

**PERFIL DE EXPRESSÃO GÊNICA EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO:
ALTERAÇÕES EM MÓDULOS FUNCIONAIS
ASSOCIADAS À BIOLOGIA E AO COMPORTAMENTO
DOS TUMORES**

ANNA ESTELA LUIZA COLÓ

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Alex Fiorini de Carvalho

Co-Orientador: Dr. Luiz Fernando Lima Reis

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Coló, Anna Estela Luiza

Perfil de expressão gênica em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: alterações em módulos funcionais associadas à biologia e ao comportamento dos tumores / Anna Estela Luiza Coló – São Paulo, 2009.

107p.

Tese (doutorado) Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Alex Fiorini de Carvalho

Descritores: 1. EXPRESSÃO GÊNICA. 2. CARCINOMA EPIDERMÓIDE. 3. CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO. 4. BIOLOGIA MOLECULAR. 5. NEOPLASIAS/genética.

*Do not follow where the path may lead.
Go instead where there is no path and leave a trail.*

Muriel Strode

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer pela ajuda na realização desse trabalho (em ordem cronológica):

Aos meus orientadores Alex e Luiz Fernando, pelos ensinamentos, confiança e amizade desde minha iniciação científica.

Ao Instituto Ludwig, Hospital AC Camargo e Fundação Antônio Prudente, pela oportunidade.

À FAPESP e CAPES, pelas bolsas de mestrado e doutorado, respectivamente.

Aos pacientes, por autorizar a utilização das amostras.

Ao Dr André Carvalho e Luiz Paulo Kowalski, pelos ensinamentos e ajuda com prontuários.

Ao SAME, pelos prontuários.

Ao Dr Hugo, André Abreu, Louise Mota, Ellen Bastos e Waleska Martins pelas amostras do Banco de Tumores e de RNA.

Ao Severino e Miyuki, pelas lâminas histológicas.

À Leia e Isabel, do Instituto Ludwig, Chamberlein e Anderson, do Hospital AC Camargo pela esterilização de materiais e água.

À Bianca, Mariana Martins e Chamberlein, pela ajuda na extração de RNA.

À Regina Nomizo e Evânia, pelo acompanhamento na cultura de células.

À Bianca e Ana Helena, pelo trabalho em equipe para obtenção do RNA referência.

À Sarah, pelo auxílio na amplificação de RNA.

À Bianca e Chamberlein, pela ajuda na quantificação das imagens de *microarray*.

À Dra Helena Brentani, Artur Fabri, César Torres, Diogo Patrão, Fábio Mathias e Luiz Paulo Camargo, do Laboratório de Biotecnologia, pelo auxílio com banco de dados clínicos e com as pré-análises de *microarray*.

Ao Dr Eduardo Jordão Neves, Dra Ana Carolina Simões e Lucas Fahham, do IME-USP, pela análise matemática e estatística dos dados de microarray.

À Mariana Maschietto, pelas dicas na análise de vias.

À Aline Pacífico, Ana Paula Lepique, Enrique Boccardo, Lara Termini, Patrícia Possik e Vladimir Lima, por toda ajuda e ensinamentos.

À Elisa Napolitano, Mariana Morato, Juliana Monte Real, Nair Muto e Ricardo Moura, pelos ensinamentos sobre PCR quantitativa.

À Camila Melo, minha companheira de PCR quantitativa.

À Pós-graduação e Biblioteca, pela presteza com documentos e artigos.

Aos departamentos de TI do Instituto Ludwig e do Hospital AC Camargo, pela resolução de problemas com computador.

À Suely Francisco, pela revisão da tese.

Gostaria também de agradecer:

Aos colegas do LABRI e agregados de todos os tempos Adriana Abalen, Aline Pacífico, Ana Helena, Anderson Souza, Bárbara Melo, Beatriz Stolf, Bianca Barreto, Chamberlein Neto, Eduardo Abrantes, Graziela Spilborghs, Juliana Monte Real, Lara Termini, Letícia Lerner, Luciana Gomes, Mariana Martins, Mariana Morato, Marina Baeta, Nair Muto, Patrícia Possik, Regina Nomizo, Sarah Marques, Sibele Meireles, Suzana Diniz, Tatiana Munhoz, Vladimir Lima, Waleska Martins, pela amizade, companhia, festas, jogos, almoços e risadas.

À Ana Paula Hidalgo, companhia insubstituível de corridas e para todos os momentos.

À Alexandra Dumont, Ana Cintra, Andréa Sendoda, Elisa Napolitano, Felícia Cavalher, Maíra Rossi, Mariana Hortelani e Mariana Morato, por toda amizade e união durante tantos anos.

Ao Celso, pelo amor que não tenho palavras para descrever.

Aos meus pais, Ahuwa e Caetano, minha avó, Ester, meus irmãos Laura, Gabriela e Juliano, e Yumi, por todo amor e apoio durante toda minha vida.

RESUMO

Colo AEL. **Perfil de expressão gênica em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço: alterações em módulos funcionais associadas à biologia e ao comportamento dos tumores.** São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço se origina do epitélio estratificado escamoso através do acúmulo de alterações genéticas, devido principalmente ao consumo de álcool e tabaco. Em cabeça e pescoço, o carcinoma epidermóide acomete a cavidade nasal e seios paranasais, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe. Apesar dos esforços para o aprimoramento dos métodos de diagnóstico e tratamento, o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço ainda é uma doença que apresenta alguns obstáculos no seu manejo, já que indivíduos com tumores clínicos e patologicamente semelhantes, que recebem o mesmo tratamento, apresentam respostas bastante heterogêneas. Como se originam do mesmo tecido, o estudo de alterações moleculares do carcinoma epidermóide nas diferentes topografias de cabeça e pescoço permite uma melhor compreensão da biologia da doença, possibilitando uma nova forma de classificação desses tumores. Além disso, a análise de alterações de expressão gênica relacionadas ao comportamento do tumor permite identificar alterações relacionadas à progressão tumoral. Ao comparar a expressão gênica de carcinoma epidermóide de diferentes topografias de cabeça e pescoço, observa-se que, para os genes representados na plataforma utilizada, a topografia não é o fator que mais influencia o perfil de expressão gênica global ou de genes individualmente. Incluindo amostras de CE de esôfago, pulmão e colo de útero na análise de expressão gênica global, os dados sugerem a existência de duas classes “moleculares” de amostras de CECP, que apresentam expressão diferencial de genes e alteração em módulos funcionais relacionados à agressividade e progressão

tumoral, e não à topografia. Em relação ao comportamento do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, as amostras de CECP N0 apresentaram inativação de módulos com os genes AKT1, AREG, CCL20, EGFR, IL1B, INHBA e SPHK1, que pode não proporcionar a sobrevivência das células tumorais nos linfonodos. Em relação aos tumores “avançados” (T3-4N+), os tumores “iniciais” (T1-2 N0) apresentaram inativação de módulo que contém MMP9, cujo bloqueio impede a progressão tumoral *in vivo* (KATORI et al. 2002; YAMASHITA et al. 2003). Os casos de CECP N+, tratados com radioterapia e que apresentaram recidivas mostraram ativação de módulos com EGLN3, um possível marcador de resistência a radioterapia, e POSTN, relacionado à transição epitelial-mesenquimal e metástases. O conjunto de vias e módulos funcionais alterados nas diversas comparações indicam que os tumores de perfil agressivo apresentam mudanças na expressão de genes relacionados à comunicação entre microambiente, MEC e a célula tumoral. Isso pode estimular vias de sinalização que promovem a progressão tumoral através da inibição de apoptose, estímulo de sobrevivência e proliferação celular, angiogênese, invasão e mobilidade de células tumorais.

SUMMARY

Coló AEL. **[Gene expression profile in head and neck squamous cell carcinoma: alterations in functional modules associated to tumor biology and behavior]**. São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) arise from the squamous epithelium cells as result of multiple genetic alterations, mainly due to alcohol e tobacco consumption. HNSCC affects the nasal cavity and paranasal sinus, oral cavity, oropharynx, hypopharynx and larynx. Despite efforts for the improvement in diagnosis and treatment, the management of head and neck cancer is still difficult, since similar patients, affected by tumors with similar clinicopathological parameters and undergoing the same treatment, show significant heterogeneity in their outcome. Since these tumor share same histological origin, gene expression analysis of tumor from different subsites provides a better understanding of the biologic features of the disease, leading to new approaches for the classification of HNSCC. In addition, analysis of gene expression alterations related to tumor behavior may allow the identification of changes associated with tumor progression. Considering the set of genes represented in the platform, analysis of HNSCC from different subsites shows that either global gene expression or single gene expression is not strongly influenced by tumor site. When global gene expression of squamous cell carcinoma of the head and neck, esophagus, lung and cervix was assessed, two molecular types of HNSCC samples were highlighted, which are classified according to the differential expression of genes and activation of modules associated with aggressiveness and tumor progression, and not associated with tumor subsite. Regarding HNSCC behavior, alterations in pathways and functional modules indicate that negative lymph node HNSCC samples (N0) present inactivation of modules with AKT1, AREG, CCL20, EGFR, IL1B, INHBA, and SPHK1. This alteration

may not allow the survival of tumor cells within lymph nodes. Comparing “advanced” (T3-4N+) and “early” (T1-2 N0), the last ones show inactivation of MMP9. According to the literature, its blockade inhibits *in vivo* tumor progression (KATORI et al. 2002; YAMASHITA et al. 2003). Samples from N+ patients, treated with adjuvant radiotherapy and presenting recurrent or metastatic disease show activation of modules containing EGLN3, a putative marker of radiotherapy resistance, and POSTN, related to the epithelial-mesenchymal transition and to the development of metastasis. The set of altered functional modules indicates that tumors with aggressive profile present changes in the expression of genes implicated in communication between the microenvironment, the extracellular matrix and tumor cells. This may lead to the activation of pathways which promote tumor progression through apoptosis inhibition, cell survival, proliferation, angiogenesis, invasion and tumor cell motility.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de instabilidade genética e progressão do CECP a partir do epitélio escamoso normal.....	2
Figura 2	Eletroforese em gel de agarose de RNA total e amplificado de amostras de carcinoma epidermóide e linhagens celulares do RNA referência.....	23
Figura 3	Imagem digitalizada obtida após o experimento de microarray e quantificação dos dados.....	25
Figura 4	Normalização dos dados de microarray.....	27
Figura 5	Curvas para análise de resultados de amplificação das reações de PCR quantitativa.....	32
Figura 6	Produto de PCR quantitativa fracionado em gel de acrilamida 8% obtido em reações com 400, 200 e 100 η M dos iniciadores dos genes INHBA e MCM2.....	33
Figura 7	Curva padrão de reações de PCR quantitativa.....	34
Figura 8	Frequência de comprometimento linfonodal nos casos de Carcinoma Epidermóide de CNSP, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe.....	39
Figura 9	Distribuição da razão do sinal de Alexa 647/Alexa 555 para cada um dos 48 quadrantes de uma lâmina de <i>microarray</i>	40
Figura 10	Correlação entre os dados de duplicatas de lâminas de <i>microarray</i>	41

Figura 11	Expressão gênica global e dados clínico e anátomo-patológicos de amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	44
Figura 12	Agrupamento hierárquico não supervisionado construído com os 67 genes do perfil de expressão “intrínseco” descrito por CHUNG et al (2004).....	45
Figura 13	Expressão gênica global de carcinoma epidermóide e dados clínicos e anátomo-patológicos dos casos de CECp.....	50
Figura 14	Agrupamento hierárquico não supervisionado construído com os 119 genes da assinatura de comprometimento linfonodal de ROEPMAN et al (2005, 2006).....	55
Figura 15	Agrupamento hierárquico não supervisionado construído com os 156 genes da assinatura de metástases de RICKMAN et al (2008).....	59
Figura 16	Expressão gênica de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço com ou sem recidivas avaliada por PCR quantitativa.....	63
Figura 17	Expressão gênica de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço com ou sem comprometimento linfonodal avaliada por PCR quantitativa	64
Figura 18	Genes pertencentes a vias e módulos alterados em Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço e suas interações no contexto celular.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Amostras de carcinoma epidermóide utilizadas no estudo.....	19
Tabela 2	Linhagens celulares selecionadas para compor o RNA referência.....	21
Tabela 3	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados em reações de PCR quantitativa dos genes normalizadores e genes selecionados na análise de vias e de módulos alterados em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	31
Tabela 4	Dados clínicos e anátomo-patológicos dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	37
Tabela 5	Homogeneidade da distribuição das variáveis clínicas dentre os casos de carcinoma epidermóide das cinco topografias de cabeça e pescoço.....	39
Tabela 6	Quantidade de genes diferencialmente expressos entre as cinco topografias de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	45
Tabela 7	Genes diferencialmente expressos entre amostras de carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe.....	46
Tabela 8	Vias e módulos funcionais alterados em amostras de carcinoma epidermóide de diferentes topografias de cabeça e pescoço.....	46

