expressão significativa com $p < 0,05$.

3.6 DESENHO DOS PRIMERS

As seqüências dos *primers* para os genes candidatos selecionados foram desenhadas com o auxílio do programa *Gene Runner*. Para isso, as seqüências dos RNAs mensageiros foram obtidas a partir no site do *NCBI* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?CMD=search&DB=nucleotide>) As fronteiras intrón/exóns foram determinadas através de análises no site da *University of Califórnia Santa Cruz* (<http://www.genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>).

Os *primers* para RT-PCR foram desenhados em exóns diferentes, a fim de evitar a amplificação de possível contaminação de DNA genômico. Além disso, buscou-se desenhar os *primers* preferencialmente nos exóns mais próximos à porção 3' e o tamanho dos fragmentos amplificados variou entre 89 a 490 pares de base. Na tabela 2, são fornecidas as seqüências dos *primers* de todos os genes avaliados no estudo.

Os *primers* para os genes selecionados como genes de referências ou normalizadores já haviam sido descritos na literatura e foram obtidos através da pesquisa no site <http://www.gene-quantification.org/>. Os *primers* foram selecionados para estudos de expressão gênica com a utilização de SYBR Green como agente de fluorescência. Na Tabela 3, são fornecidas as seqüências dos *primers* utilizados como normalizadores neste estudo.

Tabela 2 - Primes para os genes selecionados para validação por RT-PCR em tempo real.

Símbolo do Gene	Fragmento (pb)	Primer Forward	Exon	Primer Reverse	Exon
AHSA1	191	F 5'-TGCCAAAGATGAGCCTGACACAA-3'	4	R 5'-TGCCTCCTCAGTTTTCAGTGC-3'	5
ALDOA	254	F 5'-GAACACACCCCCCTCAGCCCTC-3'	9	R 5'-CAAGCATGGCCTGGGGTGAC-3'	11
ARTGAP1	192	F 5'-AATCCACACAGAAGAGCCCCGC-3'	2	R 5'-GGAAGATGCCCTCGGTGGTGA-3'	5
HADAC1	250	F 5'-CTGAAGAGGAGGGAGAGGGGG-3'	12	R 5'-ATAAATCTAGGGTTGGGGAAG-3'	14
KRT5	285	F 5'-GACAACAACCGCAACCTGGACC-3'	5	R 5'-CTCCCCACGCTGCTCGGC-3'	7
KRT6A	89	F 5'-CTGAATGGCGAAGGCGTT-3'	4	R 5'-CTGCCGACACCACCTGGC-3'	5
PABPC1	195	F 5'-GGTGAACGGCAGACGGAACT-3'	2	R 5'-CCTTTGCTGCGACCAACCCTC-3'	4
POLQ	490	F 5'-CCTTCCACTCAACCTTCAAAATCCCA-3'	4	R 5'-TTCCCCACGCCCCCAG-3'	6
RPL19	273	F 5'-GGAAAAACACCTTGGCCCCGC-3'	3	R 5'-GGAGCTTCTTGGGGGCCCTTG-3'	5
RPL23	199	F 5'-AAGGCAAAACCAGAGCTCAGAAAAAAG-3'	3	R 5'-CAATCCGGGGCCACAAGTCTG-3'	5

São fornecidas as seqüências de cada *primer*, suas localizações e o tamanho dos fragmentos amplificados.

Tabela 3 - Primes utilizados como normalizadores nos experimentos de RT-PCR em tempo real.

Símbolo do Gene	Fragmento (pb)	Primer Forward	Primer Reverse	Referência
ACTB	155	F 5'-CACTGTGTTGGCGTACAGGT-3'	R 5'-TCATCACCATTGGCAATGAG-3'	Laboratório Genética do Câncer
B2M	165	F 5'-TATCCAGCGTACTCCAAAGA-3'	R 5'-GACAAGTCTGAATGCTCTCCAC-3'	Max et al. 2001
BGUS	152	F 5'-GATCCGCACTGTGGCTGTCA-3'	R 5'-AGCCAGCGAAGCAGGTTGA -3'	Gerard et al. 2000
GAPDH	351	F 5'-TGCACCACCAACTGCTTAGC-3'	R 5'-CAGTGTAGCCAGGATGCCCTTGAG-3'	Laboratório Genética do Câncer
HMBS	145	F 5'-ACCAAGGAGCTTGAACATGC-3'	R 5'- GAAAGACAACAGCATCATGAG -3'	Steckelbroeck et al. 2002
HPRT1	141	F 5'-GCCAGACTTTGTGGATTGTG-3'	R 5'-CTCTCATCTTAGGCTTTGTATTTTG -3'	Erovic et al. 2003
PGK	118	F 5'-ATGGATGAGGTGGTGAAAGC-3'	R 5'-CAGTGCTCACATGGCTGACT-3'	University of Cambridge, HGMP Resource Centre Hinxtton Hall
PPIA	116	F 5'-CCCACCGTGTCTTCGACAT-3'	R 5'- CCAGTGCTCAGAGCACGAAA -3'	Murphy et al. 2003
RPLP0	149	F 5'-GGCGACCTGGAAGTCCAACT-3'	R 5'-CCATCAGCACACAGCCTTC-3'	Bieche et al. 2001
TBP	132	F 5'-TGCACAGGAGCCCAAGAGTGAA-3	R 5'- CACATCACAGCTCCCCACCA -3'	Girault et al. 2003

São fornecidas as seqüências de cada *primer*, suas localizações e o tamanho dos fragmentos amplificados

3.7 CÁLCULO DA EXPRESSÃO RELATIVA E ESCOLHA DO GENE NORMALIZADOR

O cálculo da expressão gênica relativa foi realizado utilizando-se a equação $2^{-\Delta\Delta Ct}$ descrita por LIVAK e SCHMITTGEN (2001). O método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ou método comparativo de Ct é uma equação matemática em que as mudanças na expressão gênica são calculadas baseadas nas diferenças entre as amostras calibradoras e as experimentais, normalizadas por uma referência.

Vale destacar que o valor inferido à ΔCt equivale à diferença entre o valor da média dos Cts do gene de interesse e a média dos Cts do gene normalizador. Já o cálculo da fórmula $\Delta\Delta Ct$ envolve a subtração entre o valor de ΔCt para cada amostra experimental e o valor de ΔCt para as amostras calibradoras.

O gene ideal para ser utilizado como normalizador destas reações seria aquele que não mostrasse variação no nível de expressão entre as amostras avaliadas (experimental e calibradora). É importante ressaltar que esta variação é relevante e pode gerar uma interpretação errônea na análise do perfil da expressão gênica. Conseqüentemente, esta questão faz surgir um outro importante ponto no aspecto do desenho experimental: a escolha de um gene apropriado para normalizar essas variações.

Diversos trabalhos têm realizado um painel de normalizadores a fim de buscar os genes que apresentem expressão mais estável para um determinado tipo de tecido. Para se chegar a estes genes, vários modelos

matemáticos foram desenvolvidos, sendo que os mais utilizados nas recentes publicações de seleção de genes normalizadores são o GeNorm e o Normfinder.

O GeNorm utiliza um modelo matemático em que é determinado um valor de estabilidade "M" para cada gene normalizador. Os genes que apresentam maior valor de "M" seguem um passo de exclusão, até restar os dois genes mais estáveis. Os autores recomendam que sejam utilizados, no mínimo, estes dois genes para as análises de expressão gênica. O programa realiza uma segunda análise em que é sugerida a melhor quantidade de genes a serem utilizados nas análises. Esta análise está baseada na determinação de um valor de variação aos pares "V" entre os genes normalizadores, portanto um valor de ponto de corte (*cut-off*) de 0,15 determina o número de genes que devem ser utilizados para a normalização (VANDESOMPELE et al. 2002).

O programa NormFinder é um algoritmo que classifica os genes de acordo com sua estabilidade de expressão em um grupo de amostras, através de um modelo matemático que usa uma ferramenta de estatística sólida para estimar tanto a variação total da expressão, como também a variação entre subgrupos de amostras (ANDERSEN et al. 2004).

Para a obtenção dos dados a serem inseridos em ambos os programas, foi realizada a média aritmética dos valores de Cts das triplicatas de cada amostra para todos os normalizadores. Estes valores foram transformados em quantidades relativas, através do método comparativo de Ct proposto pelo manual do programa. As variações experimentais, como

variações de pipetagem e alterações na eficiência enzimática, foram descartadas com a replicata dos experimentos.

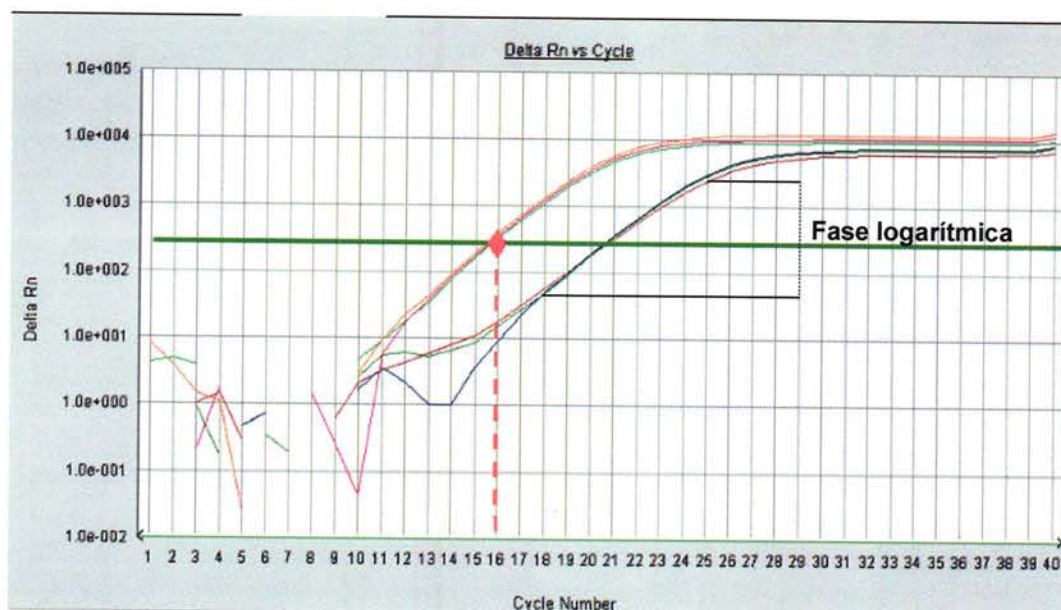
3.8 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA POR MEIO DE RT-PCR EM TEMPO REAL

A técnica de RT-PCR em tempo real se baseia na coleta de dados, à medida que o processo de PCR ocorre; assim, a amplificação e a detecção se realiza em um único passo. Isto a difere da reação de RT-PCR convencional, na qual a detecção acontece depois de um número fixo de ciclos, o que representa a quantidade final de cada produto acumulado.

Nesta técnica, o acúmulo do produto na fase logarítmica da reação de amplificação está diretamente relacionado à quantidade de molde existente no início da reação. Os valores para serem utilizados na quantificação são obtidos através da determinação do *threshold*. Como é observado na figura 1, o *threshold* é o ciclo da PCR (*Ct - Threshold cycle*) em que o nível de fluorescência atinge um ponto pré-estabelecido da fase logarítmica de amplificação. Este ponto é utilizado para calcular a quantidade de produto presente no início da reação.

Inicialmente, as reações de padronização foram realizadas em RT-PCR, sendo utilizadas as seguintes condições: 2,5 μL de tampão Taq Platinum (10X), 2 μL de MgCl_2 (50 mM), 0,25 μL de Taq Platinum DNA polimerase (5 U/ μL) (Invitrogen), 0,8 μL de cada *primer* (10 μM), 0,5 μL de dNTPs (10 mM) e 2 μL de cDNA como molde, em volume final de 25 μL . O

programa da PCR apresentava 2 minutos iniciais de desnaturação à temperatura de 95°C, 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto com a temperatura de *annealing* variando entre 56°C e 70°C e 1 minuto a 72°C e no final, um passo único de 7 minutos a 72°C. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de acrilamida 8% para visualização dos produtos resultantes.



Legenda: As reações foram realizadas em triplicata. A linha verde representa o *threshold* e o ponto vermelho representa o Ct (*threshold cycle*). A primeira curva representa uma amostra tumoral e, por apresentar um valor de Ct mais baixo, pode-se concluir que apresenta uma maior expressão deste gene. A segunda curva representa uma amostra normal, em que o gene *ALDOA* apresenta uma menor expressão, pois o valor de Ct foi mais alto.

Figura 1 - Gráfico de amplificação do gene *ALDOA* em duas amostras de tecido da cavidade bucal.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
 Maria Rodrigues Alves Kuninari
 Coordenadora Pós-Graduação

Após a obtenção de um produto único e específico, foram realizadas as reações de RT-PCR em Tempo Real, no aparelho *ABI® 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems)*, sendo utilizados 2 µL Tampão Taq Platinum (10X), 0,8 µL de $MgCl_2$ (50mM), 0,4 µL de dNTPs (10 mM), 0,4 µL de cada primer (10 µM), 0,2 µL de *Taq Platinum DNA polimerase* (5 U/µL-Invitrogen), 1 µL de DMSO 100% (Sigma Chemical Co.), 0,2 µL de *Sybr Green I (Invitrogen)* diluído 100 vezes em água estéril, 2 µL de cDNA, em um volume final de reação de 20 µL.

As condições utilizadas nos experimentos dos genes de referências e da *ACTB* e *GAPDH* foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, amplificação com 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, à temperatura de *annealing*, previamente determinada para cada gene por 30 segundos, e 72°C por 30 segundos.

Para os demais *primers* dos normalizadores, foi utilizada a padronização descrita na referencia bibliográfica (Tabela 3). Assim, seguindo esta padronização não foi utilizada a fase de extensão, sendo realizada a amplificação com 40 ciclos de 95°C por 15 minutos, e a temperatura de *annealing* determinada por 60 segundos.

Todas as reações foram realizadas em triplicadas em placas de 96-wells. Em cada placa, sempre esteve presente um controle positivo, representado por uma linhagem celular que foi utilizada para todas as padronizações e um controle negativo, reação em que foram adicionados todos os reagentes, exceto os cDNAs. Para as quantificações foram utilizadas as médias das triplicatas. Quando uma das triplicatas apresentava

discrepância de um ciclo ou mais entre as outras duas, esta foi descartada e a média foi realizada com o valor de Ct das duas replicatas restantes. Porém, quando a diferença entre as três era maior ou igual a um ciclo, ou quando não havia amplificação de uma das triplicatas, a reação para esta amostra era repetida.

O valor do *threshold* determinado com a curva padrão para cálculo da eficiência de amplificação de cada gene foi utilizado para todas as seguintes reações analisadas (Tabela 14).

3.9 CÁLCULO DE EFICIÊNCIA DE AMPLIFICAÇÃO

Para a utilização do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK e SCHMITTGEN 2001) no cálculo da expressão gênica, é necessário que as eficiências de amplificação dos genes alvos e dos genes normalizadores sejam de 100% $\pm$ 10% (Application Note-Gene Expression 127AP05-01).

Para obter a curva de eficiência de amplificação para cada gene, foram realizadas reações com diluições seriadas de 1x, 10x, 100x e 1000x de um cDNA da linhagem celular FaDu, utilizada previamente na padronização. As reações com estas diluições geraram curvas, apresentando uma diferença de aproximadamente três ciclos. Com os dados destas diluições coletados durante a fase exponencial do gráfico gerado na reação de RT-PCR em Tempo Real, foi gerada uma *curva standard*. Esta curva fornece um valor de *slope* que foi utilizado para calcular a eficiência de amplificação de cada conjunto de *primers*, através da fórmula abaixo.

$$\text{Eficiência} = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$$

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliar a possível correlação dos genes hiperexpressos com o local do tumor e o estadiamento clínico, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando como significativo um valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO DOS GENES CANDIDATOS

Através de análises de bioinformática, os dados públicos de ORESTES de cabeça e pescoço foram analisados e 109 genes diferencialmente expressos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço foram identificados. Destes, 40 genes eram hiperexpressos no tecido tumoral, quando comparados à expressão no tecido normal. Com o objetivo de selecionar os candidatos que deveriam prosseguir no estudo e serem submetidos ao processo de validação, este grupo de 40 genes hiperexpressos foi minuciosamente analisado por inspeção manual, utilizando-se diversas ferramentas disponíveis *on-line* (Tabela 4). Os critérios de análises adotados foram:

- 1- Validação do nível de expressão do transcrito pelas análises de ORESTES com os dados de ESTs em tecidos tumorais e normais de cabeça e pescoço.
- 2- Comparação entre localização cromossômica dos genes e comparação entre regiões cromossômicas descritas na literatura como regiões de ganho em cabeça e pescoço.
- 3- Processo biológico em que a proteína codificada pelo gene está envolvida.
- 4- Envolvimento com o processo de carcinogênese.