Tabela 9	Homogeneidade da distribuição das variáveis clínicas dentre os casos de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço dos braços 1 e braço 2 definidos no agrupamento hierárquico não supervisionado construído com dados de expressão gênica de todos os genes representados na lâmina de <i>microarray</i> para as amostras de CECP, de esôfago, pulmão e colo de útero.....	49
Tabela 10	Genes mais diferencialmente expressos entre o braços 1 e braço 2 de amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço definidos no agrupamento hierárquico não supervisionado construído com dados de expressão gênica de todos os genes representados na lâmina de <i>microarray</i> para as amostras de CECP, de esôfago, pulmão e colo de útero.....	51
Tabela 11	Vias preferencialmente representadas pelos genes diferencialmente expressos entre o braço 1 e braço 2 de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço definidos no agrupamento hierárquico não supervisionado construído com dados de expressão gênica de todos os genes representados na lâmina de <i>microarray</i> para as amostras de CECP, de esôfago, pulmão e colo de útero.....	52
Tabela 12	Vias e módulos funcionais ativos no braço 1 e inativos braço 2 de amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço definidos no agrupamento hierárquico não supervisionado construído com dados de expressão gênica de todos os genes representados na lâmina de <i>microarray</i> para as amostras de CECP, de esôfago, pulmão e colo de útero.....	52
Tabela 13	Vias e módulos funcionais alterados em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço de pacientes com comprometimento linfonodal.....	56

Tabela 14	Vias e módulos funcionais alterados em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço pT1 ou pT2 que não apresentam metástases linfonodais no exame anátomo-patológico do material obtido do esvaziamento cervical.....	57
Tabela 15	Vias e módulos funcionais alterados em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço de pacientes com comprometimento linfonodal e recidivas após tratamento com cirurgia, esvaziamento cervical e radioterapia adjuvante....	60
Tabela 16	Vias e módulos funcionais alterados em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço localizadas (sem comprometimento linfonodal, sem tratamento por radioterapia adjuvante e sem recidivas).....	61
Tabela 17	Resumo dos resultados obtidos com a análise de dados de <i>microarray</i> e de PCR quantitativa dos genes pertencentes a vias e módulos alterados em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço com comprometimento linfonodal e com recidivas.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

aRNA	RNA amplificado
ATCC	“american type cell collection”
BSA	albumina sérica bovina
CDK	“cyclin dependent kinase”
cDNA	DNA complementar
CE	carcinoma epidermóide
CECP	carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço
cN	<i>status</i> linfonodal clínico
CNSP	cavidade nasal e seios paranasais
CP	cabeça e pescoço
Ct	“cycle threshold”
DMSO	Dimetilssufóxido
DNA	ácido desoxirribonucléico
dNTP	desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EGFR	“epidermal growth factor receptor”
FDR	“false discovery rate”
FW	“foward”
GO	“gene ontology”
HPV	“human papillomavirus”
INCA	Instituto Nacional do Câncer
KEGG	“Kyoto encyclopedia of genes and genomes”
LB	“Luria-Bertani medium”
M	Molar
MAPK	“mitogen activated protein kinase”
MEC	matriz extracelular
mM	Milimolar
MMP	“matrix metalloprotease”
mRNA	RNA mensageiro

N	<i>status</i> linfonodal
N+	presença de linfonodo acometido pelo tumor
N0	ausência de linfonodo acometido pelo tumor
ORESTES	“open reading frames ESTs”
PCR	reação em cadeia da polimerase
PI3K	“phosphoinositide-3-kinase”
pT	tamanho do tumor no exame anátomo-patológico
RNA	ácido ribonucléico
rNTP	ribonucleotídeo trifosfato
RV	“reverse”
S	“slope”
SDS	lauril sulfato de sódio
SSC	solução-tampão de cloreto de sódio e citrato de sódio
T	tamanho do tumor
TEM	transição epitelial-mesenquimal
TNM	tamanho do tumor, <i>status</i> linfonodal, metástase a distância
µg	Micrograma
µL	Microlitro
nm	Nanômetro

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	1
1.2	Alterações moleculares em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	7
1.3	Expressão gênica em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço..	9
2	JUSTIFICATIVA.....	13
3	OBJETIVO.....	15
4	MATERIAL E MÉTODO.....	17
4.1	Confecção das lâminas de cDNA <i>microarray</i>	17
4.2	Coleta de amostras.....	18
4.3	Extração de RNA e amplificação.....	21
4.4	Síntese do cDNA marcado, hibridização e captura dos dados.....	23
4.5	Análises dos dados.....	26
4.6	PCR quantitativa.....	29
5	RESULTADOS.....	36
5.1	Análise dos dados clínicos e anátomo-patológicos dos pacientes de CECP.....	36
5.2	Análise de qualidade dos dados de <i>microarray</i>	40
5.3	Aspectos moleculares do carcinoma epidermóide em diferentes topografias.....	42
5.3.1	Comparação do carcinoma epidermóide das cinco topografias de cabeça e pescoço.....	42
5.3.2	Comparação do carcinoma epidermóide das cinco topografias de cabeça e pescoço utilizando carcinoma epidermóide de esôfago, pulmão e colo de útero.....	48

5.4	Aspectos moleculares do comportamento de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	53
5.4.1	Aspectos moleculares da metástase linfonodal em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	53
5.4.2	Aspectos moleculares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em estágios iniciais e avançados.....	56
5.4.3	Aspectos moleculares do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço com recidivas.....	57
5.4.4	Aspectos moleculares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço localizado e colonizador.....	60
5.4.5	PCR quantitativa.....	63
6	DISCUSSÃO.....	66
6.1	Análise dos dados clínicos e anátomopatológicos dos pacientes de CECF.....	67
6.2	Análise de qualidade dos dados de microarray.....	67
6.3	Aspectos moleculares do carcinoma epidermóide em diferentes topografias.....	68
6.3.1	Comparação do carcinoma epidermóide das cinco topografias de cabeça e pescoço.....	68
6.3.2	Comparação do carcinoma epidermóide das cinco topografias de cabeça e pescoço utilizando carcinoma epidermóide de esôfago, pulmão e colo de útero.....	70
6.4	Aspectos moleculares do comportamento de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	73
6.4.1	Aspectos moleculares da metástase linfonodal de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.....	73
6.4.2	Aspectos moleculares de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço em estágios iniciais e avançados.....	77
6.4.3	Aspectos moleculares do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço com recidivas.....	78

6.4.4	Aspectos moleculares do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço localizado e colonizador.....	81
6.4.5	Interação entre os genes e vias alterados.....	82
7	CONCLUSÃO.....	87
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	88

ANEXOS

Anexo 1 Expressão gênica global e dados clínicos de CECP

(Figura 11)

Anexo 2 Vias e módulos alterados em CE de diferentes topografias
de CP (versão completa da Tabela 8)

Anexo 3 Expressão gênica global de CE e dados clínicos de CECP
(Figura 13)

Anexo 4 Vias e módulos alterados no braço 1 e braço 2 (versão
completa da Tabela 12)

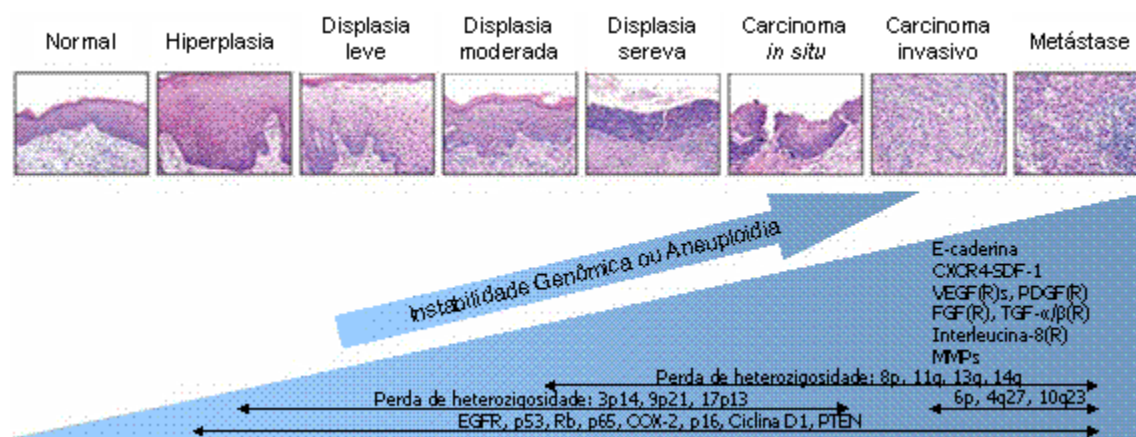
Anexo 5 Vias e módulos alterados em tumores localizados (versão
completa da Tabela 16)

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) é o quinto tipo de câncer mais comum no mundo e representa 90% dos tumores dessa topografia (SANKARANARAYANAN et al. 1998). Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), devem surgir no Brasil 14.160 novos casos de câncer de cavidade oral em 2008 (Ministério da Saúde 2007).

O carcinoma epidermóide (CE), também chamado carcinoma espinocelular ou de células escamosas, é uma neoplasia maligna originada da camada basal de qualquer epitélio estratificado escamoso do corpo (KUMAR et al. 2005). O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço pode se originar de lesões como a hiperplasia e displasia, devido ao contínuo acúmulo de mutações e alterações genéticas (Figura 1).



Fonte: Modificado de HADDAD e SHIN (2008).

Figura 1 - Modelo de instabilidade genética e progressão do CECP a partir do epitélio escamoso normal.

Em cabeça e pescoço, o carcinoma epidermóide acomete quase toda a extensão das vias aerodigestivas superiores: cavidade nasal e seios paranasais, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe. Em termos anatômicos, a cavidade oral inclui a mucosa ou região jugal, o assoalho bucal, a língua oral (dois terços anteriores do órgão), as gengivas inferior e superior, o palato duro e área retromolar. A faringe é dividida em três regiões: nasofaringe, orofaringe e hipofaringe. A nasofaringe é contínua à cavidade nasal e à orofaringe. A orofaringe é constituída pela base da língua (terço posterior da língua), valécula, loja amigdaliana, pilares e sulcos glosso-amigdalianos, palato mole, úvula e pela parede faríngea posterior entre a hipofaringe e a nasofaringe. A hipofaringe é delimitada pelo osso hióide e pela cartilagem cricóide. É dividida em três regiões: área pós-cricóide, seios piriformes e parede posterior. A laringe é anatomicamente dividida em supraglótica, glótica e subglótica. A região supraglótica inclui a epiglote, as falsas cordas vocais, os ventrículos, as pregas ariepiglóticas e

as aritenóides. A região glótica é constituída pelas pregas vocais e pelas comissuras anterior e posterior. A região subglótica tem 2 cm de extensão e se estende desde as cordas vocais até a traquéia (SIDRANSKY 2008).

Os principais fatores de risco envolvidos no desenvolvimento do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço são o tabagismo e o etilismo, mas o HPV, a dieta pobre em vitaminas A e C e a exposição a agentes carcinogênicos ocupacionais e ambientais são outros fatores de risco para esse tumor (GILLISON et al. 2000; KOWALSKI et al. 2005).

O tabaco é responsável por cerca de 90% dos casos de câncer de cabeça e pescoço (WYNDER e STELLMAN 1977). O risco para CECP associado ao tabaco é dose dependente, podendo ser de 5 a 25 vezes maior nos indivíduos tabagistas quando comparados a indivíduos não fumantes. O risco para o desenvolvimento de um segundo tumor primário é 4 vezes maior em pacientes tabagistas ao diagnóstico e geralmente acomete os pulmões (FRANCO et al. 1989).

O consumo de álcool também está associado a maior risco para o desenvolvimento CECP (JOHNSON et al. 1996), e quando associado ao tabaco, o efeito é sinérgico (FRANCO et al. 1989). Resumidamente, os efeitos carcinogênicos desses dois produtos se devem ao dano oxidativo causado por espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio derivadas da fumaça do tabaco e do acetaldeído formado pela metabolização do álcool. As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio levam à peroxidação de lipídios, o que gera mais espécies reativas, propagando os danos às outras moléculas de lipídios, proteínas e DNA. O dano oxidativo ao DNA pode

causar modificação de bases (transformando guanina em uma base que parecia com timina, ao invés de citosina), formação de adutos (introduzindo erros durante a replicação de DNA) e quebras na fita de DNA (HALLIWELL e GUTTERIDGE 2007a e b).

O HPV é detectado em CECP, sendo a incidência maior em orofaringe, chegando a aproximadamente 50% dos casos (GILLISON et al. 2003; HERRERO et al. 2003). A variante de alto risco HPV 16 é a mais encontrada (GILLISON et al. 2000; SCHIFFMAN et al. 2005). Assim como para câncer cervical, o comportamento sexual de risco, infecção oral por HPV e exposição a HPV 16 estão epidemiologicamente associados ao CE de orofaringe (D'SOUZA et al. 2007). A população de pacientes portadores de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço HPV-positiva parece ser biologicamente e clinicamente diferente da população negativa. O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço HPV-positivo é menos associado ao álcool e tabaco e a mediana de idade ao diagnóstico é 5 anos menor (GILLISON et al. 2000; RITCHIE et al. 2003; D'SOUZA et al. 2007).

A escolha do tratamento é baseada no estadiamento dado pelo sistema TNM, onde T é o tamanho do tumor, N representa linfonodos regionais acometidos ou comprometidos pela doença e M, as metástases a distância. Em cabeça e pescoço, as modalidades de tratamento tradicionais são a radioterapia exclusiva, a cirurgia, seguida ou não de radioterapia, e a radio e quimioterapia concomitantes, principalmente com cisplatina. A terapia direcionada a EGFR combinada com radioterapia têm mostrado resultados promissores (revisado em HADDAD e SHIN 2008), entretanto,

nos últimos anos a cirurgia tem ganho cada vez mais importância com o advento da cirurgia robótica transoral (*transoral robotic surgery* ou TORS) (O'MAILLEY et al. 2006).

Quando a cirurgia é o tratamento escolhido, é indicado o esvaziamento cervical em todos os casos de linfonodos palpáveis ao exame clínico. Devido às características anatômicas de cada topografia, o esvaziamento cervical também é realizado em lesões de cavidade oral com espessura igual ou superior a 3 mm situadas no andar inferior: língua, assoalho, gengiva inferior, retromolar e região jugal. O carcinoma epidermóide de orofaringe (valécua, loja amigdalina, base da língua e palato mole T2 a T4) e de hipofaringe também necessitam de esvaziamento cervical. Mesmo com a incorporação de técnicas de reconstrução imediata, a cirurgia pode trazer deformidades, perda de voz e incapacidade de se alimentar através da boca. O esvaziamento cervical, apesar de necessário para o controle regional da doença, também leva a grande impacto estético e funcional, como desconforto, dor e complicações no ombro (SHORT et al. 1984; VAN WILGEN et al. 2003).

Algumas características anátomo-patológicas do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço podem auxiliar na determinação do prognóstico do paciente, como tamanho do tumor (pT), extravasamento extracapsular, padrão de invasão vascular e perineural e margem da ressecção cirúrgica. Entretanto, a detecção de linfonodos cervicais acometidos pelo tumor é crucial no seguimento dos pacientes de CECP, pois sua presença está associada a maior risco para recorrência regional,

metástases à distância e pior sobrevida (PANTEL e BRAKENHOFF 2004). A sobrevida para pacientes sem acometimento linfonodal detectável nos exames anátomopatológicos pode chegar a 85%; já para pacientes com metástases em linfonodos cervicais a sobrevida cai para menos de 54% (SIDRANSKY 2008). No entanto, acredita-se que 20% a 50% dos casos sem linfonodos comprometidos ao exame clínico-patológico apresentem micrometástases e, por essa razão, desenvolvem recorrências da doença (KHAFIF et al. 1991; JONES et al. 1993; HIRATSUKA et al. 1997). Portanto, pacientes que apresentam metástases linfonodais são encaminhados para radioterapia adjuvante.

Após o tratamento, recorrências locorregionais e a distância ocorrem em 60 e 20% dos pacientes de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, respectivamente (GENDEN et al. 2003). Assim, a recorrência locorregional é a maior causa de morbidade e mortalidade (SMITH e HAFFTY 1999). O sítio mais frequente para metástases a distância é o pulmão. Aproximadamente metade das metástases são diagnosticadas após 9 meses do diagnóstico do tumor primário e 90% são detectadas até 3 anos após o tumor primário (SIDRANSKY 2008). Devido às recorrências e à dificuldade em tratá-las, a sobrevida em cinco anos é de 30 a 50% (FORASTIERE et al. 2001; LE TOURNEAU et al. 2005).

Outra característica importante dos carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço é a alta taxa de ocorrência de segundos tumores primários. Segundo a Sociedade Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço a possibilidade de desenvolvimento de segundos tumores primários

sincrônicos do trato aerodigestivo superior (cavidade oral, faringe, laringe, traquéia e esôfago cervicais) é estimada em 5% a 35%. A explicação sobre a alta taxa de ocorrência de segundos tumores primários é a presença dos chamados campos de cancerização (SLAUGHTER et al. 1953). De acordo com esse conceito, múltiplas lesões malignas poderiam ocorrer ao longo de toda a mucosa das vias aerodigestivas devido à sua exposição contínua a agentes carcinogênicos, como o tabaco.

Com a combinação de terapias, como cirurgia e radioterapia, houve melhora no controle local da doença, porém a taxa de sobrevida em 5 anos não mudou significativamente nos últimos 20 anos (RIES et al. 2006). Em muitos casos, tumores com mesmo estadiamento clínico e tratamento apresentam evolução diferente, sugerindo a necessidade identificar novos fatores que determinem o prognóstico do paciente (HALL et al. 1998; PARTRIDGE et al. 1999; SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000; GROOME et al. 2001; NUNES et al. 2001; OGI et al. 2002).

1.2 ALTERAÇÕES MOLECULARES EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

A carcinogênese é um processo de múltiplos passos, envolvendo deleção e amplificação cromossômica, perda de heterozigosidade e alteração de expressão de genes. As alterações moleculares clássicas em CECP são a amplificação ou expressão aumentada de ciclina D1 e EGFR, perda de expressão de p16 e mutações em p53. Além disso, a integração do

genoma do HPV nas células infectadas leva a alterações importantes na atividade de p53 e pRb (revisado em CHANG e CALIFANO 2008; ALMADORI et al. 2008; PALKA et al. 2008).

A ciclina D1 pertence a uma família de proteínas reguladoras de CDKs ou quinases dependentes de ciclinas. CDK4 e CDK6 formam complexos com a ciclina D1, os quais levam à progressão do ciclo celular da fase G1 para S (revisado em KNUDSEN et al. 2006). O complexo ciclina D1-CDK4/6 pode ser inibido por p16, cuja perda de heterozigosidade é freqüentemente observada em CECP (OHTA et al. 2009). p53 é uma proteína que atua na resposta a diferentes formas de estresse celular, através da regulação da expressão de genes de parada do ciclo celular, apoptose, senescência e reparo de DNA. Por isso, alterações na função de p53 estão diretamente associadas à instabilidade genômica. Mutações que inativam p53 ocorrem frequentemente em vários tipos de tumor, inclusive em carcinoma epidermóide (revisado em FERRIS e GRANDIS 2007).

Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) é um receptor de membrana com função tirosina-quinase que ativa as vias de MAPK, PI3K e Jak/STAT, levando a proliferação, sobrevivência celular, invasão e metástases. EGFR está mais expresso em carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e de outras topografias e por isso foi alvo para desenvolvimento de alguns medicamentos, como Cetuximab (anticorpo monoclonal), Lapatinib, Erlotinib e Gefitinib (inibidores da porção tirosina-quinase de EGFR) (revisado em CHANG e CALIFANO 2008). Cetuximab demonstrou eficácia CECP em ensaios clínicos de fase III, principalmente

em combinação com radioterapia (BONNER et al. 2006). Entretanto a eficácia está limitada a subgrupos de pacientes devido a algumas mutações em EGFR em CECP (SOK et al. 2006) e em outros pontos de sua via de sinalização, como k-Ras, descritos em câncer colorretal (LIÈVRE et al. 2006; KHAMBATA-FORD et al. 2007).

O HPV possui as oncoproteínas virais E6 e E7, que se ligam e inativam os supressores de tumor p53 e pRb, respectivamente, levando à transformação do epitélio (MUNGER e HOWLEY 2002). Tumores HPV-positivos demonstram perda de expressão de pRb e p21, expressão aumentada de p16, raras mutações em p53 (MUNGER et al. 1992; OLSHAN et al. 1997) e melhor resposta à quimio e radioterapia (DEWEESE et al. 1997).

1.3 EXPRESSÃO GÊNICA EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

Muitos estudos de marcadores moleculares têm utilizado a metodologia de cDNA *microarray* ou microarranjos de cDNA para identificar genes diferencialmente expressos ou perfis de expressão gênica para predição de recorrências e prognóstico em CECP (BELBIN et al. 2002; CROMER et al. 2004; GINOS et al. 2004; GIRI et al. 2006; CHUNG et al. 2006). Esses trabalhos ressaltaram genes relacionados a proliferação e sobrevivência celular, adesão e matriz extracelular, invasão e angiogênese.

Recentemente, RICKMAN et al. (2008) determinaram um quarteto de genes para predição de metástases a distância com acurácia de 79% em validação em amostras independentes. Os pacientes com assinatura molecular de metástase a distância poderiam então receber tratamentos mais agressivos ou serem encaminhados para terapia sistêmica (CROMER et al. 2004; GIRI et al. 2006). Empregando análise supervisionada, CHUNG et al. (2004) observaram que a casuística utilizada se dividia em 4 subgrupos segundo seu perfil de expressão gênica: assinatura de EGFR, assinatura semelhante a células mesenquimais, assinatura semelhante a epitélio normal e assinatura de enzimas anti-oxidantes. Assim, concluíram posteriormente que, devido à heterogeneidade dos tumores, possivelmente apenas pequenos subgrupos de pacientes se beneficiem de cada terapia (CHUNG et al. 2006).

Entretanto, um dos marcadores moleculares mais úteis na escolha do tratamento seria uma assinatura ou perfil de acometimento linfonodal. NAGATA et al. (2003) e SCHMALBACH et al. (2004) identificaram genes diferencialmente expressos em amostras de CECP de pacientes com metástases linfonodais, como genes relacionados à matriz extracelular, adesão celular, motilidade e inflamação. Os genes de maior expressão em experimentos de *microarray* com amostras de CECP com comprometimento linfonodal se localizam em regiões cromossômicas amplificadas associadas a mau prognóstico (WARNER et al. 2004). Os trabalhos mais completos nessa área são os de ROEPMAN et al. (2005) e O'DONNELL et al. (2005), que encontraram assinaturas preditoras de acometimento de linfonodos em

CE de cavidade oral e orofaringe validadas em amostras independentes. Apesar de promissores, os marcadores descritos acima ainda não foram incorporados à rotina e aguardam validação em estudos prospectivos multicêntricos.