- 5- Genes previamente descritos como envolvidos com carcinomas de cabeça e pescoço foram desconsiderados.
- 6- Disponibilidade de anticorpo comercial para uma eventual validação do aumento de expressão por imunohistoquímica.

Seguindo estes critérios pré-estabelecidos, foram selecionados 17 candidatos (*ALDOA*, *AHSA1*, *ARHGAP1*, *COL9A3*, *COL17A1*, *HDAC1*, *KRT5*, *KRT6A*, *KRT14*, *PABPC1*, *POLQ*, *POLR2K*, *PRR4*, *RPL10A*, *RPL19* e *RPL23*), sendo assim selecionamos preferencialmente aqueles que apareciam nas bibliotecas de cavidade oral e que apresentavam o maior valor do nível de expressão em ORESTES. Ao fim desta avaliação, 10 genes (*ALDOA*, *AHSA1*, *ARHGAP1*, *HDAC1*, *KRT5*, *KRT6A*, *PABPC1*, *POLQ*, *RPL19* e *RPL23*) foram escolhidos para serem validados em um primeiro momento (tabela 5). A maioria dos genes selecionados se localiza em regiões já descritas na literatura como sendo regiões de ganho de material cromossômico, exceção às regiões 1p34 (*HDAC1*) e 16q22-q24 (*ALDOA*), ainda não associadas a este evento (HUANG et al. 2002).

Tabela 4 - Ferramentas disponíveis *on-line* utilizadas para a avaliação dos genes candidatos.

Sigla do Banco de Dados	Endereço do <i>web-site</i>	Principal função
NCBI	www.ncbi.nih.gov	Informações gerais
ABCAM	www.abcam.com	Comercialização de anticorpos
Santa Cruz	www.scbt.com	Comercialização de anticorpos
Dako	www.dakousa.com	Comercialização de anticorpos
ScQuest	www.sciquest.com	Comercialização de anticorpos
GeneCards	bioinfo.weizmann.ac.il/cards/index.html	Informações gerais
CGAP	www.cgap.nci.nih.gov	Dados de expressão de SAGE
UniGene	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene	Informações gerais e dados de expressão em ESTs
OMIM	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM	Catálogo de genes humanos e desordens genéticas
LocusLink	www.ncbi.nlm.nih.gov/LocusLink	Informações gerais
PubMed	www.ncbi.nlm.nih.gov	Informações na literatura
QED	www.qedbio.com	Busca por anticorpos

Tabela 5 - Informações sobre os genes hiperexpressos em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço identificados pelo estudo.

ID ^p	Símbolo	Nome	ORESTES Tumor	ORESTES Normal	Híper	Localização Cromossômica	Função Celular [#]
NM_012111	AHSA1	activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1	0.534	0.000	ND	14q23.3-31	Estimulador da atividade ATPase e das chaperonas e ligação com chaperonas
NM_000034	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate , transcript variant1	3.847	0.000	ND	16q22-q24	Atividade de aldolase frutose-bifosfonada e de liase
NM_004308	ARHGAP1	Rho GTPase activating protein 1	0.812	0.000	ND	11p12-q12	Organização e biogênese do citoesqueleto, sinalização da tradução
NM_004964	HDAC1	histone deacetylase 1	0.417	0.000	ND	1p34	Atividade de histona desacetilase e de hidrolase, fator de atividade e ligação transcricional
NM_000424	KRT5	keratin 5	1.045	0.000	ND	12q12-q13	Constituinte estrutural do citoesqueleto, ligação de proteínas.
NM_005554	KRT6A	keratin 6A	2.107	0.000	ND	12q12-q13	Constituinte estrutural do citoesqueleto, ligação de proteínas.
NM_002568	PABPC1	poly(A) binding protein, cytoplasmic 1	0.846	0.035	24.17	8q22.2-q23	Ligação com a cauda de poly A, com o RNA e com proteínas e atividade de ativação da transcrição
NM_199420	POLQ	polymerase (DNA directed), theta	0.646	0.000	ND	3q13.33	Ligação com o ATP e com o DNA lesado e Atividade de trasferase
NM_000981	RPL19	ribosomal protein L19	1.036	0.000	ND	17q11.2-q12	Constituinte estrutural do ribossomo
NM_000978	RPL23	ribosomal protein L23	0.104	0.000	ND	17q	Constituinte estrutural do ribossomo

São fornecidas informações sobre o a identificação do gene, frequência (número de ORESTES no tumor/normal), localização cromossômica, localização celular e função *Número de identificação no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) #Função descrita no Entrez Gene (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>)

Algumas das principais características dos genes selecionados são:

- × **ALDOA** (*aldolase A, fructose- biphosfatase*): o produto deste gene é uma enzima glicolítica que cataliza a conversão reversível da frutose-1-6- bifosfato para gliceroldeido 3- fosfato e dihidroxiacetona fosfato. A aldolase A é associada ao desenvolvimento do embrião e é produzida em grande quantidade em músculos de adultos, porém sua expressão é reprimida no fígado, nos rins e nos intestinos de adultos. A deficiência desta proteína está associada com a anemia hemolítica e com a miopatia.
- × **AHSA1** (*activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1*): este gene pode ser denominado também como *p38*; *AHA1*; *C14orf3*, já foi identificado em bibliotecas de ESTs de colón, timo, intestino, pulmão e sangue.
- × **ARHGAP1** (*Rho GTPase activating protein 1*): a família das proteínas Rho ativadoras de GTPase exercem um papel importante na regulação de muitos aspectos do comportamento celular, incluindo progressão do ciclo celular, reorganização do citoesqueleto, polaridade celular, invasão e migração. As alterações genéticas nesta família de genes leva à carcinogênese, através da desregulação das GTPases tipo *Rho/Rac/Cdc42*. Estudos mostram que, em tumores primários coloretais, a família do *ARHGAP* encontra-se com aumento de expressão.
- × **HDAC1** (*histone deacetylase 1*): as histonas são proteínas nucleares que se ligam ao DNA e formam os nucleossomos; estão diretamente

envolvidas tanto no empacotamento do DNA, como na regulação da transcrição, portanto, a acetilação e a desacetilação de histonas exercem um papel importante na regulação da expressão gênica. A proteína codificada por este gene pertence à família histonas desacetilases/acuc/apha. Esta proteína forma um complexo com a *RB1* que está relacionado com o controle da proliferação e diferenciação celular; ainda está envolvido na desacetilação do *p53*, modulando os seus efeitos de apoptose e regulação da proliferação celular.

- x ***KRT5*** (*keratin 5*): a proteína codificada por este gene é um membro da família das queratinas, relacionadas com os filamentos intermediários das células epiteliais. Pode ser dividida em 2 subfamílias: ácidas (tipo I) e básicas (tipo II); as *KRT5* fazem parte da subfamília das proteínas básicas. Estas proteínas estão coexpressas durante a diferenciação dos tecidos epiteliais simples para o estratificado. Este tipo de citoqueratina é especificamente expresso na camada basal da epiderme com os membros da família da queratina 14 (tipo I ou ácida) Na doença "epidermólise bolhosa simplex" foram observadas diversas mutações pontuais no gene *KRT5*.
- x ***KRT6A*** (*keratin 6A*): a proteína codificada por este gene é outro membro da família das queratinas. Este gene é expresso com os membros da família *KRT16* e/ou *KRT17* na papila filiforme da língua, no epitélio estratificado da mucosa oral, no esôfago e no epitélio

glandular. Existem mais de 6 tipos diferentes de isoformas da proteína KRT6, que estão relacionadas com a estrutura do gene e os níveis das seqüências dos aminoácidos identificados. A multiplicidade deste gene é atribuída a seus sucessivos eventos de duplicação. Mutações neste gene estão associadas com a Paquioniquia congênita autossômica recessiva ou síndrome de Jadassohn-Lewandowsky.

- * **PABPC1** (*poly(A) binding protein, cytoplasmic 1*): esta proteína é encontrada no complexo da cauda de poli A e está envolvida na tradução e degradação do RNA mensageiro, estabilização do 5' cap, além disso, exerce um papel importante na deadenilação (remoção da cauda de poli A) e na proteção da cauda de poli A.
- * **POLQ** (*polymerase (DNA directed), theta*): esta proteína foi identificada por SHARIEF et al. (1999) e pode participar tanto da replicação do genoma quanto dos seus processos de reparo. Esta proteína já foi identificada em bibliotecas de cDNA de cerebelo, de tecido linfóide e nas linhagens celulares KB e HeLa.
- * **RPL19** (*ribosomal protein L19*): este gene codifica uma proteína ribossomal que compõe a subunidade 60S dos ribossomos; esta proteína pertence à família das proteínas ribossomais L19E e está localizada no citoplasma. DRESSMAN et al. (2003) mostraram que o RNA mensageiro codificado por esta proteína estava mais abundante em amostras de câncer de mama as quais expressavam altos níveis de *erbB-2*.

- × **RPL23** (*ribosomal protein L23*): este gene codifica uma proteína ribossomal que compõem a subunidade 60S dos ribossomos; esta proteína pertence à família das proteínas ribossomais L14E e está localizada no citoplasma. Tanto a proteína ribossomal S13 como a RPL23 já foram previamente descritas como tendo aumento de expressão em linhagens celulares de câncer gástrico que apresentam resistências a drogas (SHI et al. 2004).

4.2 COLETA DAS AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DO RNA

Foram selecionados 51 casos tumorais presentes no Banco de Tumores do Hospital do Câncer A. C. Camargo, dos quais foram confeccionadas lâminas com corte de 0,5 mm e estas foram coradas em hematoxilina e eosina para avaliação do material e confirmação do diagnóstico pelo Dr. Antônio Hugo Campos, do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo. Foram excluídos três casos por falta de material viável, permanecendo no estudo, portanto, 48 casos tumorais.

Os casos analisados que apresentavam tecido conjuntivo, fibrose ou outros tecidos que pudessem alterar a qualidade do RNA extraído, foram micro dissecados manualmente pelo mesmo patologista e o material viável foi conservado em freezer a -70°C.

As quantidades de RNA obtidas das amostras tumorais variaram de 2,89 a 190,80 µg. Das amostras normais se conseguiu de 7,20 a 136,34 µg

de RNA. Os valores do *ratio* (razão de absorbância entre os valores 260/280) para amostras tumorais variaram de 1,65 a 1,83 e, para as amostras normais, estes valores foram de 1,76 a 2,24 (Tabela 6 e 7), demonstrando a boa qualidade dos RNAs obtidos.

Tabela 6 - Valores de quantificação do RNA das amostras tumorais.

Identificação	Ratio	ug totais
01 T	1,83	134,88
02 T	1,81	41,28
03 T	1,80	26,16
04 T	1,71	10,72
05 T	1,80	63,00
06 T	1,80	28,92
07 T	1,83	169,44
08 T	1,70	6,16
09 T	1,67	10,48
10 T	1,78	30,16
12 T	1,75	28,96
13 T	1,77	29,36
14 T	1,80	57,12
15 T	1,81	40,40
16 T	1,80	16,16
17 T	1,81	36,24
18 T	1,70	15,64
19 T	1,80	14,48
20 T	1,80	75,60
21 T	1,83	26,80
22 T	1,82	96,12
23 T	1,73	12,48
25 T	1,80	17,88
26 T	1,82	28,4
27 T	1,71	18,88
28 T	1,80	25,44
29 T	1,80	29,24
30 T	1,81	32,64
31 T	1,70	7,36
32 T	1,79	16,56
33 T	1,82	131,52
34 T	1,75	8,28

35 T	1,82	24,04
36 T	1,85	31,84
37 T	1,84	158,64
38 T	1,80	14,24
39 T	1,76	10,88
40 T	1,83	190,80
41 T	1,81	34,08
42 T	1,76	59,40
43 T	1,82	60,36
44 T	1,75	34,92
45 T	1,80	45,48
46 T	1,77	74,52
47 T	1,80	72,60
49 T	1,80	111,24
50 T	1,75	39,00
51 T	1,80	16,36

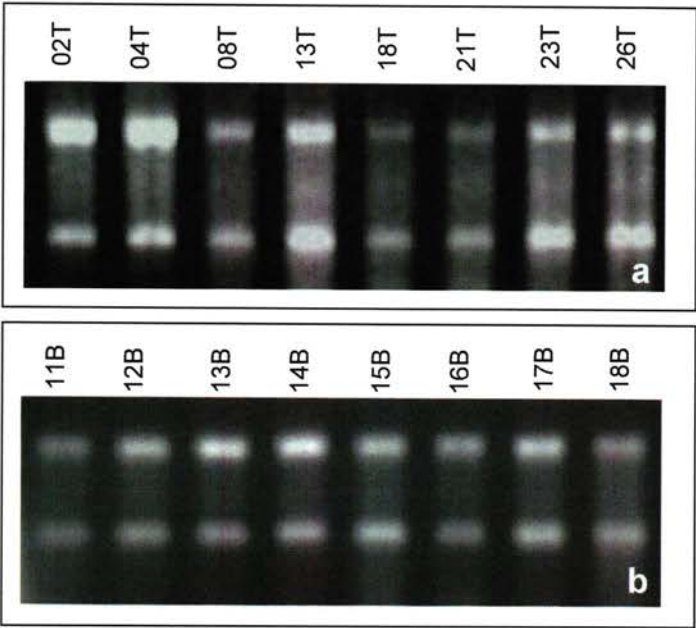
Tabela 7 - Valores da quantificação dos RNAs das amostras de normais.

Identificação	Ratio	ug totais
01B	1,93	136,34
02B	2,07	20,95
03B	2,13	15,39
04B	2,07	18,36
05B	1,86	31,62
06B	2,10	16,14
07B	2,24	7,20
08B	2,13	8,73
09B	1,92	21,04
10B	1,88	18,12
11B	1,76	11,02
12B	1,98	78,41
13B	1,99	69,81
14B	1,88	12,86
15B	1,92	18,24
16B	1,92	19,10
17B	1,93	26,21
18B	1,97	51,05
19B	1,92	20,65
20B	1,99	100,32
21B	1,97	61,58
22B	1,90	23,44

23B	1,94	108,67
24B	1,93	19,00
25B	1,95	33,32

ID: identificação das amostras, R: razão de absorbância entre os valores 260/280.

Após a eletroforese em gel de agarose, foram considerados RNAs de boa qualidade aqueles que apresentaram bandas nítidas correspondentes aos RNAs ribossômicos 28S e 18S (Figura 2a e 2b). Todas as 48 amostras tumorais que foram encaminhadas para extração do RNA apresentaram RNA de boa qualidade assim como as 25 amostras normais, portanto, todas as amostras prosseguiram no estudo.



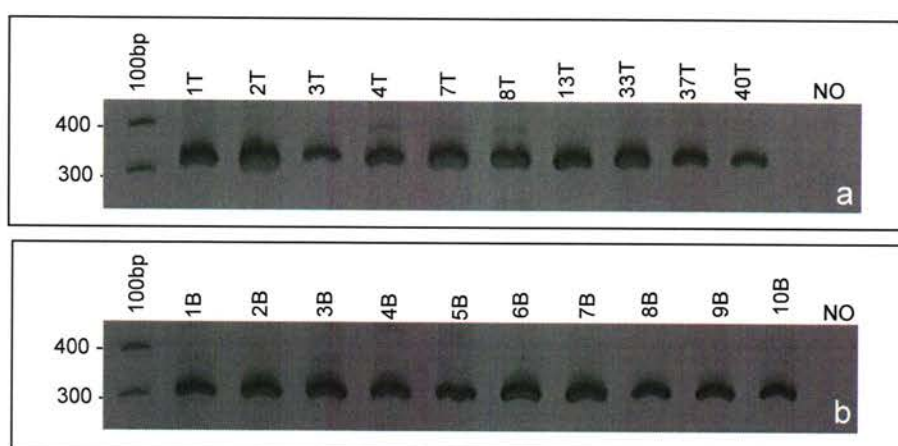
Legenda: a) amostras tumorais e b) amostras normais.

Figura 2 - Gel de agarose a 1% mostrando a qualidade do RNA extraído de alguma das amostras.

4.3 AVALIAÇÃO DA SÍNTESE DE cDNA

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Antônio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninani
Coordenadora Pós-Graduação

Cerca de 2 μ g de cada RNA foram utilizados para a síntese de moléculas de cDNA e a qualidade dos produtos obtidos foi avaliada por meio de RT-PCR, utilizando *primers* localizados na extremidade 5' do gene *NOTCH2*, resultando em um produto de tamanho esperado de 311 pares de base. Pelo fato deste gene possuir mais de 11Kb e da síntese da primeira fita de cDNA ocorrer a partir da cauda poli-A (utilizando-se oligo-dT como iniciador), a amplificação de um fragmento localizado na extremidade 5' deste gene indica a presença de moléculas de RNA longas e íntegras na amostra inicial e uma boa eficiência da reação de síntese de cDNA. Para todas as amostras utilizadas no estudo, foi obtida a amplificação para o gene *NOTCH2*, o que demonstra que para todas elas foi possível conseguir uma boa eficiência na síntese do cDNA (Figura 3).