Nos últimos anos, novas metodologias de análise de dados de *microarray* têm sugerido que alterações significativas na expressão gênica podem manifestar-se no âmbito de vias ou conjuntos de genes co-regulados (EISEN et al. 1998; MOOTHA et al. 2003; SEGAL et al. 2003, 2004). SEGAL et al. propôs um modelo probabilístico para identificar módulos funcionalmente coerente a partir de dados de expressão gênica de *Saccharomyces cerevisiae*. Em seguida, o autor utilizou amostras de diversos tipos de câncer para analisar o comportamento dos módulos ou grupos de genes que atuam conjuntamente para desempenhar determinada função, caracterizando os tumores através de um perfil de módulos ativos e inativos (SEGAL et al. 2004). O objetivo de encontrar genes de uma mesma via metabólica expressos conjuntamente é promover um maior entendimento de processos biológicos (SEGAL et al. 2003). Outra vantagem do método proposto por SEGAL et al. (2003, 2004) é não se basear em genes diferencialmente expressos, possibilitando a identificação de conjuntos de genes alterados em amostras heterogêneas, sendo que cada amostra pode contribuir com a ativação de uma parte do conjunto de genes.

Empregando a abordagem de análise de dados através de vias e módulos funcionais, um estudo do nosso grupo utilizando tecidos normais e alterados de esôfago e estômago identificou módulos com atividade alterada

em metaplasia e adenocarcinoma, como os relacionados ao metabolismo de lipídios e inflamação, revelando mecanismos importantes na gênese dessas doenças (GOMES et al. 2005).

2 JUSTIFICATIVA

O carcinoma epidermóide pode se originar em diferentes topografias de cabeça e pescoço. Apesar de particularidades anatômicas de cada topografia, o carcinoma epidermóide apresenta fatores etiológicos e morfologia semelhantes. Assim, como se originam do mesmo tecido, o estudo dos aspectos moleculares do CE nas diferentes topografias de cabeça e pescoço permite uma melhor compreensão da doença, possibilitando uma forma alternativa de classificação desses tumores.

Apesar dos esforços contínuos para o aprimoramento dos métodos de diagnóstico e tratamento, o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço ainda é uma doença que apresenta alguns obstáculos no seu manejo. Atualmente, a escolha do tratamento do CECP leva em conta principalmente achados histo-patológicos e radiográficos, mas esse sistema pode falhar em estratificar os pacientes de acordo com o risco de recorrências (DE BREE et al. 2000), uma vez que indivíduos com tumores clínicos e patologicamente semelhantes, que recebem o mesmo tratamento, apresentam respostas bastante heterogêneas (ALMADORI et al. 2008). Por exemplo, o estadiamento clínico dos linfonodos cervicais tem acurácia limitada e dessa forma, pacientes N0 e N+ podem ser hipo e hipertratados, respectivamente. Após o tratamento, pacientes pN+ apresentam prognóstico reservado. Enquanto uma parcela dos pacientes evoluem bem, sem desenvolver recorrências, cerca de 60 e 20% dos pacientes apresentam recidivas

locorregionais e metástases a distância, respectivamente (GENDEN et al. 2003).

Portanto, estudos moleculares representam uma oportunidade de direcionar o tratamento e aperfeiçoar o seguimento, a fim de diminuir a mortalidade e morbidade em pacientes de CECP. Utilizando amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço com histórico médico conhecido, é possível estudar a expressão de genes através de vias e módulos funcionais, identificando alterações relacionadas a diversos aspectos da doença, não só com a finalidade de compreensão da biologia do tumor mas também para determinar alterações relacionadas à progressão tumoral.

3 OBJETIVOS

1. Analisar a expressão gênica em carcinoma epidermóide de diferentes topografias de cabeça e pescoço:
 - ✓ comparar a expressão gênica em carcinoma epidermóide de cavidade nasal e seios paranasais, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe através da análise da expressão gênica global, assinaturas já publicadas, genes diferencialmente expressos, vias metabólicas e módulos funcionais com atividade alterada;
 - ✓ comparar a expressão gênica global em carcinoma epidermóide de das diferentes topografias de cabeça e pescoço com carcinoma epidermóide de outras topografias (esôfago, pulmão e colo de útero) e estudar os subgrupos de CECP obtidos.
2. Identificar alterações de expressão gênica relacionadas ao comportamento biológico do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço:
 - ✓ estudar a expressão gênica em amostras de CECP com acometimento linfonodal através de assinaturas já publicadas, genes diferencialmente expressos, vias metabólicas e módulos funcionais com atividade alterada;
 - ✓ estudar a expressão gênica em tumores “iniciais” (T1-2 N0) e “avançados” (T3-4 N+) através de genes diferencialmente

expressos, vias metabólicas e módulos funcionais com atividade alterada;

- ✓ estudar a expressão gênica em casos de CECP N+ com ou sem recidivas após o tratamento adjuvante através de assinaturas já publicadas, genes diferencialmente expressos, vias metabólicas e módulos funcionais com atividade alterada;
- ✓ estudar a expressão gênica em amostras de CECP “localizado” (N0, sem tratamento radioterápico e sem recidivas) e “colonizador” (N+ e/ou com recidivas) através de genes diferencialmente expressos, vias metabólicas e módulos funcionais com atividade alterada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONFECÇÃO DE LÂMINAS DE CDNA *MICROARRAY*

As lâminas de *cDNA microarray* utilizadas neste trabalho foram produzidas no Laboratório de Inflamação, do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, sob coordenação do Dr. Alex Fiorini de Carvalho. A lâmina ou plataforma possui 4.800 elementos ou *spots* contendo fragmentos de cDNA escolhidos dentre as sequências ORESTES (*Open Reading Frames Expressed Sequence Tags*) geradas no Projeto Genoma do Câncer (FAPESP/Ludwig) (DIAS NETO et al. 2000; CAMARGO et al. 2001). As ORESTES escolhidas atendem aos critérios estabelecidos por BRENTANI et al. (2005): os fragmentos correspondem a genes de sequências completas e conhecidas; as sequências não apresentam identidade maior que 85% quando comparadas a quaisquer fragmentos de 100 pares de bases do genoma humano; produzem um único alinhamento no genoma humano; correspondem à extremidade mais 3' do gene, mas sempre 5' ao primeiro sítio de poli-adenilação; e são maiores que 300 pares de bases.

Os clones bacterianos contendo as sequências ORESTES escolhidas foram cultivados em meio LB com ampicilina (100 mg/mL). O inserto foi amplificado por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) usando 1X Sanger PCR Buffer, 0,3 mM dNTP mix, 300 nM de oligonucleotídeos iniciadores Forward e Reverse M13, 3 unidade de Taq polymerase (Promega, EUA) e 2 µL de

cultura de bactéria, em volume final de 100 µL. A reação iniciou-se com incubação a 95°C por 5 minutos, 30 ciclos 95°C 30 segundos, 60°C 30 segundos, 72°C 1 minuto e etapa final de 72°C por 7 minutos. Uma alíquota do produto da reação foi fracionado em gel de agarose 1% para controle da amplificação. O restante foi purificado em coluna de gel-filtração Sephadex G50 (GE Healthcare, RU), precipitado em presença de 0,1 volume de acetato de sódio e 1 volume de isopropanol, e solubilizado em 50% DMSO. Alíquotas foram depositadas sobre lâminas de vidro silanizadas CMT-GAPS Coated Slides (Corning, EUA) com auxílio do robô Flexys (Genomics Solutions, EUA). Em seguida, as lâminas foram tratadas em luz ultravioleta e incubadas a 80°C por 2 horas.

4.2 COLETA DE AMOSTRAS

Este estudo foi realizado sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital AC Camargo. Foram coletadas amostras de tumores primários de carcinoma epidermóide, sem tratamento prévio de qualquer natureza. As amostras pertenciam ao Banco de Tumores do Projeto Genoma do Câncer e ao Banco de Tumores do Hospital AC Camargo, e estavam armazenadas em nitrogênio líquido ou a -140°C. Após a confirmação do tipo histológico, as amostras foram dissecadas manualmente pelo Dr. Hugo Campos, do Departamento de Anatomia Patológica, retirando tecido não tumoral, infiltrado inflamatório e necroses, de forma a obter um material com no mínimo 70% de tecido tumoral viável.

O levantamento dos dados clínicos e anatomopatológicos dos pacientes foi acompanhado pelo Dr. André Carvalho. As informações foram obtidas dos prontuários através dos registros das consultas no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (da data do diagnóstico até Outubro de 2008), no Departamento de Radioterapia (para tratamento adjuvante) e Avaliação préanestésica da cirurgia para remoção do tumor primário. Os dados foram armazenadas em um banco *on-line* desenvolvido pelo Laboratório de Biotecnologia do Hospital A.C. Camargo. Para verificar se as variáveis clínicas são aleatoriamente distribuídas frente às topografias de CP estudadas (cavidade nasal e seios paranasais ou CNSP, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe), foi utilizado o Teste do Qui-quadrado de Pearson ou Teste Exato de Fisher.

Tabela 1 - Amostras de Carcinoma Epidermóide utilizadas no estudo.

Localização topográfica	Quantidade
CNSP	7
Cavidade Oral	55
Orofaringe	35
Hipofaringe	6
Laringe	18
Esôfago	22
Pulmão	9
Útero	19
Total	171

Nos experimentos de *microarray*, todas as amostras foram comparadas contra uma referência comum, como proposto por POLLACK (2002), de modo a permitir comparações horizontais. Assim, a expressão de

cada gene de cada amostra foi calculada através da razão entre a intensidade do sinal na amostra sobre a intensidade do sinal na referência; e as amostras puderam ser comparadas entre si através da razão das razões. Segundo POLLACK (2002), a referência ideal seria aquela que produz um sinal mínimo em todos os elemento do *array*, além de ser facilmente produzida e reprodutível, não só no tempo mas também em diferentes laboratórios. Dessa forma, o que mais se aproxima da referência ideal seria um *pool* de RNA de linhagens celulares, como o utilizado na Universidade de Stanford (PEROU et al. 1999, 2000; ROSS et al. 2000). No presente estudo, um novo conjunto de 15 linhagens celulares foi escolhido, tomando o cuidado de selecionar tipos celulares equivalentes (Tabela 2). Todas as linhagens foram cultivadas no meio sugerido da ATCC (American Type Cell Collection, www.atcc.org), suplementados com 10% de soro fetal bovino. As linhagens foram mantidas a 37°C na presença de 5% de CO₂ até alcançarem 80-90% de confluência.

Tabela 2 - Linhagens celulares selecionadas para compor o RNA referência.

Nome	Tecido
Daudi	Linfoma de Burkitt
DLD-1	Adenocarcinoma de Cólon
DU 145	Carcinoma de Próstata
FaDu	Carcinoma Epidermóide de Faringe
GM 637	Fibroblasto Humano diplóide
H 146	Carcinoma de Pulmão
H 1080	Fibrossarcoma
HB4 α	Célula Luminal de Mama
HEK 293	Rim embrionário Humano
Jurkat	Leucemia Aguda de Células T
Saos-2	Osteossarcoma
SK-BR-3	Adenocarcinoma de Mama
SK-MEL-28	Melanoma
T24	Carcinoma de Bexiga
T98G	Glioblastoma

4.3 EXTRAÇÃO DE RNA E AMPLIFICAÇÃO

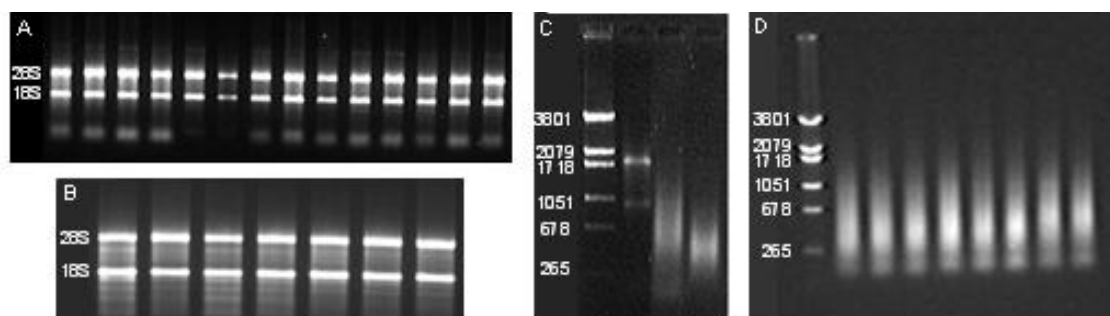
A extração de RNA total foi realizada pelo método do Trizol (Invitrogen, EUA) com auxílio do homogenizador Polytron (Kinematica AG, Suíça) ou com RNeasy Midi Kit (Quiagen, Alemanha) (linhagens GM 637 e H 146). A qualidade do RNA foi avaliada através de leitura de absorbância nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nm em espectrofotômetro (ND-1000, NanoDrop, EUA) e de fracionamento em gel de agarose 1% sob condições desnaturantes (Figura 2b).

O protocolo de amplificação baseou-se no método de Eberwine, descrito por VAN GELDER et al. (1990), onde o RNA total de cada amostra é submetido à transcrição reversa na presença de oligo-(dT)-T7 (que possui

a sequência promotora da T7 RNA polimerase). Em seguida, o RNA é parcialmente digerido, originando iniciadores para a síntese da segunda fita de cDNA, que ocorre com Polimerase I. A fita dupla de cDNA é então submetida à transcrição *in vitro* dirigida pela enzima T7 RNA polimerase e o RNA amplificado resultante é purificado.

A transcrição reversa iniciou-se com 3 µg de RNA total de cada amostra e 0,5 µg de oligo-dT₂₄-T7 (que possui a sequência promotora da T7 RNA polimerase) (Integrated DNA Technologies IDT), que foram desnaturados a 70°C por 10 minutos e mantidos em gelo. Após o anelamento do oligo, a reação foi realizada em 6 mM MgCl₂, 1mM dNTP mix (Eppendorf, Alemanha), 1X First Strand Buffer, 20 unidades de RNasin e 1 µL de Improm II (Promega, EUA), em volume final de 20 µL a 42°C por 2 horas. A síntese da segunda fita ocorreu a 0,2 mM dNTP mix (Eppendorf, Alemanha), 1X Second Strand Buffer, 0,6 unidades de RNase H (USB Corporation, EUA), 5 unidades de Ligase (New England Biolabs, EUA) e 10 unidades de DNA Pol I (Invitrogen, EUA), a 16°C por 2 horas. A dupla fita de DNA foi completada adicionando 5 unidades de T4 DNA Pol (Invitrogen, EUA) e incubando a 16°C por 10 minutos. Após extração por fenol/clorofórmio, a transcrição *in vitro* a partir do sítio da T7 RNA polimerase foi realizada com o *kit* RiboMax (Promega, EUA): 7,5 mM rNTP mix, 1X Reaction buffer e 2,5 µL de Enzyme mix em volume final de 25 µL. O RNA amplificado (aRNA) foi purificado usando TRIzol (Invitrogen, EUA) e sua qualidade é verificada como já descrito acima (Figura 2d).

Quantidades iguais do RNA total das linhagens que compõem o RNA referência (Figura 2a) foram misturadas e o RNA referência foi amplificado em dois ciclos (Figura 2c), onde o segundo ciclo se inicia com iniciadores pd(N)₆ (GE Healthcare, RU).



Legenda - A - RNA total de linhagens do RNA referência Daudi, DLD-1, DU 145, FaDU, GM 637, H 146, H 1080, Jurkat, Saos-2, SK-BR-3, SK-MEL-28, T24, T98G, RNA referência. B - RNA total de amostras de CE. C – RNA referência total, amplificado do 1º e 2º round. D – RNA amplificado de amostras tumorais. Em A e B estão indicadas as subunidades de RNA ribossômico 28S e 18S. Em C e D, o padrão de tamanho molecular apresenta o tamanho de fragmentos de DNA dupla fita em pares de bases. As amostras foram fracionadas em gel de agarose 1% sob condições desnaturantes.

Figura 2 - Eletroforese em gel de agarose de RNA total e amplificado de amostras de Carcinoma Epidermóide e linhagens celulares do RNA referência.

4.4 SÍNTESE DO CDNA MARCADO, HIBRIDIZAÇÃO E CAPTURA DOS DADOS

O RNA amplificado das amostras de CECF e do RNA referência foram utilizados na síntese de cDNA marcado pela incorporação indireta de fluoróforos Alexa 555 e Alexa 647 (Molecular Probes, EUA), baseado no protocolo descrito por DE RISI (2002). Nesse protocolo o RNA amplificado é

submetido à transcrição reversa na presença de iniciadores pd(N)₆, transcriptase reversa e *aminoallyl*-dUTP. Após a hidrólise alcalina do RNA, ocorre o acoplamento dos fluoróforos ao *aminoallyl*. O produto é purificado e a eficiência da marcação é verificada em espectrofotômetro. Assim, 3 µg de RNA amplificado e 10 µg de iniciadores pd(N)₆ (GE Healthcare, RU), foram desnaturados a 70°C por 10 minutos e mantidos em gelo. A transcrição reversa ocorreu em presença de 6 mM MgCl₂, 0,5 mM dNTP mix Low T (0,5 mM de dCTP, dGTP e dATP; 0,2 mM de dTTP) (Eppendorf, Alemanha) com 0,3 mM Aminoallyl-dUTP (Sigma-Aldrich, EUA), 1X *Fisrt Strand Buffer*, 20 unidades de RNasin e 1 µL de Improm II (Promega, EUA), em volume final de 20 µL, a 42°C por 2 horas. O aRNA foi degradado com 0,42 M NaOH e 14 mM EDTA a 70°C por 10 minutos. Após precipitação com etanol e acetato de sódio, 3 µg de cDNA foram marcados com Alexa Dye 555 ou 647 (Invitrogen, EUA) e purificado com o *kit* QIAquick PCR Purification (Qiagen, Alemanha).

Após a eficiência da marcação ser verificada em espectrofotômetro (ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop, EUA) amostra e referência foram misturadas e transferidas para um tubo contendo 4 µg de poli(A) DNA (Amersham Biosciences, EUA), 2 µg de Cot-1 DNA (Invitrogen, EUA), 10 µg de DNA de esperma de salmão (Amersham Biosciences, EUA), 5X SSC, 5X de solução Denhardt's, 0,1% SDS, 50% formamida, e desnaturados a 95°C por 5 minutos. A mistura foi hibridizada a 42°C durante 16-18 horas na estação Gene TAC Hybridization Station (Genomic Solutions, RU), utilizando as lâminas descritas pré-tratadas em 5X SSC, 0,2% SDS, 1% BSA e 5X

Denhardt's durante 6 ou mais horas a 42°. Após a hibridização, as lâminas foram lavadas sob agitação a 42°C em 2X SSC 0,1% SDS por 4 minutos, 0,1X SSC 0,1% SDS 4 minutos e 0,1X SSC por 4 minutos. As imagens foram digitalizadas com auxílio de *scanner a laser* confocal ScanArray Express Microarray Scanner (Packard Biosciences, EUA) e a quantificação dos dados foi realizada com o software ScanArray Express Microarray Scanner (Packard Biosciences, EUA), utilizando o método do histograma.

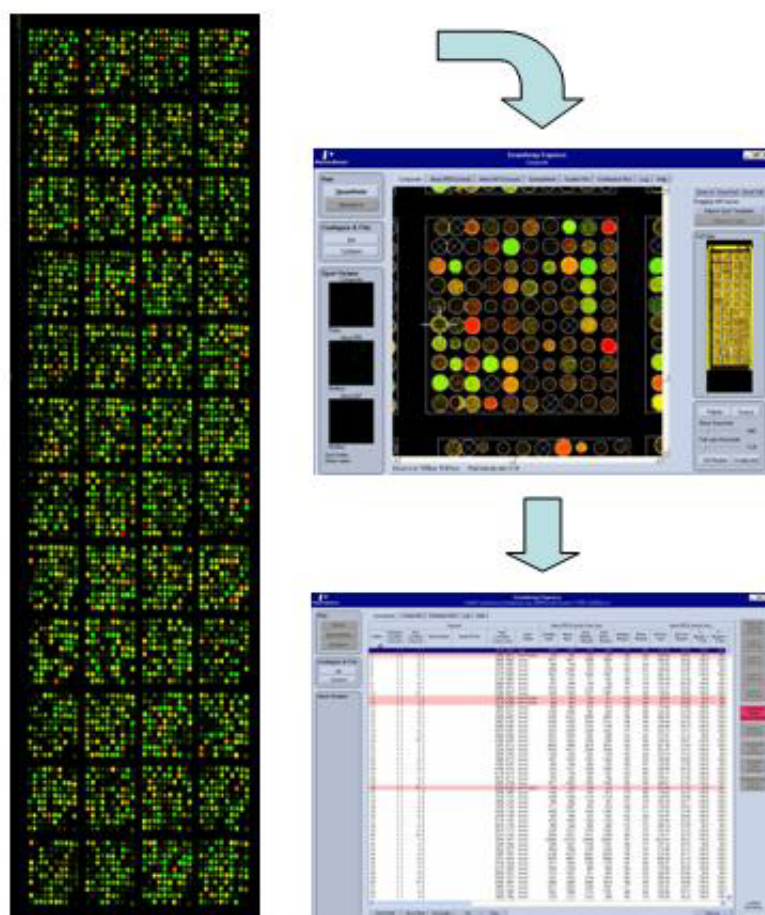


Figura 3 - Imagem digitalizada obtida após o experimento de *microarray* e quantificação dos dados.

4.5 ANÁLISES DOS DADOS

A análise matemática e estatística dos dados foi realizada em colaboração com Dra. Helena Brentani, do Laboratório de Biotecnologia do Hospital do Câncer, e com o grupo do Dr. Eduardo J. Neves, do Instituto de Matemática e Estatística da Universidade de São Paulo.

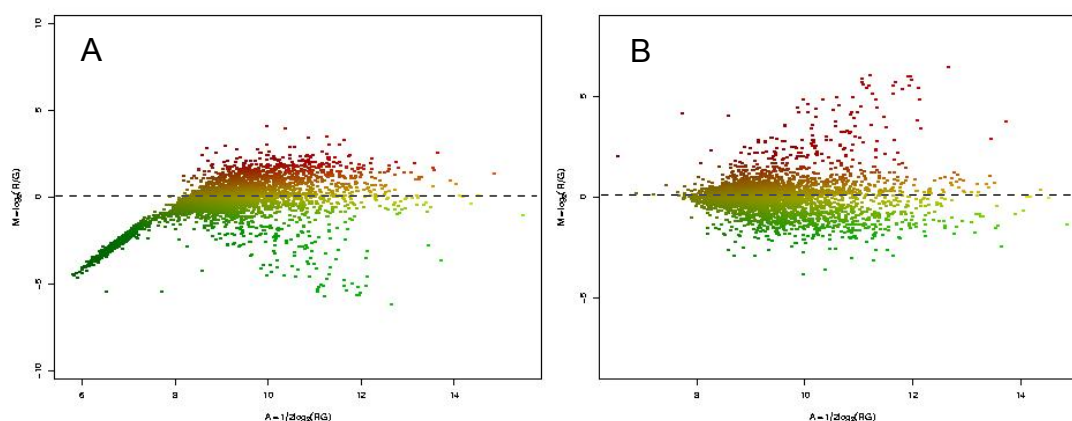
Inicialmente os dados foram submetidos a um controle de qualidade dos dados gerados, realizado pelo Laboratório de Biotecnologia. Essa etapa avalia reprodutibilidade e possíveis variações nos experimentos introduzidas na confecção das lâminas e por manipulação, artefatos e corantes.

Para avaliar a qualidade de manufatura das lâminas foi elaborado um *boxplot* com 48 caixas, onde cada caixa mostra a distribuição da razão Alexa 647/Alexa 555 dos *spots* de um dos 48 quadrantes de uma lâmina, representando então a distribuição dos *spots* desenhados por uma mesma agulha do robô em uma caixa.

A fim de avaliar a reprodutibilidade dos experimentos de *microarray*, para cada duplicata (lâmina *main* com amostra marcada com Alexa 555 e referência com Alexa 647 e lâmina *swap* com os corantes invertidos) foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson, que reflete o grau de semelhança, ou mais especificamente, de relação linear entre as duas lâminas.