Legenda: Na canaleta 1 está representado o marcador de peso molecular (100 pb DNA Ladder- Invitrogen); nas canaletas de 2 a 11 estão presentes as amostras de cDNAs avaliadas, apresentando amplificação eficiente, demonstrado pela presença das bandas de 311pb; na canaleta 13 está representado o controle negativo da reação. Gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. a) amostras tumorais, b) amostras normais.

Figura 3 - Amplificação de um fragmento de 311pb do gene *NOCTH2*, gel de poliacrilamida 8%, atestando a qualidade da síntese do cDNA sintetizado de algumas das amostras.

4.4 ESCOLHA DO GENE NORMALIZADOR

Os genes normalizadores são genes constitutivos utilizados para corrigir variações nas quantidades iniciais de cDNA nos experimentos de RT-PCR em tempo real. Idealmente, estes genes devem apresentar pequena variação no nível de expressão de RNAm entre as diferentes populações de amostras estudadas.

A Tabela 8 apresenta os genes (*ACTB*, *B2M*, *BGUS*, *GAPDH*, *HMBS*, *HPRT1*, *PGK*, *PPIA*, *RPLO* e *TBP*) que foram avaliados neste estudo. Todos eles são genes descritos na literatura com tendo expressão constitutiva em vários tipos celulares, e estando envolvidos em diferentes processos celulares, como glicosilação, metabolismo, imunidade, constituinte do citoesqueleto, biossíntese de proteínas. Estes genes já foram utilizados como normalizadores em estudos isolados de expressão gênica em cabeça e pescoço ou em outras localizações. Uma vez que estes genes apresentam classes funcionais diferentes, as chances deles serem co-regulados é bastante reduzida.

Para minimizar variações experimentais, todos os genes foram avaliados em cDNAs oriundos de uma mesma reação de síntese, e as amostras tumorais e normais foram testadas na reação de RT-PCR em tempo real.

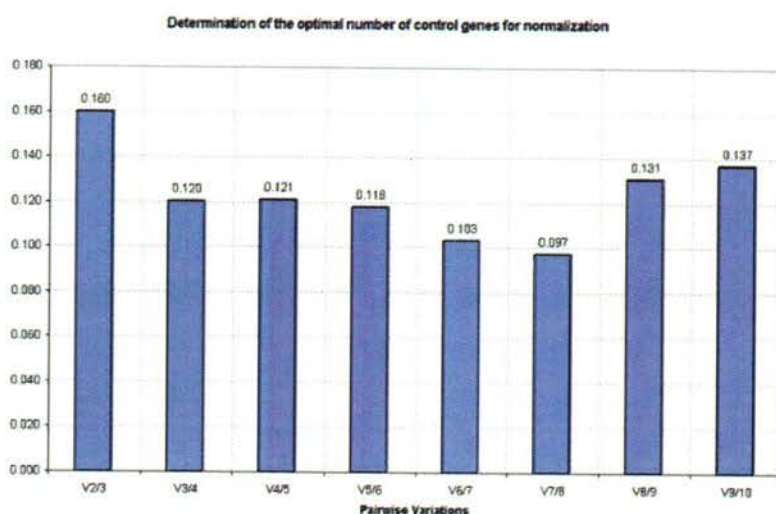
Foram selecionadas, inicialmente, 10 amostras tumorais aleatórias de carcinoma epidermóide de cavidade oral e 10 amostras de tecido bucal normal. A expressão dos 10 genes normalizadores neste conjunto de amostras foi determinada através de experimentos de RT-PCR em tempo real e os genes mais estáveis foram selecionados através de análises realizadas pelo programa GeNorm. Uma replicata independente deste experimento foi realizada.

Através desta análise, foram classificados como genes mais estáveis o *PGK*, *PPIA*, *TBP*, *HPRT1*, *B2M*, *RPLO*, *BGUS*, *HMBS*, *ACTB* e o menos estável o *GAPDH* (Tabela 9). Conforme pode ser observado na Figura 4, levando em consideração o *cut-off* de 0,15, a utilização dos três genes mais estáveis (*PGK*, *PPIA*, *TBP*) foi sugerida pelo programa para a normalização de amostras de carcinoma epidermóide de cavidade oral e de tecido bucal normal, pois a comparação entre 2 e 3 genes apresentou um *cut-off* de 0,16, indicando que usar 3 genes é melhor que usar apenas 2, enquanto que a comparação entre 3 e 4 genes apresentou um *cut-off* de 0,12, mostrando que não se observa melhora quando se usam 4 genes. A replicata do experimento confirmou os mesmos achados.

Tabela 8 - Genes utilizados para as análises de seleção do controle interno mais estáveis que foram utilizados como referencia na quantificação relativa da expressão gênica.

ID*	Símbolo	Nome	Funções	Processo
NM_001101	ACTB	<i>actin, beta</i>	Proteína do citoesqueleto, essencial para a estrutura e movimentação do citoesqueleto	Citoesqueleto, estrutura e locomoção celular
NM_004048	B2M	<i>beta-2-microglobulin</i>	Antígeno do MHC, envolvido na resposta imune	Imunidade mediada pelo MHC
NM_000181	BGUS	<i>glucuronidase beta</i>	Glicoproteína, exoglicosidase em lisossomos	Glicosilação
NM_002046	GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	Dehidrogenase, oxidoreductase em glicólise e gluconeogênes	Glicólise
NM_000190	HMBS	<i>hydroxymethylbilane synthase</i>	Atividade de síntese do hidroximetilbilane, atividade de transferase	Hemo biosíntese
NM_000194	HPRT1	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>	Glicosiltransferase, síntese de purinas em diversas vias	Metabolismo – Nucleotídeo
NM_000291	PGK1	<i>phosphoglycerate kinase 1</i>	Enzima envolvida na glicólise promovida pelo GAPDH, carboidrato cinase	Glicólise
NM_021130	PPIA	<i>peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)</i>	Atividade de isomerase, ligação com peptídeos e vírus	Auxilia na dobradura endógena das proteínas, regulação da replicação do genoma viral
NM_001002	RPLPO	<i>ribosomal protein, large, P0</i>	Ligação de proteínas e RNA, Constituinte estrutural dos ribossomos	Biosíntese de proteínas, montagem e biogênese dos ribossomos, alongamento traslacional
NM_003194	TBP	<i>TATA box binding protein</i>	Ligação com o DNA e com a RNA polimerase II, atividade de fator de transcrição	Regulação da transcrição

*Número de identificação no NCBI (www.ncbi.nih.gov)



Legenda: A comparação entre 2 e 3 genes apresentou um "cut-off" de 0,16, ou seja, acima do "cut-off" determinado pelo programa, enquanto que a comparação entre 3 e 4 genes apresentou um "cut-off" de 0,12. Assim, pode-se inferir que o melhor número de genes a serem usados no cálculo da expressão gênica são os 3 genes mais estáveis.

Figura 4 - Gráfico que mostra a determinação do melhor número de genes a serem utilizados para normalização.

Com o objetivo de validar estes resultados, os mesmos 10 genes foram analisados em outras 10 amostras tumorais e outras 10 amostras normais. Foram realizados todos os passos conforme o primeiro experimento. Porém, o resultado deste segundo experimento foi discordante do experimento anterior. Nesta segunda análise, foram classificados, em ordem, como genes mais estáveis o *RPLO*, *TBP*, seguidos por *HPRT1*, *PPIA*, *HMBS*, *PGK*, *ACTB*, *BGUS*, *GAPDH* e *B2M*. Na análise para determinação do melhor número de genes a serem utilizados para normalização, o programa sugeriu a utilização dos quatro genes mais estáveis, ou seja, *RPLO*, *TBP*, *HPRT1* e *PPIA* (Tabela 9). Neste segundo experimento, a replicata também confirmou os achados.

O racional da utilização do programa GeNorm para seleção de normalizadores pressupõe que se avalie um dado número de genes em uma

amostragem representativa dos grupos que se pretende comparar. Entretanto, em face da diferença dos resultados obtidos nos dois experimentos, uma vez que o primeiro indicou a utilização dos genes *PGK*, *PPIA*, *TBP* como normalizadores e o segundo, os genes *RPLO*, *TBP*, *HPRT1* e *PPIA*, ficou evidente a impossibilidade de se identificar os melhores normalizadores através desta abordagem. Diante disto, foi decidido avaliar os 10 genes normalizadores no grupo total de amostras incluídas no estudo. Foram então repetidos todos os passos já descritos para as restantes 28 amostras tumorais e 5 amostras normais.

Esta análise global classificou os genes conforme suas estabilidades, a partir do mais estável, nesta ordem: *RPLO*, *TBP*, *PPIA*, *PGK*, *HPRT1*, *BGUS*, *HMBS*, *B2M*, *GAPDH* e *ACTB* (figura 5). Esta análise sugeriu a utilização de três genes normalizadores para a análise de expressão gênica nas amostras de carcinoma epidermóide de cavidade oral, uma vez que a variação dos pares $V_{2/3}$ apresentou um *cut-off* de 0,211, demonstrando que a inserção de um terceiro normalizador nas análises de expressão gênica traria significância, enquanto que a variação $V_{3/4}$ apresentou um valor de 0,145, indicando que a inserção do quarto não traria diferença significativa. Portanto, esta análise global evidenciou que os melhores normalizadores para o grupo total de amostras seriam *RPLO*, *TBP* e *PPIA* (Tabela 9).

Tabela 9 - Classificação gerada através da análise dos dados de expressão pelo programa GeNorm.

Experimento. 1	Experimento 2	Experimento 3
<i>PGK</i>	<i>RPLO</i>	<i>RPLO</i>
<i>PPIA</i>	<i>TBP</i>	<i>TBP</i>
<i>TBP</i>	<i>HPRT1</i>	<i>PPIA</i>
<i>HPRT1</i>	<i>PPIA</i>	<i>PGK</i>
<i>B2M</i>	<i>HMBS</i>	<i>HPRT1</i>
<i>RPLO</i>	<i>PGK</i>	<i>BGUS</i>
<i>BGUS</i>	<i>ACTB</i>	<i>HMBS</i>
<i>HMBS</i>	<i>BGUS</i>	<i>B2M</i>
<i>ACTB</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i>
<i>GAPDH</i>	<i>B2M</i>	<i>ACTB</i>

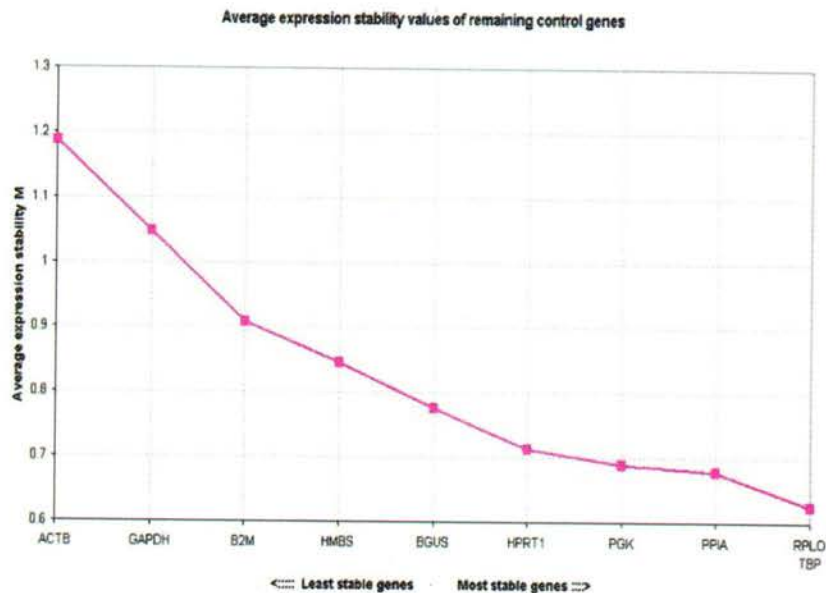
Os 10 genes foram avaliados nos 3 grupos de amostras e ordenados conforme suas estabilidades (do mais estável para o menos estável). Em negrito são apresentados os genes sugeridos pelo programa para compor o conjunto de genes normalizadores em análises de expressão gênica em amostras de carcinoma epidermóide de boca e de tecido bucal normal, utilizando-se RT-PCR em tempo real.

Os mesmos dados de expressão gênica dos 10 genes normalizadores obtidos com as análises de expressão gênica nos três diferentes grupos de amostras também foram analisados, utilizando-se o programa NormFinder. A análise do primeiro grupo de dados (experimento 1) classificou como gene mais estável o *TBP*, seguido pelo *PPIA*, *PGK*, *RPLO*, *HPRT1*, *B2M*, *HMBS*, *BGUS*, *GAPDH* e *ACTB*. Em seguida, foi analisado o segundo grupo de amostras, sendo classificado o *RPLO* como gene mais estável entre as amostras, seguido do *TBP*, *HMBS*, *PPIA*, *HPRT1*, *BGUS*, *ACTB*, *PGK*, *GAPDH* e *B2M*. A análise global indicou como genes mais estáveis o *TBP*, *RPLO*, *PPIA*, *PGK*, *HPRT1*, *BGUS*, *HMBS*, *B2M*, *GAPDH* e *ACTB* (Tabela 10).

Tabela 10 - Classificação gerada através da análise dos dados de expressão pelo programa NormFinder.

Experimento 1	Experimento 2	Experimento 3
<i>TBP</i>	<i>RPLO</i>	<i>TBP</i>
<i>PGK</i>	<i>TBP</i>	<i>RPLO</i>
<i>PPIA</i>	<i>HMBS</i>	<i>PPIA</i>
<i>RPLO</i>	<i>PPIA</i>	<i>PGK</i>
<i>HPRT1</i>	<i>HPRT1</i>	<i>HPRT1</i>
<i>B2M</i>	<i>BGUS</i>	<i>BGUS</i>
<i>HMBS</i>	<i>ACTB</i>	<i>HMBS</i>
<i>BGUS</i>	<i>PGK</i>	<i>B2M</i>
<i>ACTB</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i>
<i>GAPDH</i>	<i>B2M</i>	<i>ACTB</i>

Os 10 genes foram avaliados nos 3 grupos de amostras e ordenados conforme suas estabilidades (do mais estável para o menos estável).



Legenda: O primeiro gene representado (*ACTB*) é o gene menos estável na análise global das amostras; os genes que o seguem apresentam um aumento na média da estabilidade e na extremidade oposta é representado os dois genes mais estáveis (*RPLO* e *TBP*).

Figura 5 - Gráfico que representa a média de estabilidade da expressão dos genes normalizadores testados para todas as amostras do estudo.

Levando-se em consideração os 3 primeiros genes identificados por cada um dos programas em cada um dos grupos analisados (independente da ordem em que apareçam), nota-se que existe uma excelente correlação nos achados. No primeiro experimento, os genes mais estáveis classificados por ambos os programas foram o *PGK*, *PPIA* e *TBP*. No segundo experimento, o GeNorm classificou como mais estáveis os genes *RPLO*, *TBP* e *HPRT1*, enquanto que, segundo o Normfinder, os genes mais estáveis são *RPLO*, *TBP* e *HMBS*. Na análise global, a classificação feita pelos dois programas sugere uma interseção entre os grupos de genes selecionados nos experimentos anteriores, ou seja, os genes apontados como melhores normalizadores tanto pelo GeNorm quanto pelo NormFinder são *RPLO*, *PPIA* e *TBP* (Tabela 11).

Portanto, para a normalização das análises de quantificação relativa da expressão gênica realizadas a seguir, neste estudo, foi utilizada a média aritmética dos valores do Cts dos três genes normalizadores selecionados (*RPLO*, *TBP* e *PPIA*) para todo o grupo de amostras.

Tabela 11 – Classificação dos genes normalizadores quanta à estabilidade, sugerida pelos programas de GeNorm e NormFinder nos três experimentos.