Em seguida, o tratamento dos dados foi realizado pelo grupo do Dr. Eduardo Neves. Elementos com sinal menor ou igual ao *background* são eliminados. O *background* é subtraído dos elementos restantes e os dados

gerados pelos fluoróforos Alexa 555 e 647 são normalizados, visando corrigir tendências introduzidas por variações experimentais intensidade-dependentes e variações aleatórias, incorporação ou fluorescência diferentes dos corantes. Para isso, foi empregado o método não linear de Loess (Locally Scatter-plot Smoothing).



Legenda - Distribuição dos dados de uma lâmina de *microarray* não normalizados (A) e normalizados pelo método não linear de Loess (B). A média de intensidade de fluorescência dos *spots* está representada na abscissa e na ordenada, a razão Alexa 647/Alexa 555.

Figura 4 - Normalização dos dados de *microarray*.

Para iniciar a análise da biologia dos tumores, foi elaborado um agrupamento ou *cluster* hierárquico não-supervisionado, utilizando distância euclidiana completa, a fim de avaliar a expressão gênica global.

Para verificar o poder de classificação de assinaturas moleculares já publicadas, foram identificados os genes comuns à plataforma utilizada no presente estudo e às assinaturas descritas em CHUNG et al. (2004), ROEPMAN et al. (2005, 2006) e RICKMAN et al. (2008). Com os genes identificados, foram construídos agrupamentos hierárquicos não supervisionados.

Para identificar genes diferencialmente expressos foi empregado o teste não paramétrico de Wilcoxon, com correção por False Discovery Rate (FDR), quando aplicável. Os genes diferencialmente expressos foram ainda utilizados para identificar vias preferencialmente representadas através da ferramenta Pathway Express (KHATRI et al. 2002; DRAGHICI et al. 2003).

As vias e módulos funcionais alterados foram identificados também através da metodologia descrita por SEGAL et al. (2004) com modificações (GOMES et al. 2005). O método de módulos funcionais é baseado no conhecimento biológico dos genes e não visa a identificação de genes diferencialmente expressos. Os genes presentes na lâmina de *microarray* são classificados em funções ou vias, conforme descrito no KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) (KANEHISA e GOTO 2000; KANEHISA et al. 2006, 2008), Gene Ontology (ASHBURNER et al. 2000) e GeneDeck (RON et al. 2005). Em uma dada comparação, a média de expressão de cada gene é calculada considerando todas as amostras utilizadas na comparação. Para cada lâmina, é calculada a diferença entre a expressão de cada gene e a respectiva média. Os genes com diferença maior que 1 e menor que -1 são discretizados em +1 e -1, respectivamente. Os valores entre 1 e -1 são marcados como 0. Em cada lâmina, é avaliado através da distribuição hipergeométrica se cada módulo apresenta uma distribuição de +1, -1 e 0 diferente em relação à lâmina em que está contido. Assim, os módulos são classificados em cada lâmina como ativos, inativos ou inalterados. Em seguida é avaliado, para cada módulo, se um subgrupo de amostras apresenta distribuição de ativo, inativo e inalterado diferente do

total das amostras. É calculado p-valor para cada gene através de *bootstrap*. Assim, o módulo é classificado em ativo, inativo ou inalterado no subgrupo estudado. Entretanto, não se pode considerar o módulo biologicamente ativo ou inativo, pois os genes que contribuíram para a alteração podem ser tanto estimuladores como inibidores da via.

4.6 PCR QUANTITATIVA

Genes pertencentes a vias e módulos alterados e genes normalizadores foram selecionados para experimentos de PCR quantitativa.

Para a síntese de cDNA, foi adicionado 0,5 µg de oligo-dT₁₅ a 2 µg de RNA total em volume final de 5 µl e incubado a 70°C por 10 minutos e resfriamento em gelo para anelamento do oligo. A transcrição reversa ocorreu a 3 mM MgCl₂, 1 mM dNTP mix (Eppendorf, Alemanha), 1X 1st Strand Buffer, 20 unidades de RNasin e 1 µL de Improm II (Promega, EUA) no volume final de 20 µl a 42°C por 1 hora, seguido de incubação a 70°C por 15 minutos. A eficácia da reação foi avaliada através de uma reação de PCR comum para o gene da β-actina e o produto foi fracionado em gel de agarose 1%. Alíquotas do cDNA obtido foram diluídas 10 vezes e armazenadas.

Oligonucleotídeos iniciadores ou *primers* para os genes selecionados foram desenhados através do *software* Primer Express 3.0 (Applied Biosystems) (Tabela 3), utilizando como parâmetros conteúdo de citosina-guanina entre 30 e 80%, temperatura de anelamento entre 58°C e 60°C,

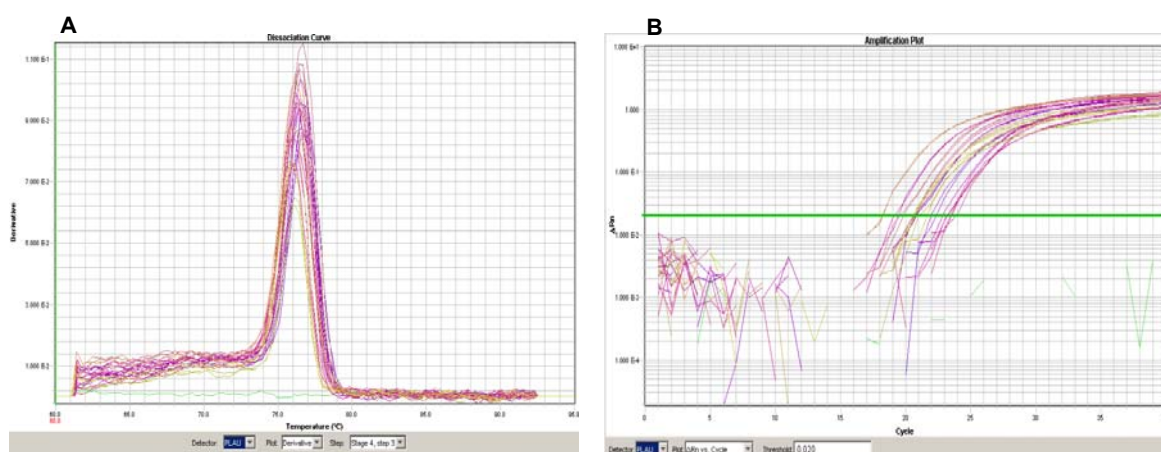
iniciadores que não possuísem capacidade de anelamento entre si ou de formar estrutura secundária e *amplicon* de 50 a 150 pares de base. Além desses parâmetros, os iniciadores foram desenhados em éxons diferentes, evitando a possibilidade de amplificação simultânea a partir de DNA genômico contaminante de amplicon de mesmo tamanho do obtido a partir do transcrito. Foram escolhidos éxons comuns às variantes de *splicing* alternativo e localizados na extremidade 3' do gene para garantir maior representatividade de todos os transcritos.

Todas as reações de padronização assim como as reações para medir a expressão gênica nas amostras estudadas foram realizadas em duplicata com 1X SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 1 µL de cDNA diluído 10 vezes (exceto curva padrão) e os iniciadores na concentrações selecionadas, em volume final de 20 µL. Para os controles negativos de cada iniciador foi utilizado água estéril da mesma alíquota utilizada para completar o volume da reação de amplificação. As reações foram realizadas no termociclador ABI Prism® 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems), a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C 15 segundos e 60°C 1 minuto, e finalizando com a curva de dissociação realizada a 95°C 15 segundos, 60°C 15 segundos e 95°C 15 segundos.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos iniciadores utilizados em reações de PCR quantitativa dos genes normalizadores e genes selecionados na análise de vias e de módulos alterados em Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço.

Gene	Sequência do iniciador FW	Sequência do iniciador RV	Concentração final (nM)	Eficiência
AKT1	TCACGGCCCAGATGATCAC	TCCACACACTCCATGCTGTCA	100	2,03
AREG	CGACAAGAGAATGGAAATGTACATG	TTATGGCTATGACTTGGCAGTGA	100	1,86
BCR2	CCTTCGACGTCAATAACAAGGA	CCTGCGATGGCGTTCAC	200	1,97
BST2	AGCGCTCTGCTGCAGTGA	AGGACGGACCTTCCAAGATGT	400	1,85
CCL20	TCCAAACAGACTTGCGTGAAA	CCATTCCAGAAAAGCCACAGTT	100	2,11
EGFR	TCAGTGGCGATCTCCACATC	GGAGGAGTATGTGTGAAGGAGTCA	100	2,02
EGLN3	AGAAGCCAAAAAGAAATTCAGGAA	GAGCACGGTCAGTCTTCAGTGA	100	1,84
FOSB	GAACGAAATAAACTAGCAGCAGCTAA	TTTTCTTCCTCCAAGTATCTGTCT	100	1,94
HBMS	GGCAATGCGGCTGCAA	GGGTACCCACGCGAATCAC	100	1,96
HPRT1	CCCACGAAGTGTGGATATAAGC	GGGCATATCCTACAACAACTTGTC	400	1,88
IL1B	TCCTGCGTGTTGAAAGATGATAA	TTGGGTAATTTTTGGGATCTACACT	100	1,85
IL1F9	AACAGCCCACATTGCAGCTAA	GCTCGGGTTGGCCATACA	200	1,88
INHBA	GGAGCAGACCTCGGAGATCA	CAGCGTCTTCCTGGCTGTTC	25	2,27
KLK6	TGAGAAGTACGGAAGGATTCC	TCGGAGGTGGTCTCCACATAC	100	1,87
MCM2	CACACAGAAGTTCAGCGTCATG	AATGAAAGGTAGCGGGCAA	200	1,92
MYC	CACCACCAGCAGCGACTCT	TTCCACAGAAACAACATCGATTTTC	100	2,05
PCNA	TTCAACGGTGACACTCAGTATGTCT	TCCCATATCCGCAATTTTATACTCT	100	1,93
PLAU	TGGCACAAGCTGTGAGATCAC	CAGCTGCTCCGGATAGAGATAGTC	200	1,94
POSTN	AAGAGACACGAGAAGAACGAATCA	TCTGTTTCTCCACCTCCAGTAGAA	200	2,02
SERPINA3	TGCTCCCAGAGACCCTGAAG	TTTGGCAGGTAGAGCTCACCTAT	200	1,93

Após o término da reação, a qualidade dos dados foi analisada através do *software* SDS 2.3 (Applied Biosystems). As curvas de dissociação foram analisadas quanto à amplificação de DNA genômico, dímeros de iniciadores e variantes de *splicing*. Com auxílio das curvas de amplificação ou *amplification plot*, foi ajustado na fase exponencial do gráfico o *threshold* ou limiar de intensidade de fluorescência na qual foram tomados os valores de ciclos ou Ct (*cycle threshold*) de cada reação. As reações apresentaram curva de dissociação do *amplicon* e de amplificação conforme o exemplo a seguir (Figura 5), onde não se observa amplificação inespecífica e é possível estabelecer uma mesma linha de Ct adequada para toda a placa, respectivamente. Foram consideradas aceitáveis duplicatas com desvio padrão menor que 0,5.



Legenda - A. Curva de dissociação do *amplicon* gerado com iniciadores do gene PLAU. Na abscissa está representada a temperatura. Na ordenada está representada a intensidade de fluorescência. B. Curva de amplificação de amostras com iniciadores do gene PLAU. Na abscissa estão representados os ciclos de amplificação. Na ordenada está representada a intensidade de fluorescência.