Experimento 1		Experimento 1		Análise Global	
GeNorm	Normfinder	GeNorm	Normfinder	GeNorm	Normfinder
<i>PGK</i>	<i>TBP</i>	<i>RPLO</i>	<i>RPLO</i>	<i>RPLO</i>	<i>TBP</i>
<i>PPIA</i>	<i>PGK</i>	<i>TBP</i>	<i>TBP</i>	<i>TBP</i>	<i>RPLO</i>
<i>TBP</i>	<i>PPIA</i>	<i>HPRT1</i>	<i>HMBS</i>	<i>PPIA</i>	<i>PPIA</i>
<i>HPRT1</i>	<i>RPLO</i>	<i>PPIA</i>	<i>PPIA</i>	<i>PGK</i>	<i>PGK</i>
<i>B2M</i>	<i>HPRT1</i>	<i>HMBS</i>	<i>HPRT1</i>	<i>HPRT1</i>	<i>HPRT1</i>
<i>RPLO</i>	<i>B2M</i>	<i>PGK</i>	<i>BGUS</i>	<i>BGUS</i>	<i>BGUS</i>
<i>BGUS</i>	<i>HMBS</i>	<i>ACTB</i>	<i>ACTB</i>	<i>HMBS</i>	<i>HMBS</i>
<i>HMBS</i>	<i>BGUS</i>	<i>BGUS</i>	<i>PGK</i>	<i>B2M</i>	<i>B2M</i>
<i>ACTB</i>	<i>ACTB</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i>
<i>GAPDH</i>	<i>GAPDH</i>	<i>B2M</i>	<i>B2M</i>	<i>ACTB</i>	<i>ACTB</i>

A tabela demonstra que, no primeiro lote de amostras, os três genes selecionados como mais estáveis foram o *PGK*, *PPIA* e *TBP* para os dois programas, porém para o segundo lote de amostras estes genes não se repetiram na mesma ordem, sendo classificados como mais estáveis o *RPLO*, *TBP*, *HPRT1* e *PPIA*. Neste lote houve uma diferença quanto à classificação do *HPRT1* e o *HMBS* quando este lote foi comparado entre os dois programas. Quando foi realizado a análise global das amostras, os genes selecionados como mais estáveis foram o *RPLO*, *TBP* e *PPIA*, tanto para o GeNorm como para o Normfinder.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA EM RT-PCR EM TEMPO REAL

Inicialmente, foi realizada a padronização das temperaturas de *annealing* e concentração de cloreto de magnésio para todos os genes, utilizando-se cDNAs das linhagens celulares de carcinomas de cabeça e pescoço, O12, O13, O28, FaDu e a linhagem de epitélio de mucosa oral imortalizado, Hacat. Concentrações de $MgCl_2$ entre 1 e 4 mM foram testadas. As temperaturas de *annealing* e as concentrações de $MgCl_2$

padronizadas para todos os genes do estudo podem ser observadas nas Tabelas 4 e 5. Estas temperaturas foram determinadas a partir das análises da curva de dissociação das reações de amplificação dos genes. Para todas as reações dos genes do estudo, somente foram consideradas as reações em cujas curvas de desnaturação estavam representadas com um único pico, o que indicava uma reação altamente específica e determinava a temperatura de *annealing* ideal

Tabela 12 – Ciclagem da RT-PCR em tempo real e concentração de $MgCl_2$ padronizadas para os genes do estudo.

Gene	Ciclagem da PCR	[] $MgCl_2$
<i>AHSA1</i>	95°C 15s; 68°C 30s; 72°C 30s	2 mM
<i>ALDOA</i>	95°C 15s; 70°C 30s; 72°C 30s	2 mM
<i>ARTGAP1</i>	95°C 15s; 66°C 30s; 72°C 30s	2 mM
<i>HADAC1</i>	95°C 15s; 68°C 30s; 72°C 30s	2 mM
<i>KRT5</i>	95°C 15s; 70°C 30s; 72°C 30s	2 mM
<i>KRT6A</i>	95°C 15s; 60°C 30s; 72°C 30s	2 mM
<i>PABPC1</i>	95°C 15s; 70°C 30s; 72°C 30s	2mM
<i>POLQ</i>	95°C 15s; 66°C 30s; 72°C 30s	2 mM
<i>RPL19</i>	95°C 15s; 70°C 30s; 72°C 30s	2 mM
<i>RPL23</i>	95°C 15s; 62°C 30s; 72°C 30s	2 mM

Tabela 13 - Ciclagem da RT-PCR em tempo real e concentração de $MgCl_2$ padronizadas para os genes normalizadores.

Gene	Ciclagem da PCR	[] Mg
<i>ACTB</i>	95°C 15s; 58°C 30s; 72°C 30s	2 mM
<i>B2M</i>	95°C 15s; 60°C 60s	2 mM
<i>BGUS</i>	95°C 15s; 68°C 60s	2 mM
<i>GAPDH</i>	95°C 15s; 65°C 30s; 72°C 30s	2 mM
<i>HMBS</i>	95°C 15s; 60 °C 60s	2 mM
<i>HPRT1</i>	95°C 15s; 60°C 60s	2 mM
<i>PGK</i>	95°C 15s; 65°C 60s	2 mM
<i>PPIA</i>	95°C 15s; 65°C 60s	2 mM
<i>RPLP0</i>	95°C 15s; 65°C 60s	2 mM
<i>TBP</i>	95°C 15s; 63°C 60s	2 mM

Em seguida, foram determinados os valores de eficiência de amplificação dos três genes normalizadores selecionados e de cada um dos dez dos genes selecionados como diferencialmente expressos em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Esta análise revelou que para os normalizadores e para nove dos genes candidatos, os valores de eficiência de amplificação obtidos foram sempre próximos a 100% (Tabela 12). Com referência ao gene *ARHTGAP1*, mesmo após várias tentativas, o melhor valor de eficiência obtido foi de 76%, o qual foi considerado insatisfatório. Neste caso, deveriam ser desenhados novos *primers* para este gene, a fim de se obter uma melhor eficiência de amplificação, porém optou-se por concentrar-se os esforços nos outros 9 genes e deixar a análise deste gene para um segundo momento.

Tabela 14 - Valores de eficiência de amplificação obtidos para cada um dos genes incluídos no estudo.

Genes	Eficiência	Slope	Threshold
<i>ACTB</i>	100%	-3.317553	254.2924
<i>AHSA1</i>	98%	-3,364244	220.0992
<i>ALDOA</i>	100%	-3,311121	315.0667
<i>ARTGAP1</i>	76%	-2,130859	103.7528
<i>B₂M</i>	99%	-3.330204	213.1527
<i>BGUS</i>	99%	-3.340794	102.5987
<i>GAPDH</i>	100%	-3,307926	145.0641
<i>HDAC1</i>	98%	-3,367501	129.4196
<i>HMBS</i>	99%	-3.334265	144.5440
<i>HPRT1</i>	96%	-3.408421	230.2062
<i>KRT5</i>	99%	-3,372146	233.3458
<i>KRT6A</i>	100%	-3,319612	194.8469
<i>PABPC1</i>	96%	-3,226331	315.0667
<i>PGK</i>	95%	-3.428078	169.2046
<i>POLQ</i>	99%	-3,333,713	305.2669
<i>PPIA</i>	100%	-3.311372	115.1546
<i>RPL19</i>	100%	-3,308700	243.5940
<i>RPL23</i>	97%	-3,371135	265.4605
<i>RPLO</i>	100%	-3.314152	98.90259
<i>TBP</i>	100%	-3.312409	230.2062

Slope: valor utilizado no cálculo da eficiência gerado pela *curva standard* e *Threshold*: valor utilizado no gráfico de amplificação para obter o valor de eficiência, posteriormente utilizado em todas as análises.

A quantificação do nível de expressão dos nove genes selecionados como candidatos diferencialmente expressos em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, foi realizada em 37 amostras de carcinoma epidermóide de cavidade oral e em 25 amostras de tecido de cavidade oral normais. A partir dos resultados gerados pelas reações de RT-PCR em tempo real, foram calculadas as médias aritméticas dos valores de Cts destas amostras para ser utilizada na fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Foram consideradas amostras com aumento de expressão aquelas que apresentaram os valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ pelo menos duas vezes maior em relação ao valor de expressão da média de amostras normais. Foram considerados como tendo a expressão diferencial validada os genes candidatos que apresentaram um aumento de expressão em pelo menos 25% das amostras testadas (LOGING et al. 2000). Dos nove genes avaliados, quatro deles (*ALDOA*, *POLQ*, *AHSA1* e *RPL23*) apresentaram um aumento de expressão nas amostras tumorais testadas em relação ao tecido normal, segundo os critérios adotados (Tabela 15).

Tabela 15 – Porcentagem de amostras com hiperexpressão nos genes incluídos.

Símbolo do Gene	% (n) Aumento de expressão
<i>ALDOA</i>	81,08% (30/37)
<i>POLQ</i>	54,05% (20/37)
<i>AHSA1</i>	51,35% (19/37)
<i>RPL23</i>	27,02% (10/37)
<i>HDAC1</i>	20,00% (4/20)
<i>RPL19</i>	16,21% (6/37)
<i>PABPC1</i>	13,51% (5/37)
<i>KRT5</i>	8,10% (3/37)
<i>KRT6A</i>	2,70% (1/37)

Porcentagem de amostras com aumento de expressão de pelo menos duas vezes em relação à média dos Cts das amostras normais, para os genes analisados (número de amostras com aumento de expressão / número total de amostras testadas).

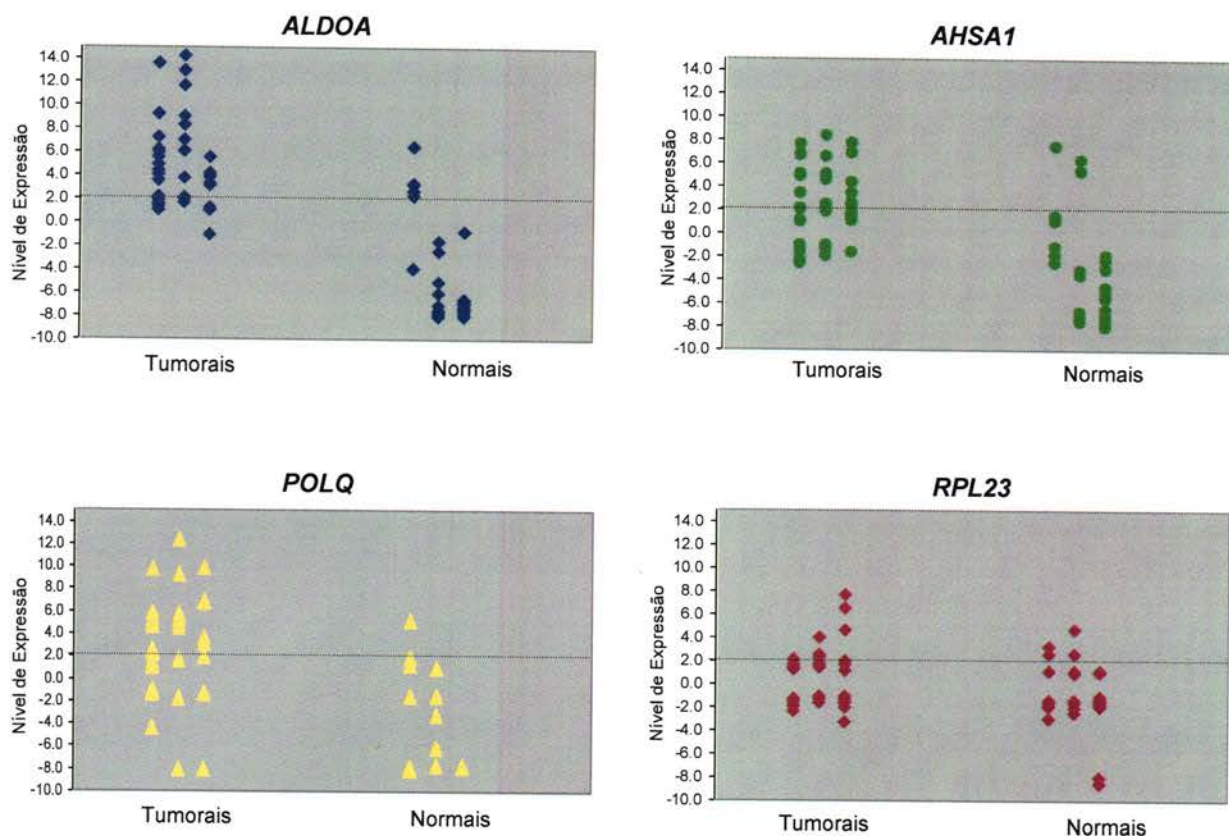
Os genes (*ALDOA*, *POLQ*, *AHSA1* e *RPL23*) que apresentaram um aumento de expressão nas amostras tumorais em relação às amostras normais, foram então analisados em mais 11 amostras tumorais, pois a quantidade de cDNA destas amostras não era suficiente para a dosagem de todos os 9 genes selecionados. A hiperexpressão do gene *ALDOA* foi confirmada em 77,08% das amostras (37 amostras das 48 analisadas). Tanto o gene *AHSA1* quanto o *POLQ* tiveram sua hiperexpressão confirmada em 43,75% das amostras (21 amostras das 48 analisadas), enquanto que, o *RPL23* apresentou hiperexpressão em apenas 20,83% das amostras analisadas (10 de 48 amostras) (Figura 6). Na primeira análise, com 37 amostras tumorais, o *RPL23* estava hiperexpresso em 27% dos casos, entretanto, com a análise de mais 11 amostras tumorais (total de 48 amostras), observou-se uma queda nesta proporção para 20%, sendo que este valor é inferior ao limiar pré-estabelecido (25%) para ser considerado como hiperexpresso. Portanto, segundo os resultados obtidos neste estudo, apenas os genes *ALDOA*, *POLQ* e *AHSA1* puderam ser classificados como hiperexpressos em carcinoma epidermóide de cavidade oral.

Nas análises estatísticas foram analisados parâmetros específicos na tentativa de realizar correlações clínicas. Para todos os parâmetros analisados não foi observado nenhum resultado estatisticamente significativo (Tabela 16).

Tabela 16 – Características dos pacientes incluídos no estudo.

Parâmetros	Casos (48)	
Sítio Tumoral		
Assoalho Bucal	12	25%
Língua Oral	29	60,50%
Área Retromolar	7	14,50%
Estadiamento Clínico		
I e II	16	33,30%
III e IV	32	66,70%
Sexo		
Masculino	37	77,10%
Feminino	10	20,80%
Ignorado	1	2,10%
Fumantes		
Sim	37	77,10%
Não	10	20,80%
Ignorado	1	2,10%
Etilistas		
Sim	32	66,70%
Não	15	31,20%
Ignorado	1	2,10%

Parâmetros analisados pela análise estatística afim de buscar correlações clínicas. Número de casos e porcentagem.

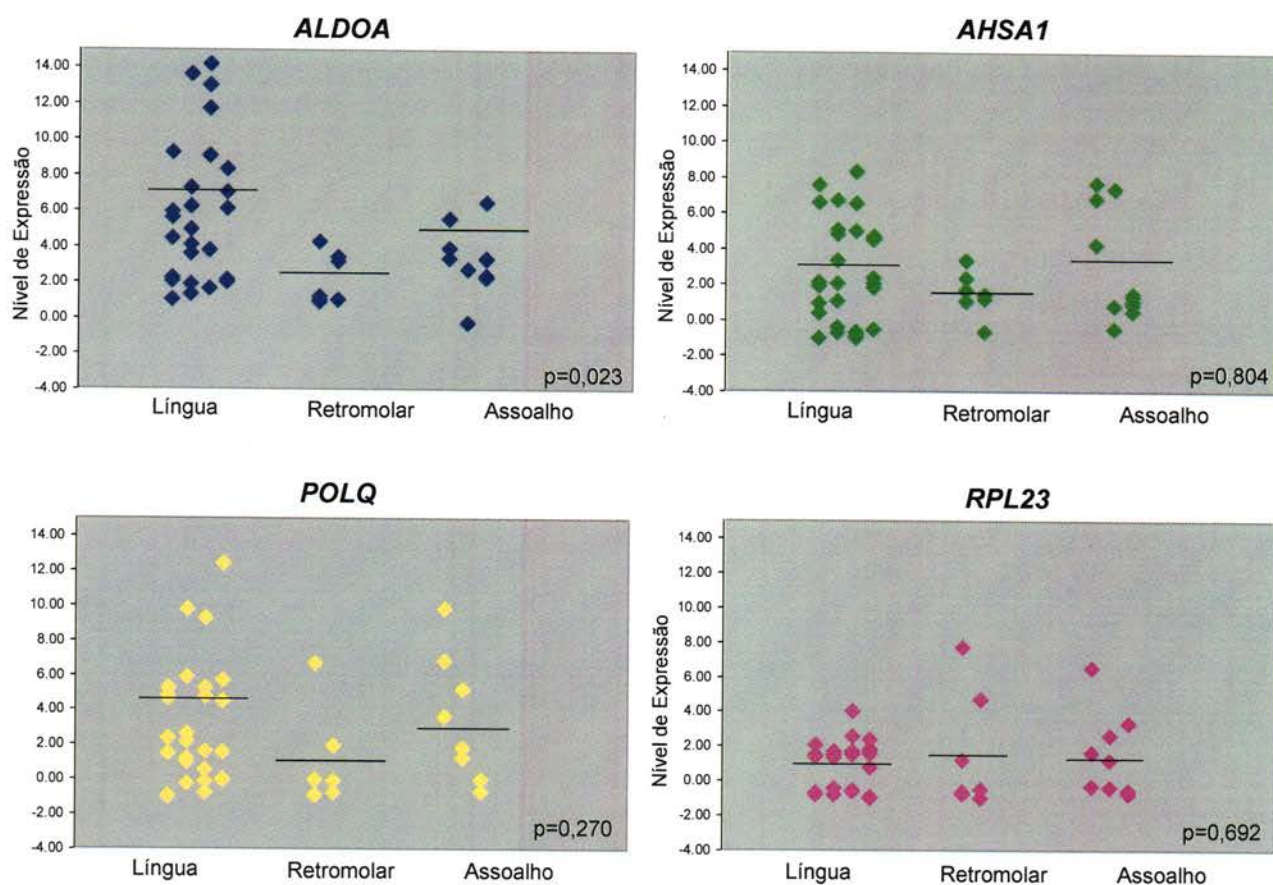


Legenda: Todas as amostras que apresentaram valores acima de dois foram consideradas hiperexpressas. Nos genes *ALDOA*, *AHSA1* e *POLQ* mais de 40% das amostras apresentaram níveis de expressão maiores que dois, porém o *RPL23* apresentou somente 20,83% das amostras acima do ponto de corte determinado.

Figura 6 - Gráfico de dispersão que compara o nível de expressão das amostras tumorais com o nível de expressão das amostras normais.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Antônio Rodrigues Alves Kuninani
 Coordenador Pós-Graduação

A análise do nível de expressão dos genes *ALDOA*, *POLQ*, *AHSA1* e *RPL23*, nos diferentes sítos anatômicos das amostras tumorais, mostrou que o gene *ALDOA* apresenta-se mais freqüentemente hiperexpresso em língua e em assoalho de boca do que na região retromolar ($p=0,023$). As demais correlações não se mostraram estatisticamente significantes (Figura 7).



Legenda: Os sítos anatômicos foram divididos em língua, região retromolar e assoalho bucal. Foram considerados como “cut-off” o nível de expressão 2 para as amostras tumorais. Houve diferença estatisticamente significativa para o gene *ALDOA* em relação à localização na cavidade oral; os demais genes não apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Figura 7 - Os gráficos de dispersão demonstram a análise de cada um dos genes com relação à localização.

Em seguida, foi realizada a análise das amostras quanto ao estadiamento clínico, porém não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa para nenhum dos quatro genes.

5 DISCUSSÃO

Os carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, incluindo os de cavidade oral, representam uma das maiores causas de morbidade e mortalidade por câncer. Apesar dos avanços no tratamento destas neoplasias nos últimos anos, não houve melhora significativa na sobrevida e na qualidade de vida destes pacientes. O maior problema terapêutico destes tumores é a alta taxa de recorrência locoregional nos dois primeiros anos de *follow-up*.

Muitos pesquisadores tentaram desenvolver modelos prognósticos que pudessem determinar com maior precisão a evolução clínica dos tumores e, portanto conseguir delinear um melhor planejamento terapêutico. Estes estudos correlacionam múltiplos parâmetros como estadiamento TNM, características histológicas dos tumores, entre outros tentando prever a evolução dos tumores, contudo nenhuns destes estudos apresentaram resultados que expliquem a diversidade de curso clínico de tumores morfológicamente iguais e com um mesmo estadiamento (BUNDGAARD et al. 1996; WOOLGAR et al. 1999; MYERS et al. 2001; SHEAHAN et al. 2003; GARZINO-DEMO et al. 2006; KANE et al. 2006).

Provavelmente esta diversidade de evolução clínica ocorra devido aos múltiplos passos que desencadeiam a carcinogênese oral, onde vários eventos genéticos levam ao rompimento das vias regulatórias normais que controlam as funções básicas celulares incluindo divisão, diferenciação e morte celular, seguida de uma evolução clonal. Alguns genes já têm seus

papeis estabelecidos na carcinogênese destas neoplasias, como a expressão aberrante do *EGFR*, *TGF- α* , *ras*, *c-myc*, *int-2*, *hst-1*, *PRAD-1* e *bcl-1*. Alguns genes envolvidos nas vias de sinalização celular, como o *H-ras*, *K-ras* e *N-ras*, permanecem intrinsecamente ativados durante a carcinogênese oral. Outros genes, como o TP53, p21, β 1-integrina, α 6 β 4 entre outros também estão envolvidos neste processo (WILLIAMS 2000).

De todos os genes estudados até o momento, o *EGFR* tem sido utilizado como importante alvo terapêutico no tratamento de tumores de cabeça e pescoço avançados que apresentam superexpressão deste receptor. Entretanto, somente uma parcela destes pacientes podem se beneficiar da terapia, pois, devido a presença de mutações nestes genes nem sempre há uma resposta clínica satisfatória. Deve ser comentado ainda que pacientes com uso crônico desta droga podem apresentar resistência a estes inibidores (CAPONIGRO et al. 2005; HARARI e HUANG 2005; PFISTER et al. 2006).

A terapia combinada com diversas drogas biológicas poderá englobar as vias de carcinogênese, aumentando assim a eficácia do tratamento e atendendo a uma maior quantidade de pacientes. Assim, o melhor entendimento da biologia destes tumores é de suma importância para o desenvolvimento de novas drogas biológicas que possam atender estes requisitos.

Estudos de análise de expressão gênica global têm sido desenvolvidos para melhor conhecimento dos genes envolvidos na carcinogênese das neoplasias. A análise das bibliotecas de ORESTES

contribuiu para a identificação de genes humanos e transcritos variantes de diversos tecidos neoplásicos e seus correspondentes normais, incluindo nestes os tumores de cabeça e pescoço. Esta técnica possibilitou a leitura de uma quantidade maior de transcritos, levando ao conhecimento de genes até então não correlacionados com a carcinogênese destes tumores.

DIAS NETO et al. (2000) demonstraram que as bibliotecas de ORESTES exibiam um desempenho similar ao das bibliotecas normalizadas, em termos de acessar genes com baixos níveis de expressão. Com isso, grande parte dos transcritos identificados por esta técnica não representavam produtos derivados de genes altamente expressos. Este fato se refletiu em uma maior abundância relativa de produtos derivados dos transcritos menos variantes nas células.

CAMARGO et al. (2001) demonstram que a quantidade de seqüências de transcritos altamente e moderadamente expressos era similar a dos transcritos raros ou pouco expressos concluindo portanto, que a técnica de ORESTES apresenta uma capacidade inerente de amostrar, com a mesma freqüência, transcritos raros e abundantes, ou seja, esta técnica apresenta uma característica normalizadora.

Apesar desta característica da técnica de ORESTES, existem na literatura estudos que utilizam esta metodologia como ponto de partida para identificação de genes diferencialmente expressos. LEERKES e colaboradores (2002) realizam uma comparação *in silico* dos transcritos derivados de tecidos normais e tumorais de mama. Este estudo analisou as seqüências provenientes das bibliotecas de ORESTES dos tecidos de

interesse, focando a atenção para os genes que se apresentavam exclusivamente nos tumores, para identificar candidatos que se apresentavam hiperexpressos nas neoplasias de mama. Os candidatos selecionados tiveram seu nível de expressão confirmado através dos dados de SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), onde os testes Exato de Fischer ou Qui-quadrado foram utilizados para testar a significância da diferença de frequência de aparecimento das *tags* entre as bibliotecas dos tecidos. Através de RT-PCR semi-quantitativa, eles demonstraram que dentre 11 candidatos selecionados, nove estavam hiperexpressos nos tumores de mama avaliados.

Em um outro estudo, REIS e colaboradores (2005) analisaram as seqüências de carcinomas de cabeça e pescoço e tireóide geradas pela técnica de ORESTES buscando revelar novos candidatos a marcadores moleculares. Eles analisaram as 134.495 seqüências de ORESTES proveniente de cabeça e pescoço e as 79.141 seqüências de ORESTES proveniente de tireóide visando a identificação de novos transcritos, de novas isoformas de *splicing* e de possíveis marcadores moleculares para estas neoplasias. Eles selecionaram genes localizados em regiões já descritas como regiões de ganho cromossômico ou de perda de heterozigosidade em carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e validaram o nível de expressão destes genes candidatos através de RT-PCR em tempo real, em tumores e em tecido normal de cabeça e pescoço. Dos três genes selecionados para validação, dois apresentaram aumento de expressão nas amostras tumorais de cavidade oral e laringe e um deles

apresentou diminuição de expressão nas amostras tumorais de laringe, demonstrando a viabilidade da estratégia adotada.

Estes dois grupos puderam demonstrar que a análise detalhada dos dados das bibliotecas de ORESTES pode ser útil na identificação de genes diferencialmente expressos. Sendo assim, e com o propósito de contribuir para a identificação de possíveis alterações na expressão de genes envolvidos no processo de carcinogênese das lesões de cavidade oral, o presente estudo buscou avaliar a expressão diferencial entre tecidos de cabeça e pescoço neoplásico e não neoplásico de genes selecionados a partir de análises dos dados públicos de ORESTES.

Para isso realizamos uma análise *in silico* das seqüências ORESTES depositadas no banco de dados públicos e estas foram comparadas com as seqüências de genes humanos. As seqüências foram organizadas em sete grupos de comparação para identificar genes com expressão alterada entre os tumores de cabeça e pescoço e os seus correspondentes normais. Assim, foram identificados 109 genes diferencialmente expressos nestes carcinomas, sendo que 40 apresentavam hiperexpressão na comparação entre tecido normal e tecido tumoral. Através de uma inspeção visual das ferramentas disponíveis *on line* foram observados critérios para a seleção dos genes hiperexpressos. Foram selecionados dez candidatos para validação quanto à expressão gênica por meio da técnica de RT-PCR em tempo real em amostras de carcinoma epidermóide de cavidade oral, destes genes foi possível identificar 3 (*ALDOA*, *AHSA1* e *POLQ*) que apresentaram aumento de expressão nas amostras tumorais.

A técnica de RT-PCR em tempo real tem se tornado a técnica mais utilizada para as análises de expressão gênica. Apesar de todas as vantagens desta técnica, a normalização dos dados continua sendo o maior fator de crítica destes estudos.

A normalização das reações é de suma importância para o controle de erros experimentais. A estratégia mais utilizada para este fim é o uso de um gene normalizador como referência interna das reações. Muitos autores têm concordado com o fato de que os genes convencionalmente utilizados como normalizadores destas reações, como *β -actina*, *GAPDH* e *HPRT*, variam consideravelmente devido ao crescimento neoplásico, hipóxia ou outras condições teciduais (ZHONG e SIMONS 1999; WU e REES 2000; GOIDIN et al. 2001). A utilização de um gene normalizador que apresente variação de expressão entre as amostras estudadas pode levar a erros quanto ao perfil de expressão gênica do gene de interesse. Conseqüentemente, o uso destes genes como referência neste tipo de análise não é conveniente, uma vez que estas variações podem influenciar a interpretação correta dos resultados (DHEDA et al. 2005).

Com o intuito de identificar genes normalizadores mais estáveis em um determinado grupo de tecidos, VANDESOMPELE et al. (2002) desenvolveram um programa denominado GeNorm. Eles avaliaram 10 genes de diferentes classes funcionais e diferentes expressões em vários tecidos humanos, e demonstraram que o uso convencional de um único gene normalizador leva a erros em 25% dos casos. Eles concluíram, ainda que a estratégia de seleção de normalizadores mais estáveis através de

uma amostragem pode ser aplicada por quaisquer números ou tipos de genes e que este conjunto gera resultados precisos.

Em 2004, ANDERSEN et al. desenvolveram um programa também com este mesmo propósito. Esta nova estratégia de avaliação foi denominada de “modelo baseado na aproximação da estimativa da variação da expressão” ou Normfinder. Eles afirmam que esta metodologia classifica e seleciona os dois melhores genes candidatos estimando a mínima variação inter e intra grupos, e deixam claro que as análises realizadas são diferentes das do GeNorm uma vez que este tende a selecionar aqueles genes com maior nível de similaridade de expressão entre o grupo de amostras, selecionando portanto os dois genes com a menor variação intra grupo e não detalha esta seleção quando é levado em conta a variação inter grupo.

Nos últimos anos vários trabalhos tem sido publicados tentando analisar a melhor forma de selecionar um gene normalizador mais estável entre um determinado tecido (RUBIE et al. 2005; OHL et al. 2005, 2006; SAVIOZZI et al. 2006; NAILIS et al. 2006). Porém, até o presente não há relato de estudos que selecionaram genes normalizadores mais estáveis para estudos de expressão gênica em carcinomas de cavidade oral. Por isso selecionamos 10 genes (*ACTB*, *B2M*, *BGUS*, *GAPDH*, *HMBS*, *HPRT1*, *PGK*, *PPIA*, *RPL0* e *TBP*) descritos com genes constitutivos, para terem seus níveis de expressão determinados em carcinomas de cavidade oral e mucosa normal de boca, os quais foram avaliados quanto à estabilidade pelos programas GeNorm e NormFinder.

Para esta análise foram realizados inicialmente dois experimento com amostras tumorais e amostras normais distintas. Para o primeiro experimento foram classificados como genes mais estáveis, pelo GeNorm, o *PGK*, *PPIA*, *TBP*, *HPRT1*, *B2M*, *RPLO*, *BGUS*, *HMBS*, *ACTB* e o *GAPDH*. O segundo experimento foi realizado com o objetivo de validar este resultado, porém os resultados não se repetiram e uma outra classificação quanto à estabilidade entre as amostras foi sugerida por este programa. Nesta análise, foram classificados, como genes mais estáveis o *RPLO*, *TBP*, seguidos por *HPRT1*, *PPIA*, *HMBS*, *PGK*, *ACTB*, *BGUS*, *GAPDH* e *B2M*.

No nosso estudo observou-se que os resultados obtidos na análise do primeiro grupo de amostras se mostraram discordantes daqueles obtidos com um segundo grupo independente de amostras. Uma possível razão para esta discordância, é a heterogenicidade dos tumores de cavidade oral que compunham cada grupo. Embora todas as amostras avaliadas fossem oriundas da porção inferior de cavidade oral, no grupo 1 tínhamos 35% das amostras oriundas da região retromolar, 35% da língua, 20% da gengiva inferior e 10% de assoalho de boca, enquanto que, no grupo 2 tínhamos 58% das amostras oriundas da região retromolar, 16% da língua, 5% da gengiva e 21% de assoalho de boca, ou seja a apesar da composição destes dois grupos serem bastante semelhantes proporcionalmente elas apresentavam diferenças quanto a quantidade de amostras em cada localização.

A mucosa oral apresenta modificações estruturais tanto na porção epitelial quanto no tecido conjuntivo em diferentes regiões da cavidade oral,

fornecendo três tipos histológicos. Estes tipos de tecidos correspondem a sua função, assim temos: tecido mastigatório representado pela mucosa da gengiva e do palato duro; tecido de revestimento representado pela mucosa dos lábios, bochechas, vestíbulo, mucosa alveolar, palato mole, assoalho de boca e face inferior da língua; e o tecido especializado representado pela mucosa do dorso da língua. Há características comuns nestes vários tecidos e nos produtos celulares desta mucosa, contudo estas características associadas com diferentes tipos de mucosa oral proporcionam uma ampla diferenciação e variação histológica (WINNING e TOWNSEND 2000).

Portanto, o que podemos especular sobre a causa da diferença de estabilidade entre os dois grupos estudados é que esta variabilidade entre as amostras ocorre provavelmente pela grande heterogenicidade biológica e estrutural desta mucosa. ANDERSEN et al. (2004) sugerem que quanto maior a quantidade de amostras analisadas, principalmente em um grupo heterogêneo, melhor é a acurácia da análise de estabilidade. A escolha dos melhores candidatos dentro de um grupo de genes selecionados é realizada pela diferença de expressão entre os grupos, com isso em um grupo com maior número de casos esta diferença se torna mais evidente.

Levando em consideração a afirmativa de ANDERSEN et al. (2004) que o Normfinder proporciona uma medida mais precisa e robusta da estabilidade da expressão gênica do que o GeNorm. Decidimos, portanto repetir as análises dos dois primeiros experimentos através do Normfinder e posteriormente, realizar uma análise pelos dois programas incluindo todas as amostras do estudo.

A análise do primeiro experimento pelo Normfinder apresentou a classificação bastante semelhante à classificação proposta pelo GeNorm, porém nos três primeiros genes selecionados houve uma modificação na sua ordem, sendo selecionados pelo GeNorm o *PGK*, *PPIA* e *TBP* enquanto que para o segundo programa foram selecionados o *TBP*, *PGK* e *PPIA*.

Na análise do segundo experimento pelos dois programas, porém houve uma inversão dos genes selecionados como os terceiros mais estáveis, o GeNorm indicou o *HPRT1* enquanto que o Normfinder indicou o *HMBS*. Os demais genes selecionados apresentaram a mesma posição na classificação.

Na análise global o evento ocorrido no primeiro grupo se repetiu, portanto a classificação dos genes segundo o GeNorm foi *RPLO*, *TBP* e *PPIA*, enquanto que para o Normfinder foi o *TBP*, *RPLO* e *PPIA*.