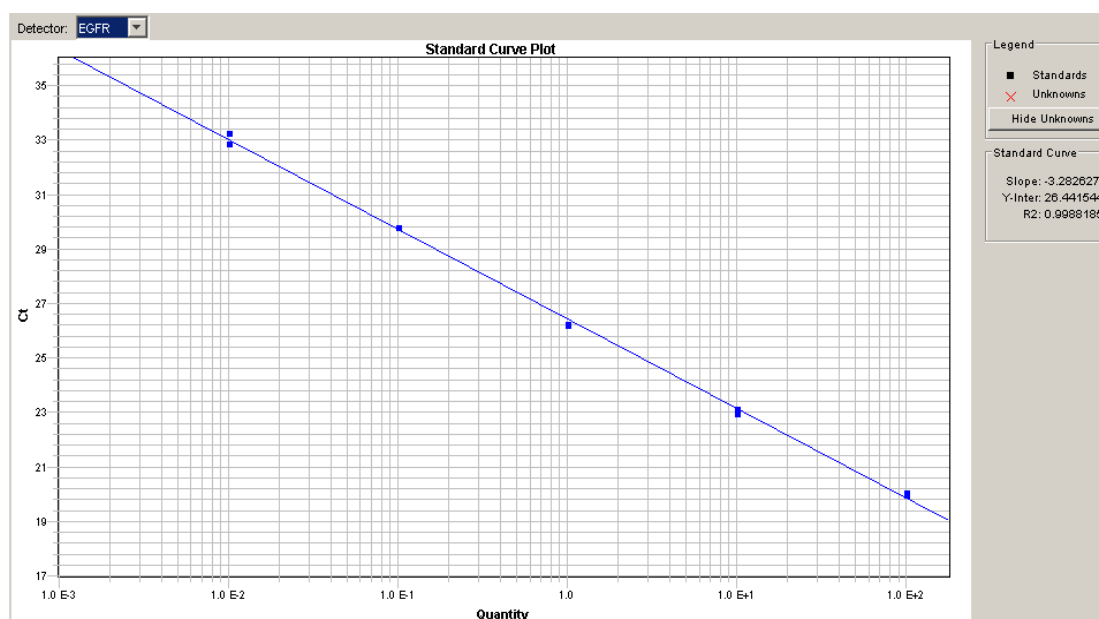
Figura 5 - Curvas para análise de resultados de amplificação das reações de PCR quantitativa.

As reações de amplificação foram padronizadas inicialmente variando a concentração de iniciadores com reações de concentração final de 400, 200 e 100 nM (ou menor em alguns casos) e os produtos foram fracionados em gel de acrilamida 8% (Figura 6). Foi escolhida a concentração mais adequada para cada par de iniciadores considerando-se menor Ct, a maior intensidade da banda no gel e a ausência de dímeros de iniciadores.



Figura 6 - Produto de PCR quantitativa fracionado em gel de acrilamida 8% obtido em reações com 400, 200 e 100 nM dos iniciadores dos genes INHBA e MCM2.

Em seguida foram realizadas reações para determinar a eficiência de amplificação de cada par de iniciadores. Para isso foi construída uma curva padrão utilizando quantidades decrescentes de cDNA, obtidas diluindo seriadamente 10 vezes a cada etapa (1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000) (Figura 7). A inclinação ou *slope* (*S*) da curva foi utilizado para o cálculo da eficiência segundo a fórmula proposta por RASMUSSEN et al. (2001), onde $\text{Eficiência} = 10^{1/S}$.



Legenda - Curva construída com o resultado de reações de PCR quantitativa para o gene EGFR. Na abscissa estão representadas quantidades decrescentes de cDNA de RNA referência (obtidas diluindo 10 vezes seriadamente). Na ordenada estão representados os valores de Ct (*cycle threshold*). No canto direito superior, o *software* fornece o *Slope* ou inclinação da curva.

Figura 7 - Curva padrão de reações de PCR quantitativa.

As reações de PCR quantitativa foram realizadas para as amostras utilizadas nos experimentos de *microarray* e em cada placa foi incluído o RNA referência. Para os genes normalizadores (BCR2, HMBS e HPRT) foi calculado a diferença entre Ct_{ref} e $Ct_{amostra}$. Os valores obtidos foram utilizados para o cálculo do fator de normalização através do *software* GeNorm (VANDESOMPELE et al. 2002). A expressão relativa dos genes selecionados foi calculada baseando-se na fórmula proposta por PFAFFL (2001), adicionando-se o fator de normalização:

$$\text{Expressão}_{\text{amostra}} = \frac{(\text{Ct}_{\text{REF}} - \text{Ct}_{\text{amostra}}) \times \text{Eficiência}_{\text{gene-alvo}}}{\text{Fator de normalização}}$$

A expressão relativa dos genes selecionados nos grupos com acometimento linfonodal (item 5.4.1) e com recidivas (item 5.4.3) foram comparados através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E ANATOMO-PATOLÓGICOS DOS PACIENTES DE CEC

Os dados clínicos e anátomo-patológicos dos pacientes portadores de CEC foram coletados dos prontuários médicos (vide resumo na Tabela 4) e analisados quanto à sua distribuição nas cinco topografias de cabeça e pescoço, utilizando o Teste Exato de Fisher e o Teste do Qui-quadrado de Pearson (Tabela 5). Isso permite analisar se cada topografia apresenta a mesma proporção de consumidores de álcool, tabaco, comprometimento linfonodal, etc., evitando que, ao comparar duas topografias, sejam encontradas diferenças decorrentes das características clínico-patológicas, ao invés das diferenças entre topografias.

Foi observado que consumo de álcool é menos freqüente em cavidade oral. Há menor freqüência de amostras pouco diferenciadas entre os casos de CEC de cavidade oral e laringe. As amostras de CEC apresentam menos invasão perineural e comprometimento linfonodal (Figura 8).

Tabela 4 - Dados clínicos e anátomo-patológicos dos pacientes portadores de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço.

	% dos pacientes		% dos pacientes
Idade (anos)		Topografia	
23-30	2	CNSP	6
31-40	2	Cavidade oral	45
41-50	16	Orofaringe	29
51-60	32	Hipofaringe	5
61-70	29	Laringe	15
71-80	12		
81-89	5	Tamanho do tumor	
		pT1	8
Sexo		pT2	23
Feminino	21	pT3	21
Masculino	79	pT4	45
Consumo de tabaco		Comprometimento linfonodal	
Não consumidor	23	pN0	25
Consumidor	52	pN+	62
Ex-consumidor (pelo menos 1 ano)	25	não esvaziado	13
Consumo de álcool		Extravasamento capsular	
Não consumidor	40	Sem extravasamento	17
Consumidor	35	Com extravasamento	31
Ex-consumidor (pelo menos 1 ano)	25	Não se aplica/não informado	52

Recidivas		Grau de diferenciação	
Sem recidiva em 2 anos	44	Bem diferenciado	45
Com recidiva	39	Moderadamente diferenciado	46
Indeterminado	17	Pouco diferenciado	7
Recidiva local		Invasão Vascular	
Recidiva regional	16	Sem invasão	83
Metástase a distância	17	Com invasão	12
		Não informado	4
Segundo tumor primário	12		
Sobrevida após a cirurgia		Invasão Perineural	
até 1 ano	28	Sem invasão	53
1 a 2 anos	21	Com invasão	43
2 a 3 anos	7	Não informado	4
3 a 4 anos	12		
4 a 5 anos	6	Radioterapia Adjuvante	
mais de 5 anos	26	Não realizou	31
		Realizou	69
<i>Status</i>			
Vivo sem câncer	34		
Vivo com câncer	3		
Óbito pelo câncer	32		
Óbito por outras causas	27		
Perdido de vista	3		

Tabela 5 - Homogeneidade da distribuição das variáveis clínicas dentre os casos de Carcinoma Epidermóide das cinco topografias de Cabeça e Pescoço (CNSP, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe).

Variável	Teste Exato de Fisher (p-valor)	Teste do qui-quadrado de Pearson (p-valor)
Idade	0,566	0,421
Consumo de tabaco	0,085	0,094
Consumo de álcool	0,028	0,033
Grau de diferenciação	0,003	0,007
Invasão vascular	0,088	0,195
Invasão perineural	0,032	0,088
Comprometimento linfonodal	9,97E-5	4,79E-7
Extensão Extracapsular	0,343	0,257
Recidivas	0,598	0,660

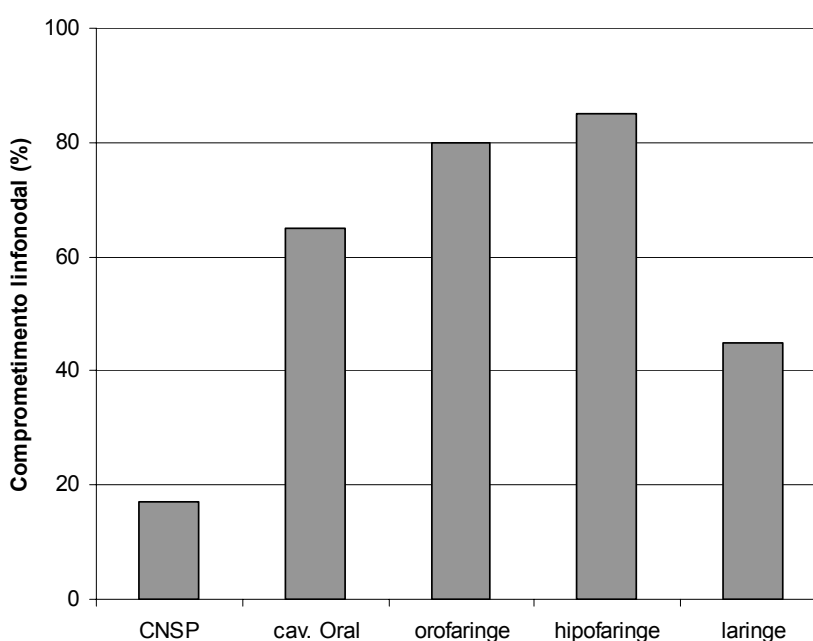


Figura 8 - Frequência de comprometimento linfonodal nos casos de Carcinoma Epidermóide de CNSP, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe.

5.2 ANÁLISE DE QUALIDADE DOS DADOS DE MICROARRAY

Os dados de microarray foram analisados quanto sua qualidade em relação à confecção da lâmina e à reprodutibilidade da hibridização em duplicata.

Para cada lâmina, a razão Alexa 647/Alexa 555 foi representada em um *boxplot*, onde cada caixa representa a distribuição dos elementos depositados por uma mesma agulha do robô. Todas as lâminas apresentaram um *boxplot* semelhante ao exemplo abaixo, onde não se observa nenhum erro sistemático, seja provocado por problemas de deposição ou de hibridização.

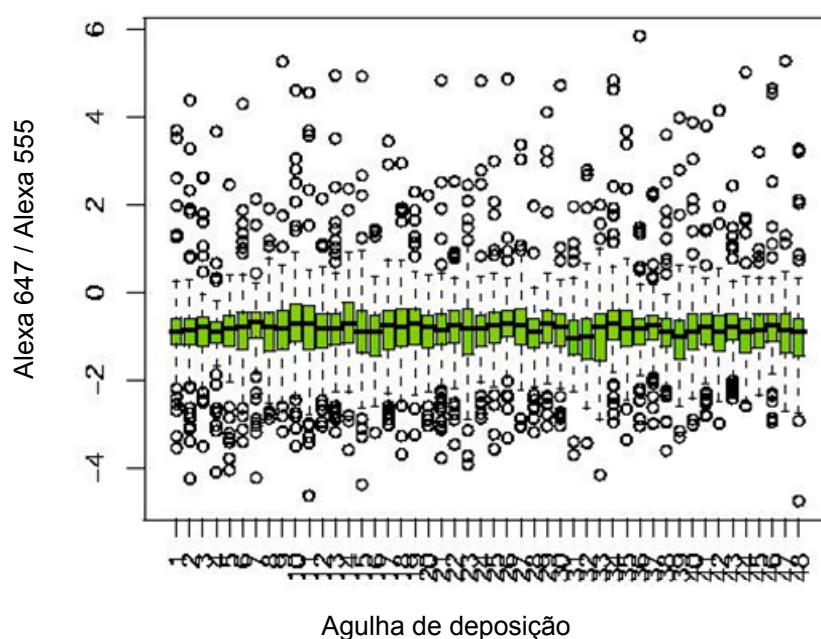
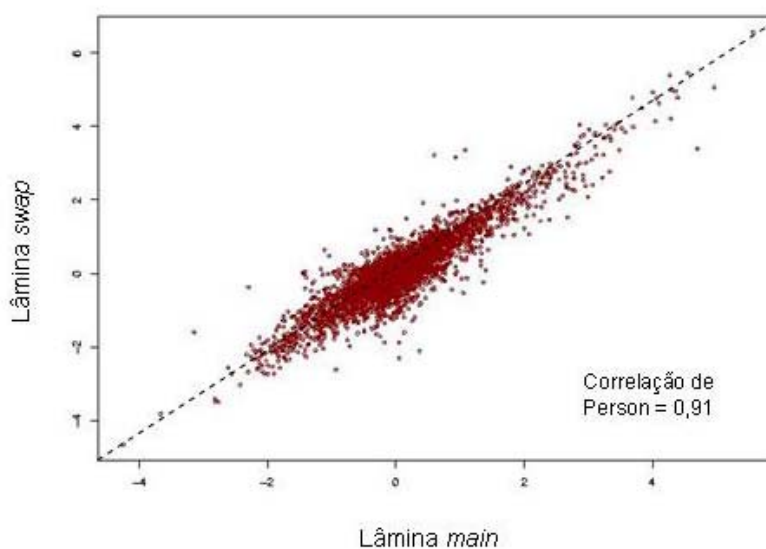


Figura 9 - Distribuição da razão do sinal de Alexa 647/Alexa 555 para cada um dos 48 quadrantes de uma lâmina de *microarray*.