Considerando o fato de que os dois programas utilizam modelos matemáticos e estatísticos distintos e que estes encontraram resultados muito similares para os três experimentos realizados, podemos inferir que os resultados experimentais são sólidos e portanto as diferenças observadas entre os experimentos devem ser decorrentes da heterogenicidade das amostras avaliadas. Além disto, estes dados sugerem que a escolha de qualquer um dos dois programas para a seleção dos genes normalizadores levaria a resultados bastante semelhantes e certamente não modificaria os achados finais de expressão gênica.

Em vista disso, podemos considerar que para os estudos de expressão gênica em carcinomas epidermóides de cavidade oral o conjunto

destes três genes devem ser confiavelmente utilizados como normalizadores.

Dos nove genes selecionados, o *ALDOA*, o *AHSA1* e o *POLQ* apresentaram aumento de expressão em mais de 40% das amostras analisadas, ou seja, 33% dos candidatos selecionados foram validados. Esses resultados atestam que para o objetivo de se identificar genes diferencialmente expressos, é correta a abordagem proposta, ou seja, a busca nos dados públicos de ORESTES, validação pelos dados públicos de ESTs e a seleção de candidatos. Vale a pena ressaltar que as bibliotecas utilizadas para seleção dos genes diferencialmente expressos foram geradas a partir de amostras de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e a validação dos candidatos selecionados foi realizada apenas em amostras de cavidade oral, pois o objetivo deste estudo era identificar genes hiperexpressos nos carcinomas epidermóides desta região. Entretanto, pode-se supor que, caso tivessem sido utilizadas na validação não só amostras da cavidade oral, mas também amostras de cabeça e pescoço uma maior proporção de candidatos poderiam ter sido validados.

O gene *ALDOA* quando normalizado pelos genes selecionados, apresentou aumento de expressão em 77% das amostras tumorais testadas, quando comparado ao tecido normal. O aumento de expressão deste gene já foi descrito em algumas neoplasias e sua deficiência esta relacionada com a miopatia e a anemia hemolítica.

Estudos realizados por CASTALDO et al. (2000) compararam o nível de expressão do *ALDOA* através de RT-PCR não competitiva, em biópsias

de fígado de pacientes com carcinoma hepatocelular e com sorologia positiva para hepatite C, de pacientes que apresentavam doenças não neoplásicas de fígado e de pacientes saudáveis. A concentração do RNAm da *aldolase A* foi aproximadamente 10 vezes maior em pacientes com carcinoma hepatocelular do que nos outros grupos.

Em 2003, CASTALDO et al. realizaram um estudo com objetivo de identificar um marcador molecular que pudesse identificar micrometástases sanguíneas em pacientes portadores de câncer de pulmão. Seus resultados mostraram que a *aldolase A* se encontrava expressa no sangue circulante de pacientes saudáveis. Portanto eles concluíram que a presença deste gene no sangue circulante de pacientes sadios limitaria o seu uso na identificação dos casos de micrometástases sanguíneas, não sendo, portanto um sinalizador específico para este tipo de neoplasia.

Em estudos de expressão protéica com câncer coloretal foram identificados proteínas, entre elas a *aldolase A* (ALDOA), que se apresentavam diferencialmente expressas. Nas análises de *Western blot* e por imunohistoquímica foi observado um aumento significativo da expressão desta proteína nos tecidos tumorais quando comparado com a mucosa normal adjacente. Os autores sugerem que o aumento de expressão desta proteína pode indicar um novo possível marcador molecular para os carcinomas coloretais (TOMONAGA et al. 2004).

Estudos realizados por ZOU et al. (2005) identificaram através de análises de espectrometria de massa seis proteínas, entre elas o ALDOA, que induziam a resposta humoral em pacientes com leucemia mieloide

crônica, sendo que este evento não ocorria em pacientes saudáveis. Apesar desta associação, estes pesquisadores afirmam que estudos futuros devem ser realizados para se determinar a real associação desta proteína com este tipo de neoplasia, porém a detecção dos anticorpos contra aos antígenos associados à leucemia podem ser úteis no “*screening*”, diagnóstico e segmento dos pacientes portadores de leucemia mieloide crônica ou ainda na imunoterapia baseada em antígenos.

A identificação do aumento de expressão deste gene em carcinomas epidermóides de cavidade oral pode ser útil na identificação de um novo marcador de diagnóstico, prognóstico ou ainda importante alvo terapêutico, uma vez que já foram detectadas associações importantes deste gene com determinadas neoplasias.

Outro gene identificado como hiperexpressos nos carcinomas epidermóides de cavidade oral foi o *AHSA1*. Este gene apresentou 43% das amostras com aumento de expressão quando comparadas com os tecidos normais. Este gene é também conhecido como *p38* e faz parte de uma das 3 sub-famílias das *MAPKs* (proteínas quinases ativadoras da ativação da mitose). Estas proteínas são responsáveis por manter a homeostase das células em condições normais, quando esta condição é quebrada por instabilidades genéticas, como ocorre nas células cancerosas, este balanço entre a proliferação e a morte celular é alterado (MISHIMA et al. 2002).

A *MAPKs p38* é altamente ativada por citocinas pró-inflamatórias como a Interleucina I (*IL-1*) e o fator de necrose tumoral α (*TNF- α*). Muitas propostas terapêuticas pró-inflamatórias baseadas na estimulação da

expressão gênica da ciclooxygenase-2 (COX-2), também estimulam a MAPKs p38, portanto drogas anti-inflamatórias não esterodais (NSAIDs) que freqüentemente têm sido descritas como inibidoras do crescimento tumoral, podem também inibir estas proteínas quinases (MISHIMA et al. 2002).

Estudos realizados por LEE et al. (2006) demonstraram que as linhagens celulares de queratinócitos orais humanos imortalizados (IHOK) e de um carcinoma de assoalho bucal (HN4) tratadas com DFO (Deferoxamine), um quelante de ferro, eram capaz de suprimir a diferenciação dos queratinócitos provavelmente devido à indução da fosforilação da via do p38, através da transmissão do sinal para ativação da cascata de enzimas apoptóticas e conseqüentemente, a ativação de caspases.

A ativação do *AHSA1* ou p38, em diferentes células, pode ser responsável tanto por efeitos pró como os anti apoptóticos, e estes vão ser determinados pelo tipo de estímulo e/ou o estado de proliferação ou diferenciação celular. Esta proteína é ativada durante a apoptose induzida por Cisplatina em carcinomas de pulmão, de ovário e de esôfago, podendo, portanto, exercer um importante papel na sinalização das células cancerosas para a apoptose durante a terapia com esta droga.

Estudos realizados por ZHANG et al. (2005) levantam a possibilidade do p38 ser o componente central que desencadeia múltiplas vias que levam a morte celular programada. Eles afirmam ainda, que se esta possibilidade se confirmar, futuramente será possível formular combinações de novas

droga que promovam a ativação sinérgica do *p38* produzindo uma melhor eficácia terapêutica e menores efeitos adversos.

A identificação de pacientes portadores de carcinomas epidermóides de cavidade oral com aumento de expressão do *p38* (*AHSA1*) pode ser útil como método de seleção para aqueles que apresentem maior eficácia na utilização de drogas capazes de bloquear a ação de fatores de crescimento e citocinas. Além disso, a identificação do perfil de expressão deste gene para pacientes portadores desta neoplasia poderá identificar aqueles que poderiam vir a se beneficiar dos agentes quimioterápicos para o tratamento da doença.

O *POLQ* codifica uma proteína que promove o reparo de trocas de nucleotídeos, estando localizada em sítios de replicação durante a fase "S" do ciclo celular e se acumulam nos sítios iniciais das forquilhas de replicação. Este gene foi identificado com aumento de expressão em 43% das amostras estudadas quando comparado com o tecido normal.

Poucos estudos têm sido realizados com o intuito de identificar o padrão de expressão gênica deste gene em tecidos tumorais. Em 2004 foi publicado um artigo que investiga o envolvimento do *POLQ* na carcinogênese através de análises de expressão por RT-PCR, *Northern* ou *Western blot* em diversos tecidos. Eles mostraram que a expressão deste gene e/ou proteína esta aumentada nos tecidos tumorais proveniente de pacientes portadores de câncer de pulmão, de estômago e de colón quando comparado com os respectivos tecidos normais. Neste estudo foi ainda determinado que pacientes que apresentavam altos níveis de expressão

desta proteína tinham um pior curso clínico da doença (KAWAMURA et al. 2004).

Porém, alguns estudos referem que o *POLQ* exerce um papel na modulação da sensibilidade celular aos agentes quimioterápicos (drogas baseadas em compostos platínicos). No estudo realizado por ALBERTELLA et al. (2005), foi demonstrado que a *POLQ* representa um importante papel na resposta celular a cisplatina, podendo haver implicações na resistência intrínseca ou adquirida a estes agentes quimioterápicos. Neste estudo a ausência da expressão de *POLQ* levou a diminuição da eficiência da cisplatina de bloquear a fase "S" do ciclo celular das células neoplásicas, sugerindo, portanto que esta proteína está envolvida na síntese de compostos que promovem este bloqueio na replicação. Os autores sugerem que estes achados podem promover um profundo impacto na resposta a estes agentes quimioterápicos, uma vez que poderá influenciar na estratificação de pacientes ou sugestão de novos avanços terapêuticos para melhorar o tratamento do câncer por estes compostos platínicos.

Para conseguir uma resposta terapêutica mais consistente, a combinação da cisplatina com gemcitabina é normalmente adotada com eficiência, pois durante o tratamento o uso de uma única droga pode levar a tolerância da indução ao dano no DNA e a capacidade de reparo. O estudo publicado por CHEN et al. (2006) mostrou que há uma forte ligação entre a expressão do *POLQ* e a sensibilidade celular a gemcitabina, a cisplatina e principalmente a combinação destas drogas. Os resultados encontrados mostraram que este gene exerce um importante papel na determinação da

sensibilidade celular aos agentes terapêuticos. Eles sugerem que o *POLQ* poderá não só ser utilizado como alvo farmacológico para o desenvolvimento de novos agentes anti-neoplásicos como também poderá fornecer novas direções para melhorar os regimes quimioterápicos, porém estudos complementares devem ser realizados para melhor entendimento dos mecanismos de ação desta proteína e destes compostos terapêuticos e assim auxiliar no desenvolvimento de drogas mais eficazes.

Assim, futuramente a confirmação da hiperexpressão do *POLQ* nas amostras de carcinomas epidermóides de cavidade oral poderá exercer um importante papel na identificação de pacientes que possam ter uma melhor resposta terapêutica a agentes quimioterápicos e assim, estes pacientes poderão se beneficiar destas drogas no seu planejamento terapêutico.

Vale a pena ressaltar que a maioria dos marcadores molecular, em utilização até o momento, beneficia apenas uma porcentagem dos pacientes que apresentam um perfil de expressão gênica específico. Por este motivo é imperativo a busca por novos marcadores que possam se tornar novos alvos terapêuticos ou ainda ser utilizados em conjunto com os já existentes com o intuito de melhorar a eficácia destes agentes no combate da doença.

6 CONCLUSÃO

- x A abordagem utilizada neste estudo para a identificação de genes diferencialmente expressos através da análise dos dados públicos de ORESTES oriundos de tecidos normais e tumorais de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço foi adequada, pois, foram identificados genes hiperexpressos em carcinoma epidermóide de cavidade oral.
- x Através da análise de um painel de 10 genes constitutivos foi possível selecionar, através dos programas GeNorm e Normfinder, três genes (RPLO, TBP e *PPIA*) para serem utilizados como normalizadores em estudos de expressão gênica através de RT-PCR em tempo real, em amostras de cavidade oral.
- x O nível de expressão dos 9 genes (ALDOA, AHSA1, HDAC1, KRT5, KRT6A, PABPC1, POLQ, RPL19 e RPL23) selecionados pela análise dos dados de ORESTES foi avaliado em amostras de carcinomas epidermóides de cavidade oral e foram encontrados três destes genes (ALDOA, POLQ, AHSA1) com aumento da expressão em mais de 40% das amostras tumorais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. **Science** 1991; 252:1651-6.

Albertella MR, Green CM, Lehmann AR, O'Connor MJ. A role for polymerase eta in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage. **Cancer Res** 2005; 65:9799-806.

Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer Res** 2004; 64:5245-50.

Bergamo NA, Rogatto SR, Poli-Frederico RC, et al. Comparative genomic hybridization analysis detects frequent over-representation of DNA sequences at 3q, 7p and 8q in head and neck carcinomas. **Cancer Genet Cytogenet** 2000; 119:48-55.

Biazevic MG, Castellanos RA, Antunes JL, Michel-Crosato E. Trends in oral cancer mortality in the city of Sao Paulo, Brazil, 1980-2002. **Cad Saude Publica** 2006; 22:2105-14.

Bieche I, Parfait B, Laurendeau I, Girault I, Vidaud M, Lidereau R. Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. **Oncogene** 2001; 20:8109-15.

Boing AF, Peres MA, Antunes JL. Mortality from oral and pharyngeal cancer in Brazil: trends and regional patterns, 1979-2002. **Rev Panam Salud Publica** 2006; 20:1-8.

Bonner JA, Harari PM, Giralt J, et al. Radiotherapy plus cetuximab for squamous-cell carcinoma of the head and neck. **N Engl J Med** 2006; 354:567-78.

Bosetti C, Gallus S, Garavello W, La Vecchia C. Smoking cessation and the risk of oesophageal cancer. **Oral Oncol** 2006; 42:957-64.

Brentani H, Caballero OL, Camargo AA, et al. The generation and utilization of a cancer-oriented representation of the human transcriptome by using expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:13418-23.

Brouha X, Tromp D, Hordijk GJ, Winnubst J, De Leeuw R. Role of alcohol and smoking in diagnostic delay of head and neck cancer patients. **Acta Otolaryngol** 2005; 125:552-6.

Bsoul SA, Huber MA, Terezhalmay GT. Squamous cell carcinoma of the oral tissues: a comprehensive review for oral healthcare providers. **J Contemp Dent Pract** 2005; 6:1-16.

Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J, Sorensen FB, Sogaard H, Nielsen JE. Histopathologic, stereologic, epidemiologic, and clinical parameters in the prognostic evaluation of squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Head Neck** 1996; 18:142-52.

Camargo AA, Samaia HPB, Dias Neto E et al. The contribution of 700,000 ORF sequence tags to the definitions of the human transcriptome. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:12103-8.

Caponigro F, Formato R, Caraglia M, Normanno N, Iaffaioli RV. Monoclonal antibodies targeting epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor with a focus on head and neck tumors. **Curr Opin Oncol** 2005; 17:212-7.

Carvalho AL, Salvajoli JV, Kowalski LP. A Comparison of radiotherapy or radiochemotherapy with symptomatic treatment alone in patients with advanced head and neck carcinomas. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2000; 257:164-7.

Carvalho AL, Magrin J, Kowalski LP; Sites of recurrence in oral and oropharyngeal cancers according to the treatment approach. **Oral Dis** 2003; 9:112-8.

Carvalho AL, Bhuvanesh S, Spiro RH, Kowalski LP, Shah JP. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. **Head Neck** 2004; 26:31-8.

Castaldo G, Calcagno G, Sibillo R, et al. Quantitative analysis of aldolase A mRNA in liver discriminates between hepatocellular carcinoma and cirrhosis. **Clin Chem** 2000; 46:901-6.

Castaldo G, Tomaiuolo R, Sanduzzi A, Ponticiello A, Marchetiello I, Salvatore F. Carcinoembryonic antigen mRNA analysis detects micrometastatic cells in blood from lung cancer patients. **Eur Respir J** 2003; 22:418-21.

Chen YW, Cleaver JE, Hanaoka F, Chang CF, Chou KM. A novel role of DNA polymerase eta in modulating cellular sensitivity to chemotherapeutic agents. **Mol Cancer Res** 2006; 4:257-65.

Chin D, Boyle GM, Williams RM, et al. Novel markers for poor prognostic in head and neck cancer. **Int J Cancer** 2005; 113:789-97.

Das BR, Nagpal JK. Understanding the biology of oral cancer. **Med Sci Monit** 2002; 8:258-67.

de Souza SJ, Camargo AA, Briones MR, et al. Identification of human chromosome 22 transcribed sequences with ORF expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97:12690-3.

Dheda K, Huggett JF, Chang JS, et al. The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. **Anal Biochem** 2005; 344:141-3.

Dias Neto E, Harrop R, Correa-Oliveira R, Wilson RA, Pena SD, Simpson AJ. Minilibraries constructed from cDNA generated by arbitrarily Primed RT-PCR: an alternative to normalized libraries for the generation of ESTs from nanogram quantities of mRNA. **Gene** 1997; 186:135-42.

Dias Neto E, Correa RG, Almeida SV, et al. Shotgun sequencing of the human transcriptome with ORF expressed sequence tags. **Proc Natl Acad Sci USA** 2000; 97:3491-6.

Dressman D, Yan H, Traverso G, Kinzler KW, Vogelstein B. Transforming single DNA molecules into fluorescent magnetic particles for detection and enumeration of genetic variations. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:8817-22.

Elmore JG, Horwitz RI. Oral cancer and mouthwash use: evaluation of the epidemiologic evidence. **Otolaryngol Head Neck Surg** 1995; 113:253-61.

Erovcic BM, Pammer J, Hollemann D, et al. Motility-related protein-1/CD9 expression in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck** 2003; 25:848-57.

Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, et al. Risk factors for oral cancer in brazil: a case-control study. **Int J.Cancer** 1989; 43:992-1000.

Freeman HP. Cancer in the socioeconomically disadvantaged. **CA Cancer J. Clin** 1989; 39:266-88.

Gagari E, Kabani S. Adverse effects of mouthwash use: a review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 1995; 80:432-9.

Garavello W, Ciardo A, Spreafico R, Gaini RM. Risk factors for distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2006; 132:762-6.

Garzino-Demo P, Dell'Acqua A, Dalmaso P, et al. Clinicopathological parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma. **J Craniomaxillofac Surg** 2006; 34:344-50.

Gerard CJ, Andrejka LM, Macina RA. Mitochondrial ATP synthase 6 as an endogenous control in the quantitative RT-PCR analysis of clinical cancer samples. **Mol Diagn** 2000; 5:39-46.

Girault I, Lerebours F, Amarir S, et al. Expression analysis of estrogen receptor alpha coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen. **Clin Cancer Res** 2003; 9:1259-66.

Goidin D, Mamessier A, Staquet MJ, Schmitt D, Berthier-Vergnes O. Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. **Anal Biochem** 2001; 295:17-21.

Gonzalez HE, Gujrati M, Frederick M, et al. Identification of 9 genes differentially expressed in head and neck squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2003; 129:754-9.

Greenlee RT, Hill-Harmon MB, Murray T, Thun M. Cancer statistics, 2001. **CA Cancer J Clin** 2001; 51:15-36. Erratum in: **CA Cancer J Clin** 2001; 51:144.

Harari PM, Huang S. Radiation combined with EGFR signal inhibitors: head and neck cancer focus. **Semin Radiat Oncol** 2006; 16:38-44.

Hashibe M, Jacob BJ, Thomas G, et al. Socioeconomic status, lifestyle factors and oral premalignant lesions. **Oral Oncol** 2003; 39:664-71.

Huang Q, Yu GP, McCormick SA, et al. Genetic differences detected by comparative genomic hybridization in head and neck squamous cell carcinomas from different tumor sites: construction of oncogenetic trees for tumor progression. **Genes, Chromosomes, Cancer** 2002; 34:224-33.

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

Johnson NW. Global epidemiology. In: Shah JP, Johnson NW, Batsakis JG, editors. **Oral cancer**. London: Martin Dunitz; 2003. p.3-32.

Kane SV, Gupta M, Kakade AC, D'Cruz A. Depth of invasion is the most significant histological predictor of subclinical cervical lymph node metastasis in early squamous carcinomas of the oral cavity. **Eur J Surg Oncol** 2006; 32:795-803.

Kawamura K, Bahar R, Seimiya M, et al. DNA polymerase theta is preferentially expressed in lymphoid tissues and upregulated in human cancers. **Int J Cancer** 2004; 109:9-16.

Kim MM, Califano JA. Molecular pathology of head and neck cancer. **Int J Cancer** 2004; 112:545-53.

Kornberg LJ, Villaret D, Popp M, et al. Gene expression profiling in squamous cell carcinoma of the oral cavity show abnormalities in several signaling pathways. **Laryngoscope** 2005; 115:690-8.

Kowalski LP, Carvalho AL. Influence of time delay and clinical upstaging in the prognosis of head and neck cancer. **Oral Oncol** 2001; 37:94-8.

Lee SK, Jang HJ, Lee HJ, et al. p38 and ERK MAP kinase mediates iron chelator-induced apoptosis and –suppressed differentiation of immortalized and malignant human oral keratinocytes. **Life Sci** 2006; 79:1419-27.

Leerkes MR, Caballero OL, Mackay A, et al. In silico comparison of the transcriptome derived from purified normal breast cells and breast tumor cell lines reveals candidate upregulated genes in breast tumor cells. **Genomics** 2002; 79:257-65.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. **Methods** 2001; 25:402-8.

Loging WT, Lal A, Siu IM, et al. Identifying potential tumor markers and antigens by database mining and rapid expression screening. **Genome Res** 2000; 10:1393-402.

Lung T, Tascau OC, Almasan HA, Muresan O. Head and neck cancer, treatment, evolution and post therapeutic survival – Part 2: a decade's results 1993-2002. **J Craniomaxillofac Surg** 2007; 35:126-31.

Massano J, Regateiro FS, Januario G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2006; 102:67-76.

Max N, Willhauck M, Wolf K, et al. Reliability of PCR-based detection of occult tumour cells: lessons from real-time RT-PCR. **Melanoma Res** 2001 11:371-8.

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2006: incidência do câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Mishima K, Inoue K, Hayashi Y. Overexpression of extracellular-signal regulated kinases on oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2002; 38:468-74.

Modjtahedi H. Molecular therapy of head and neck cancer. **Cancer Metastasis Rev** 2005; 24:129-46.

Murphy RM, Watt KK, Cameron-Smith D, Gibbons CJ, Snow RJ. Effects of creatine supplementation on housekeeping genes in human skeletal muscle using real-time RT-PCR. **Physiol Genomics** 2003; 12:163-74.

Myers JN, Greenberg JS, Mo V, Roberts D. Extracapsular spread: a significant predictor of treatment failure in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. **Cancer** 2001; 92:3030-6.

Nailis H, Coenye T, Van Nieuwerburgh F, Deforce D, Nelis HJ. Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. **BMC Mol Biol** 2006; 7:25.

Nagai MA; Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas. **Braz J Med Bio Res** 1999; 32:897-904.

Nagler RM, Reznick AZ. Cigarette smoke effects on salivary antioxidants and oral cancer-novel concepts. **Isr Med Assoc J** 2004; 6:691-4.

Ohl F, Jung M, Xu C, et al. Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? **J Mol Med** 2005; 83:1014-24.

Ohl F, Jung M, Radonic A, Sachs M, Loening SA, Jung K. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies of human bladder cancer. **J Urol** 2006; 175:1915-20.

Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of eithteen major cancer in 1985. **Int J Cancer** 1993; 54:594-606.

Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP. Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. **J Can Dent Assoc** 2007; 73:339-44.

Perez-Ordenez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Pathol** 2006; 59:445-53.

Pfister DG, Su YB, Kraus DH, et al. Concurrent cetuximab, cisplatin, and concomitant boost radiotherapy for locoregionally advanced, squamous cell head and neck cancer: a pilot phase II study of a new combined-modality paradigm. **J Clin Oncol** 2006; 24:1072-8.

Poschl G, Seitz HK. Alcohol and cancer. **Alcohol Alcohol** 2004; 39:155-65.

Pruitt KD, Tatusova T, Maglott DR. NCBI Reference Sequence (RefSeq): a curated non-redundant sequence database of genomes, transcripts and proteins. **Nucleic Acids Res** 2005; 33(Database issue):D501-4.

Reis EM, Ojopi EPB, Alberto FL, et al. Large scale transcriptome analysis reveal new genetic marker candidates of head, neck, and thyroid cancer. **Cancer Res** 2005; 65:1693-9.

Rodu B, Jansson C. Smokeless tobacco and oral cancer: a review of the risks and determinants. **Crit Rev Oral Biol Med** 2004; 15:252-63.

Rubie C, Kempf K, Hans J, et al. Housekeeping gene variability in normal and cancerous colorectal, pancreatic, esophageal, gastric and hepatic tissues. **Mol Cell Probes** 2005; 19:101-9.

Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques** 1994; 17:914-21.

Saviozzi S, Cordero F, Lo Iacono M, Novello S, Scagliotti GV, Calogero RA. Selection of suitable reference genes for accurate normalization of gene expression profile studies in non-small cell lung cancer. **BMC Cancer** 2006; 6:200.

Schwartz SM, Doody DR, Fitzgibbons ED, Ricks S, Porter PL, Chen C. Oral squamous cell cancer risk in relation to alcohol consumption and alcohol dehydrogenase-3 genotypes. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2001; 10:1137-44.

Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma: 1. carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncol** 2000; 36:256-63.

Scully C, Bagan JV. Recent advances in oral oncology. **Oral Oncol** 2007; 43:107-15.

Sharief FS, Vojta PJ, Ropp PA, Copeland WC. Cloning and chromosomal mapping of the human DNA polymerase theta (POLQ), the eighth human DNA polymerase. **Genomics** 1999; 59:90-6.

Sheahan P, O'Keane C, Sheahan JN, O'Dwyer TP. Predictors of survival in early oral cancer. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2003; 129:571-6.

Shi Y, Zhai H, Wang X, et al. Ribosomal proteins S13 and L23 promote multidrug resistance in gastric cancer cells by suppressing drug-induced apoptosis. **Exp Cell Res** 2004; 296:337-46.

Siegel S. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences**. New York: McGraw-Hill; 1956.

Singh B, Stoffel A, Gogineni S, et al. Amplification of the 3q26.3 locus is associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinomas. **Am J Pathol** 2002; 161:365-71.

Steckelbroeck S, Watzka M, Lutjohann D, et al. Characterization of the dehydroepiandrosterone (DHEA) metabolism via oxysterol 7 α -hydroxylase and 17-ketosteroid reductase activity in the human brain. **J Neurochem** 2002; 83:713-26.

Tomonaga T, Matsushita K, Yamaguchi S, et al. Identification of altered protein expression and post-translational modifications in primary colorectal cancer by using agarose two-dimensional gel electrophoresis. **Clin Cancer Res** 2004; 10:2007-14.

Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. **Oral Oncol** 2007; 43:523-34.

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(7):RESEARCH0034.

Vartanian JG, Carvalho AL, Toyota J, Kowalski IS, Kowalski LP. Socioeconomic effects of and risk factors for disability in long-term survivors of head and neck cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2006; 132:32-5.

Viswanathan H, Wilson JA. Alcohol--the neglected risk factor in head and neck cancer. **Clin Otolaryngol Allied Sci** 2004; 29:295-300.

Warnakulasuriya S, Sutherland G, Scully C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. **Oral Oncol** 2005; 41:244-60.

Williams HK. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. **Mol Pathol** 2000; 53:165-72.

Winn DM. Epidemiology of cancer and other systemic effects associated with the use of smokeless tobacco. **Adv Dent Res** 1997; 11:313-21.

Winning TA, Townsend GC. Oral mucosal embryology and histology. **Clin Dermatol** 2000; 18:499-511.

Woolgar JA, Rogers S, West CR, Errington RD, Brown JS, Vaughan ED. Survival and patterns of recurrence in 200 oral cancer patients treated by radical surgery and neck dissection. **Oral Oncol** 1999; 35:257-65.

Wu YY, Rees JL. Variation in epidermal housekeeping gene expression in different pathological states. **Acta Derm Venereol** 2000; 80:2-3.

Zain RB. Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer-a brief overview. **Oral Oncol** 2001; 37:205-10.

Zhang QX, Feng R, Zhang W, Ding Y, Yang JY, Liu GH. Role of stress-activated MAP kinase P38 in cisplatin- and DTT-induced apoptosis of the esophageal carcinoma cell line Eca109. **World J Gastroenterol** 2005; 11:4451-6.

Zhong H, Simons JW. Direct comparison of GAPDH, beta-actin, cyclophilin, and 28S rRNA as internal standards for quantifying RNA levels under hypoxia. **Biochem Biophys Res Commun** 1999; 259:523-6.

Zou L, Wu Y, Pei L, et al. Identification of leukemia-associated antigens in chronic myeloid leukemia by proteomic analysis. **Leuk Res** 2005; 29:1387-91.

ANEXOS

Anexo 1 - Classificação clínica (TNM) para o câncer de cavidade oral baseada na extensão do tumor primário, na ausência ou presença e a extensão de metástases em linfonodos regionais e a ausência ou presença de metástase à distância.

Extensão do Tumor Primário			Linfonodos Regionais		Metástase à Distância	
T	Tumor Primário	N	Linfonodos Regionais	M	Metástase à Distância	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado	NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados	MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada	
T0	Não há evidência de tumor primário	N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais	M0	Ausência de metástase à distância	
Tis	Carcinoma in situ	N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior dimensão	M1	Metástase à distância	
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão	N2	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão			
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão	N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão,			
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão	N2b	Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão			
T4a	(Cavidade oral) Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/extrinsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face	N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão			
T4b	(Lábio e cavidade oral): Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pierigóides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna	N3	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão			

Anexo 2 - Grupamento de Estádios para o câncer de cavidade oral baseada na classificação clínica (TNM) - extensão do tumor primário, presença ou ausência de comprometimento de linfonodos regionais e a ausência ou presença de metástase à distância.

Grupamento por Estádios	
Estádio 0	Tis N0 M0
Estádio I	T1 N0 M0
Estádio II	T2 N0 M0
Estádio III	T1, T2 N1 M0 T3 N0, N1 M0
Estádio IVA	T1, T2, T3 N2 M0 T4a N0, N1, N2 M0
Estádio IVB	Qualquer T N3 M0 T4b Qualquer N M0
Estádio IVC	Qualquer T Qualquer N M1

		NM_002473	MYH9	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	0.0350	1.069	10690		0.0000707	0.000667164	9.43
gi 51317362		NM_001417	EIF4B	eukaryotic translation initiation factor 4B	0.0700	1.314	13140		0.000235944	0.000500373	2.12
gi 50053794		NM_199420	POLQ	polymerase (DNA directed), theta carboxylesterase 1	0.0000	0.646	ND		0.0000471	0.000264903	5.61
gi 68508956		NM_001266	CES1	(monocyte/macrophage serine esterase 1)	0.0000	1.870	ND		0.000188755	0.000637773	3.38
gi 34147375		NM_024311		hypothetical protein ET	0.0000	1.715	ND		0.0000471	0.000706409	14.97
gi 42734338		NM_018193	KIAA1794	KIAA1794	0.0000	0.601	ND		0.0000235	0.000274714	11.64
gi 21071055		NM_003072	SMARCA4	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a, member 4	0.0000	0.824	ND		0.0000471	0.000372827	7.90
gi 6912279		NM_012111	AHSA1	AHA1, activator of heat shock 90kDa protein ATPase homolog 1	0.0000	0.534	ND		0.0000707	0.000225658	3.19
gi 51493126		XM_085151	YLP M1	YLP motif containing 1	0.0000	3.184	ND		0.0000471	0.001412817	29.94
gi 45356742		NM_020382	SETD8	SET domain containing (lysine methyltransferase) 8	0.0000	2.405	ND		0.0000	0.00079471	ND
gi 68508964		NM_001025194	CES1	carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)	0.0000	0.690	ND		xxxx	xxxx	xxxx
gi 7705832		NM_016119	PHF11	PHD finger protein 11	0.0000	1.180	ND		0.0000	0.000510184	ND
gi 4507658		NM_003292	TPR	translocated promoter region (to activated MET oncogene)	0.0000	0.646	ND		0.000141566	0.000264903	1.87
	Larange 2	gi 5016088	ACTB	actin, beta	0.0000	0.475	ND		0.001344879	0.001864134	1.39
		gi 62422569	POL R2K	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K, 7.0kDa	0.0000	0.094	ND		0.0000943	0.000176602	1.87
		gi 6005801	PRR4	proline rich 4 (lacrim al)	0.0350	0.960	27.42857		0.0000707	0.002040736	28.83
		gi 13375806	C1orf165	chromosome 1 open reading frame 165	0.0000	0.592	ND		0.0000	0.000961501	ND
		gi 51464623			0.0000	0.673	ND		xxxx	xxxx	xxxx
		gi 68216257	RPL19	ribosomal protein L19	0.0000	1.036	ND		0.000330321	0.00214866	6.50

Laringe 3	gil19923243	NM_004308	ARHGAP1	Rho GTPase activating protein 1	0.0000	0.812	ND	0.0000	0.0000686	ND
	gil25453469	NM_001402	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	0.0000	0.780	ND	0.002477408	0.001559986	0.63
	gil4557700	NM_000422	KRT17	keratin 17	0.0350	1.137	32.48571	0.0033504	0.013048938	3.89
	gil42716296	NM_001831	CLU	clusterin transcript variant 1,	0.0000	0.552	ND	0.000117972	0.000431694	3.66
Laringe 4	gil34577108	NM_000034	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate , transcript variant1	0.0350	4.963	141.80000	0.0000707	0.011155371	157.60
	gil17505186	NM_005554	KRT6A	keratin 6A	0.2100	1.059	5.04286	0.007031121	0.015413445	2.19
	gil58535458	NM_001788	SEPT7	septin 7 , transcript variant 1 ,	0.0000	0.508	ND	0.000495482	0.000500373	1.01
	gil4557700	NM_000422	KRT17	keratin 17	0.0350	1.190	34.00000	0.0033504	0.013048938	3.89
Laringe 5	gil17318577	NM_000424	KRT5	keratin 5	0.0000	1.045	ND	0.007031121	0.015413445	2.19
	gil34577108	NM_000034	ALDOA	aldolase A, fructose-bisphosphate , transcript variant1	0.0350	4.963	141.80000	0.0000707	0.011155371	157.60
	gil17505186	NM_005554	KRT6A	keratin 6A	0.2100	1.059	5.04286	0.007031121	0.015413445	2.19
	gil58535458	NM_001788	SEPT7	septin 7 , transcript variant 1 ,	0.0000	0.508	ND	0.000495482	0.000500373	1.01
	gil4557700	NM_000422	KRT17	keratin 17	0.0350	1.190	34.00000	0.0033504	0.013048938	3.89

ID: Identificação das sequencias de ORESTES; NM: Número de identificação no NCBI/ (www.ncbi.nih.gov) ; SIMB: Símbolo de identificação dos genes; Hiper: Valor de hiperexpressão das tags Tumoriais/Normais.

ND: Não foi possível determinar a frequência, pois o número das sequencias normais é igual a 0

Anexo 4 - Medida da expressão diferencial através do método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras tumorais em relação à média dos valores de Cts das amostras normais, normalizadas pela media de expressão dos genes *RPLO*, *TBP* e *PPIA*.

Amostras	ALDOA	POLQ	AHSA1	RPL23	RPL19	PABPC1	KRT5	KRT6A	HDAC1
01T	3,93598	3,64773	4,30119	0,31117	0,60599	0,33471	1,20665	0,58951	0,8359
02T	5,58403	6,87606	6,91304	6,5147	6,99	0,84609	0,93882	0,21898	0,66711
03T	3,35596	9,85142	7,7529	1,65762	2,13965	1,25786	2,15498	1,53077	2,18062
04T	0,25661	1,26539	0,84909	0,34669	0,58776	0,34156	0,14229	0,06684	0,61019
05T	2,77273	1,85093	0,40313	1,18951	0,44812	0,85198	0,90684	0,74855	ND
06T	2,2757	2,41705	1,00998	1,40642	0,58925	1,00038	1,07967	0,22229	ND
07T	9,27618	4,67123	7,62925	1,52371	1,95547	1,26089	0,73943	0,20989	2,38647
08T	4,47449	4,81877	2,15308	0,68339	1,03937	0,70026	0,72665	0,31921	0,79539
09T	2,09004	0,97974	0,98501	0,80251	0,36203	0,6883	1,42518	0,88335	ND
10T	1,04855	0,9204	0,44434	0,70179	0,36283	0,25869	0,44834	0,19787	ND
12T	5,63588	1,52793	1,9761	2,08546	0,78022	0,51129	0,34126	0,46185	ND
13T	5,98943	5,28789	6,62122	0,81685	1,20281	3,16015	0,60153	0,16342	0,92579
14T	1,35574	1,01117	0,3879	0,81121	0,45473	0,84284	0,8104	0,5864	ND
15T	1,92471	1,17412	0,69383	1,3077	0,49722	0,75204	1,3937	1,10357	ND
16T	7,29799	9,81126	5,09416	1,50513	1,27587	1,08805	1,38682	0,22873	3,30697
17T	4,13525	5,87633	4,86572	0,44095	1,13968	0,99003	0,89023	0,28827	1,80582
18T	6,24378	0,22573	1,08957	0,43371	ND	ND	ND	ND	ND
19T	13,6191	38,5279	6,73761	1,53682	2,21127	2,3704	2,73557	1,6078	2,96337
20T	3,63337	2,62973	2,10816	1,4577	0,65609	1,09598	0,64569	0,20103	ND
21T	4,9576	2,22157	3,39322	1,71757	0,57646	0,56863	0,52265	0,20764	7,41778
22T	1,64234	0,75403	0,61576	0,52116	0,3977	1,19886	1,41752	0,39319	ND
23T	13,0178	4,77674	8,36152	4,01336	1,98124	2,71947	2,41725	2,37834	ND
25T	9,10629	5,29197	5,04507	1,59393	0,66936	0,85922	1,00079	0,61319	1,10776
26T	11,7301	9,27972	6,55905	2,58088	1,51865	1,50843	1,08154	0,63128	ND
27T	14,2125	0,12365	0,82194	1,69131	0,70861	0,48858	0,12733	0,04769	ND
28T	3,81989	1,61754	0,98047	1,50273	0,58541	0,41116	1,14167	0,18399	ND
29T	1,67846	0,55636	0,67603	0,63121	0,37142	0,51693	0,53394	0,36552	ND
30T	2,12085	0,00159	0,49175	0,93327	0,31981	ND	ND	ND	ND
31T	7,08984	4,54	2,39567	0,96693	0,47844	0,73713	0,65069	0,37198	0,31907
32T	8,33444	0,0197	4,62814	1,80852	0,8388	1,4983	1,05704	0,48295	ND
33T	20,177	5,24732	7,46075	2,64579	2,31652	2,4775	0,65019	0,46399	ND
34T	39,7678	12,4419	4,75093	2,36622	1,35114	0,84154	1,15761	ND	ND
35T	6,13415	1,61009	1,81698	1,785	0,81273	1,20117	1,52043	0,33706	ND
36T	2,03602	0,00109	2,10492	0,79451	0,4165	ND	ND	ND	ND
37T	20,7123	5,73327	4,57498	1,59823	1,26553	2,41718	1,29238	0,57566	ND

38T	1,03541	0,72053	1,23817	0,50906	0,69296	ND	ND	ND	1,63077
39T	3,19732	1,93697	1,46227	0,97891	0,51974	0,93375	1,54343	0,65266	ND
40T	3,43473	0,01883	0,60915	4,69976	2,36337	0,94242	0,3522	0,31159	ND
41T	4,27284	0,848	3,36718	7,75031	3,25844	0,39992	0,68514	0,13376	ND
42T	1,03411	6,72872	1,10043	0,74352	0,54238	ND	ND	ND	ND
43T	0,94838	0,00586	1,70709	0,62529	0,27184	ND	ND	ND	ND
44T	4,02217	3,10569	2,57158	2,01442	1,17851	0,8579	0,35575	0,25505	ND
45T	1,25525	0,00392	2,36633	1,18402	0,85182	ND	ND	ND	ND
46T	2,38424	0,00086	0,53152	0,75747	1,18169	ND	ND	ND	ND
47T	3,31007	0,01238	1,54208	0,71084	1,04067	ND	ND	ND	ND
49T	3,40313	0,00318	0,88979	0,53314	0,19045	ND	ND	ND	ND
50T	2,29594	0,00151	1,11247	0,63353	0,45683	ND	ND	ND	ND
51T	6,51896	0,65516	1,3654	3,33349	1,97515	0,31474	0,66231	0,5673	ND

¹Código das amostras do Banco de Ácidos Nucléicos do Hospital do Câncer AC Camargo

²ND-não dosado.

Anexo 5 – Ficha de dados clínicos utilizada para coleta dos dados clínicos e patológicos dos pacientes incluídos na pesquisa.

Fundação Antônio Prudente – Hospital A. C. Camargo
Departamento de Cabeça e Pescoço – Ludwig Institute for Cancer Research
Identificação de Genes Hipreexpressos em Carcinomas Epidermóides de Cavidade Oral.
Roberta Cardim Lessa, Dr. André Lopes Carvalho , Dr. André Luis Vettore

Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
Sem tratamento prévio Carcinoma epidermóide Língua oral, gengiva superior e inferior, soalho bucal, palato duro, região jugal, sulcos bulco-alveolares, área retromolar Qualquer T e qualquer N Cirurgia como tratamento inicial	Tratamento prévio Outros tumores de CP previamente Tumores múltiplos simultâneos Outras histologias ou sem AP M1 RT ou QT prévias

IDENTIFICAÇÃO E DADOS DEMÓGRAFICOS

1. Número do estudo: [][][][]

2. RGH: [][][][][][]

3. Idade: anos [][][]

4. Sexo: (1) Masculino (2) Feminino []

5. Raça: (1) Branca (2) Amarela (3) Negra (4) Outra []

HISTÓRIA CLÍNICA

6. História familiar de câncer: (0) Não (1) Pais (2) Irmãos (3) Outro parentes (9) Desconh. [][][]

7. Tabagismo: (0) Não (1) Sim (9) Desconhecido []

8. Etilismo: (0) Não (1) Sim (9) Desconhecido []

LOCO-REGIONAL

9. Local do tumor: (1) ponta de língua (2) corpo de língua (3) ponta e corpo de língua (4) sulco pelve-lingual (5) soalho (6) gengiva inferior (7) retromolar []

10. Níveis de linfonodos ipislat. N+ clinicamente: (0) Não (1) I (2) II (3) III (4) IV (5) V [][][][][]

11. Diâmetro do maior linfonodo ipislat. +: cm (0) se N- [][][]

12. Níveis de linfonodos contralat. N+ clinical.: (0) Não (1) I (2) II (3) III (4) IV (5) V [][][][][]

13. Diâmetro do maior linfonodo contralat. +: cm (0) se N- [][][]

14. Estádio T (atualizar UICC 87): (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (9) Tx []

15. Estádio N (atualizar UICC 87): (0) No (1) N1 (2) N2a (3) N2b (4) N2c (5) N3 (9) Nx []

CIRURGIA

16. Data da cirurgia: ____/____/____ [][]
17. Cirurgia tumor primário: (1) Glossectomia parc. (2) Hemiglossect. (3) Pelveglossect. (4) Pelve(gl.)mand. marg. – Pull (5) Pelve(gl.)mand. sec. – Com. (6) Retrom. (7) Retrom. Ampliada... []
18. Esvaz. cervical ipislat.: (0) Não (1) ESOH (2) ECR (3) ECRM(XI) (4) ECRM (XI+VJ) []
19. Esvaz. cervical contral. (simult.): (0) Não (1) ESOH (2) ECR (3) ECRM(XI) (4) ECRM (XI+VJ) []
20. Esvaz. Cervical: (0) Não (1) Monobloco (2) Dibloco []
21. Ampliação do esvaz. Cervical: (0) Não (1) pele (2) carótida (3) hipoglosso (4) vago (5) Outros [][][]
22. Reconstrução: (0) Não (1) língua (2) outro retalho local (3) Mc Gregor-frontal (4) Backanjian-deltop. (5) mioc. peitoral maior (6) mioc. peitoral menor (7) outro miocut. (8) microcirúrgico [][]
23. Complicações imediatas: (0) Não (1) infecção (2) necrose de retalhos (3) fistula oro-cerv. (4) ruptura da carótida (5) fistula quilosa (6) infecção resp. (7) outra [][][]
24. Data da alta hospitalar: ____/____/____ [][]

RADIOTERAPIA PÓS-OPERATÓRIA

25. Data de início: ____/____/____ (0/0/0 se não fez) [][]
26. Aparelho: (0) Não fez (1) Ortov. (2) Cesium (3) Cobalto (4) AI []
27. Dose do campo cervico-facial: _____ Gy (0 se não fez) [][]
28. Dose em fossa ipislat.: _____ Gy (0 se não fez) [][]
29. Dose em fossa contralat.: _____ Gy (0 se não fez) [][]
30. Data do final: ____/____/____ (0/0/0 se não fez) [][]

ANATOMOPATOLÓGICO DA PEÇA DA CIRURGIA INICIAL

31. Número do AP: _____ [][][][][][][]
32. Histologia do primário: (1) CEC I (2) CEC II (3) CEC III (4) CEC SOE (5) CA indef. []
33. Embolização vascular: (0) Não (1) linfática (2) sanguínea (3) ambas (4) “presente” (9) Ign. []

34. Infiltração perineural: (0) Não (1) presente (9) ignorado[]
35. Margens: (0) livres (1) próximas(< 0,5 cm) (2) comprometidas (9) ign.[]
36. Espessura: _____ mm (999 se não relatado)[]
37. Número de linfonodos comprometidos ipislat. : _____ (99 se não esvaziado)[]
38. Número de linfonodos dissecados ipislat. : _____ (99 se não esvaziado) ..[][][]
39. Nível de linfonodos comprom. ipislat. : (0) N- (1) I (2) II (3) III (4) IV (5) V (9) ign./não esv.....[][][][][]
40. Número de linfonodos comp. contralat.: _____ mm (99 se não esv.)[]
41. Número de linfonodos dissecados contralat.: _____ mm (999 se não esv.)[][][]
42. Nível de linfonodos comprom. contralatet. : (0) N- (1) I (2) II (3) III (4) IV (5) V (9) ign./não esv.[][][][][]

EVOLUÇÃO

43. Data da primeira recidiva: ____/____/____ (0/0/0 se não fez)[][][]
44. Locais de recidiva: (0) não teve (1) local (2) pescoço ipisi. (3) pescoço contra. (4) pulmão (5) osso (6) fígado (7) outras distâncias _____ (8) recidiva, local ign. (9) ignorado-perdido de vista assintomático < 5 anos [][][][][]
45. Data de diagnóstico do segundo tumor primário: ____/____/____ (0/0/0 se não fez)[][][]
46. Local do segundo tumor primário: CID-0 _____ (0 se não teve).... [][][][][]
47. Data da última informação objetiva de segmento: ____/____/____[][][]
57. Status: (1) Vivo s/ doença (2) Vivo com doença (3) Morte pós-op (4) MOCA (5) Óbito p/out/causas _____ (6) Perdido de vista (definição: Para pacientes com menos de 5 anos de seguimento todos os que deixaram de retornar por um período igual ao dobro estipulado. Pacientes assintomáticos perdidos após 5 anos devem ser classificados como Vivos 000)[]

Para pacientes perdidos de vista: Anotar nome, endereço e telefone.
Entregar o prontuário aos responsáveis pela convocação de pacientes desta lista diariamente.

Coletador de Dados:

FONTE: Kowaski, LP (1996)

Anexo 6 – Termo de consentimento pós informado utilizado para a coleta das amostras normais incluídos na pesquisa.

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução 196/96 e Resolução CNS 251/97)

I – Identificação do paciente

Nome do paciente: _____

Identidade nº.: _____ Sexo: __ Nascimento: __/__/__ Tel () _____

Endereço: _____ Cidade: _____ Estado: _____

II – Dados sobre o estudo

- Título do estudo:

Identificação de Genes Hipreexpressos em Carcinomas Epidermóides de Cavidade Oral

- Pesquisadores responsáveis:

Roberta Cardim Lessa

Dr. André Lopes Carvalho

Dr. André Luiz Vettore

III – Esclarecimentos

1. Justificativa e objetivos:

A evolução dos tumores da região da cabeça e do pescoço é muito variável dependendo do local de origem e de diversos outros fatores. Muitos desses fatores são utilizados para decidir o tratamento a ser empregado. No entanto, muito ainda precisa ser pesquisado para se conhecer a capacidade de crescimento desses tumores e possivelmente empregar, no futuro, este conhecimento para mudar o tratamento que pode acarretar mudanças na qualidade de vida do paciente. O objetivo deste estudo é conhecer e avaliar

alterações em alguns genes envolvidos com esses tipos de tumores e correlacionar esses dados com as informações da sobrevida do paciente após tratamento convencional.

2. O que é necessário para participar do estudo?

Coletar amostras de tecido normal durante o ato cirúrgico

3. Existe algum risco esperado?

Não há qualquer risco esperado no estudo.

4. Quais os benefícios que poderão ser obtidos pelo estudo?

O estudo possibilitará a determinação dos genes que se apresentam mais freqüentemente alterados nos cânceres de vias aerodigestivas superiores. Estes dados poderão permitir o seguimento clínico adequado de pacientes futuros de acordo com os dados obtidos na análise dos genes, seguida de correlação com os dados clínicos.

5. Fui esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento, a cerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa e o tratamento do indivíduo.

() SIM

() NÃO

6. Fui esclarecido sobre a liberdade de retirar meu consentimento a qualquer momento sem que isso traga prejuízo quanto a continuidade do meu tratamento.

() SIM

() NÃO

7. Fui esclarecido de que não haverá remuneração financeira além do previsto para as despesas do estudo.

() SIM

() NÃO

8. Fui esclarecido que não haverá indenização além das previstas por lei, em reparação a danos imediatos ou tardios, causados pela pesquisa em questão.

() SIM

() NÃO

9. Fui esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial.

() SIM

() NÃO

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

Declaro que, após ter sido convenientemente esclarecido dos riscos e benefícios deste estudo, conforme definido nos itens 1 a 9, do inciso III, consinto em participar, na qualidade de paciente, do Projeto de Pesquisa referido no inciso II. Estou ciente também de que qualquer dúvida sobre o Projeto de Pesquisa em questão, serão resolvidas com os pesquisadores principais pessoalmente ou pelo tel. (11) 3272-5000 (ramal 5125).

São Paulo, ____ de ____ de 20 ____.

Assinatura: _____ Assinatura: _____

Nome paciente: _____ Nome pesquisador: _____