A fim de avaliar a reprodutibilidade dos experimentos de *microarray*, para cada duplicata foi calculado o coeficiente de correlação de Pearson, que reflete a relação linear entre as réplicas. A média e mediana para as 171 amostras foi 0,90, com desvio padrão de 0,04.



Legenda - A lâmina *main* contém a amostra marcada com Alexa 555 e a referência marcada com Alexa 647. A lâmina *swap* foi realizada com inversão dos corantes da amostra e referência. Em cada eixo está representada a razão Alexa 647/Alexa 555 de todos os elementos de uma lâmina.

Figura 10 - Correlação entre os dados de duplicatas de lâminas de *microarray*.

5.3 ASPECTOS MOLECULARES DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE EM DIFERENTES TOPOGRAFIAS

5.3.1 Comparação do carcinoma epidermóide das cinco topografias de cabeça e pescoço

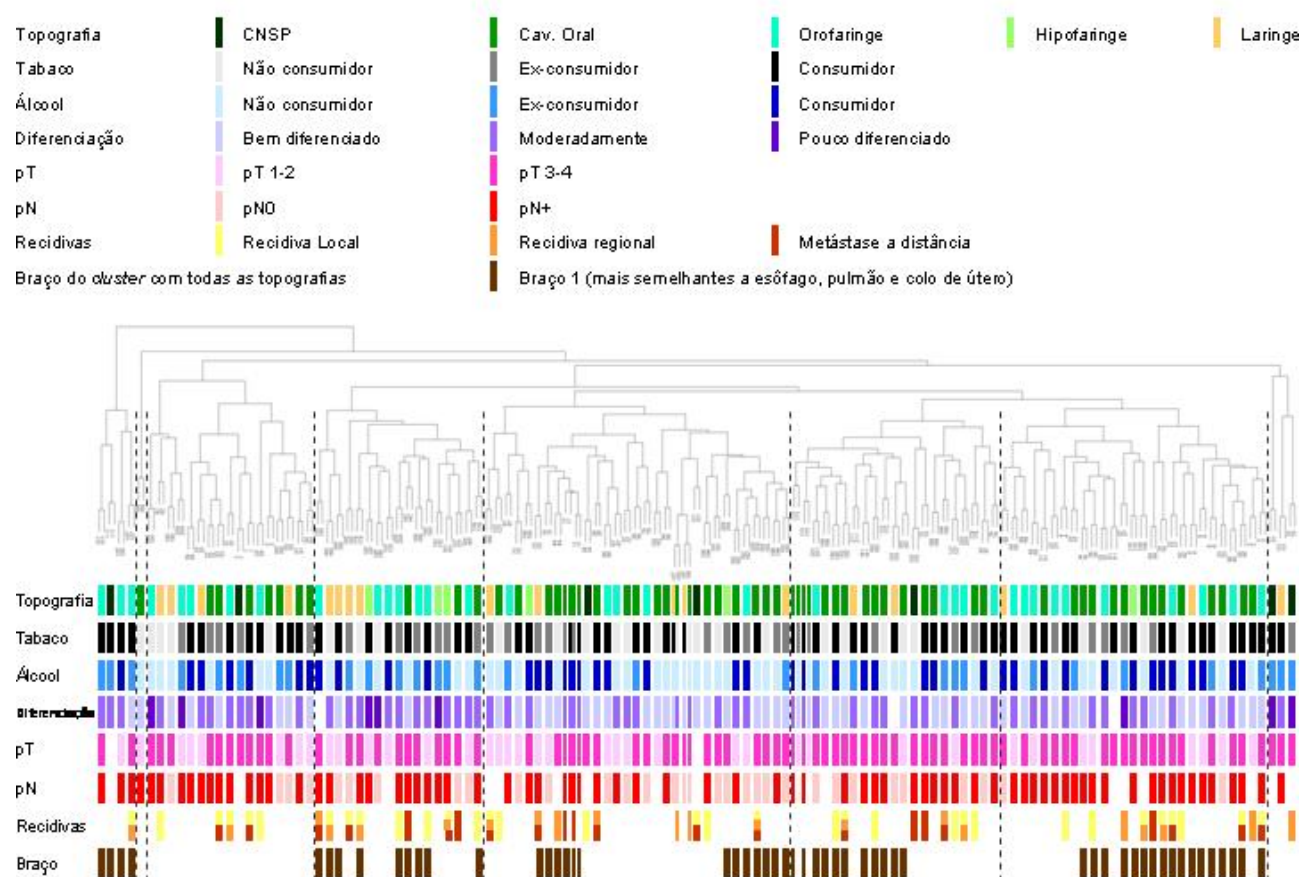
A fim de avaliar a expressão gênica global de um tumor de mesma origem histológica mas que se manifesta em diferentes topografias, os dados de expressão de todos os genes representados na lâmina das 121 amostras de CECp foram empregados na construção de um *cluster* ou agrupamento hierárquico, não supervisionado, com distância euclidiana completa (Figura 11). As amostras de CECp parecem não se agrupar de acordo com a topografia, informações clínicas (consumo de tabaco, álcool, diferenciação pT, pN e recidivas) ou variáveis experimentais (lote de lâmina ou reagentes).

Os genes do perfil de expressão “intrínseco” descrito por CHUNG et al. (2004) que se encontravam na plataforma utilizada nesse estudo (67 genes) foram empregados na construção de um agrupamento hierárquico não supervisionado. O trabalho demonstra a classificação de amostras de CECp em 4 tipos, porém tal classificação não pode ser reproduzida na plataforma e nas amostras aqui utilizadas (Figura 12).

Para analisar cada gene independentemente, os dados de expressão gênica das topografias foram comparados, dois a dois, utilizando o teste de Wilcoxon e correção por FDR (Tabelas 6 e 7). Dentre os cerca de 4.600

genes, foi encontrada expressão diferencial apenas quando comparadas amostras de cavidade oral e orofaringe.

Para estudar a biologia dos tumores de diferentes topografias de cabeça e Pescoço, foi utilizada a metodologia de módulos funcionais, que identificou módulos ativos e inativos em cavidade nasal e seios paranasais, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe (Tabela 8).



Legenda - Agrupamento hierárquico não supervisionado construído com dados de expressão gênica de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço. Abaixo do cluster estão representados dados dos respectivos casos.

Figura 11 - Expressão gênica global e dados clínicos e anátomo-patológicos de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço.

Tabela 6 - Quantidade de genes diferencialmente expressos entre as cinco topografias de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço. Os genes diferencialmente expressos apresentam p-valor menor que 0,05, calculado através do teste de Wilcoxon e correção por FDR.

Topografia	CNSP	Cavidade Oral	Orofaringe	Hipofaringe
Cavidade Oral	0			
Orofaringe	0	6		
Hipofaringe	0	0	0	
Laringe	0	0	0	0

Tabela 7 - Genes diferencialmente expressos entre amostras de Carcinoma Epidermóide de Cavidade Oral e Orofaringe. *Fold* representa a razão de expressão cavidade oral/orofaringe. O p-valor se refere ao obtido através do teste de Wilcoxon e correção por FDR.

Gene	<i>Fold</i>	p-valor	Função
EDN3	-1,2927	0,007	diferenciação da crista neural
KRTCAP3	1,4336	0,0078	proteína associada a queratinócitos
HMGB2	1,6402	0,0108	flexibilidade do DNA para aproximar elementos em <i>cis</i>
LRRC48	-1,1003	0,0152	função desconhecida
MCM2	1,7156	0,0196	iniciação da replicação do DNA
POLR2H	1,3948	0,0367	subunidade da RNA polimerase II

Tabela 8 - Vias e módulos funcionais alterados em amostras de Carcinoma Epidermóide de diferentes topografias de Cabeça e Pescoço (verde representa módulo inativo e vermelho, ativo). Versão resumida, vide versão completa em anexo.

Topografia	Módulo	Gene	p-valor
Cavidade	Via de calicreínas	KLK13	2,4E-18
Nasal e		KLK7	2,8E-7
Seios	Desenvolvimento (GO7275)	FOSB	3,5E-50
Paranasais	Desenvolvimento da epiderme (GO8544)	KLK7	4,2E-10
		EVPL	1,0E-2
	Região extracelular (GO5576)	POSTN	3,4E-25
		KLK13	3,1E-17
		INHBA	1,1E-14
		KLK6	1,4E-13
		AREG	8,9E-11
		MMP9	1,0E-6
	Espaço extracelular (GO5615)	MMP13	4,5E-2
	Sinalização célula-célula (GO7267)	BST2	2,6E-17
	Atividade de fatores de crescimento	AREG	3,1E-9
	(GO8083)	INHBA	3,9E-8
	Interação MEC-receptor (GeneDeck)	COL6A3	2,3E-22

Cont/ Tabela 8

	Ligantes de cálcio (GO5509)	S100P	6,6E-11
	Resposta ao <i>stress</i> (GO6950)	IL1F9	5,9E-43
		INHBA	3,9E-15
		BST2	2,9E-14
		KLK6	1,2E-11
		CCL18	3,9E-8
		CCL20	1,9E-6
		IL1B	9,5E-3
Cavidade Oral	Região extracelular (GO5576)	POSTN	3,4E-25
		KLK13	3,1E-17
		INHBA	1,1E-14
		KLK6	1,4E-13
		AREG	8,9E-11
		MMP9	1,0E-6
	Proteólise (GO6508)	KLK6	1,1E-29
		MMP9	5,7E-7
	Via de IGF2/IGFBP4	PLAU	2,3E-10
Orofaringe	Via de Wnt (GeneDeck)	MYC	2,6E-10
	Via de sinalização de Toll-like Receptor (GeneDeck)	IL1B	1,3E-2
	Regulação de transcrição (GO6355)	FOSB	1,5E-29
		MYC	3,3E-11
Hipofaringe	Resposta ao <i>stress</i> (GO6950)	IL1F9	5,9E-43
		INHBA	3,9E-15
		BST2	2,9E-14
		KLK6	1,2E-11
		CCL18	3,9E-8
		CCL20	1,9E-6
		IL1B	9,5E-3
Laringe	Ciclo celular (GO7049)	FOSB	3,6E-21
		MYC	3,9E-17
		INHBA	1,7E-5

5.3.2 Comparação do carcinoma epidermóide das cinco topografias de cabeça e pescoço utilizando carcinoma epidermóide de esôfago, pulmão e colo de útero

Para analisar o impacto da topografia na expressão gênica global utilizando uma abordagem diferente, foram incluídas amostras de carcinoma epidermóide de outras topografias (esôfago, pulmão e colo de útero). Os dados de expressão gênica de todos os genes da plataforma de 171 amostras de carcinoma epidermóide foram empregados na construção de um *cluster* ou agrupamento hierárquico, não supervisionado, com distância euclidiana completa (Figura 13).

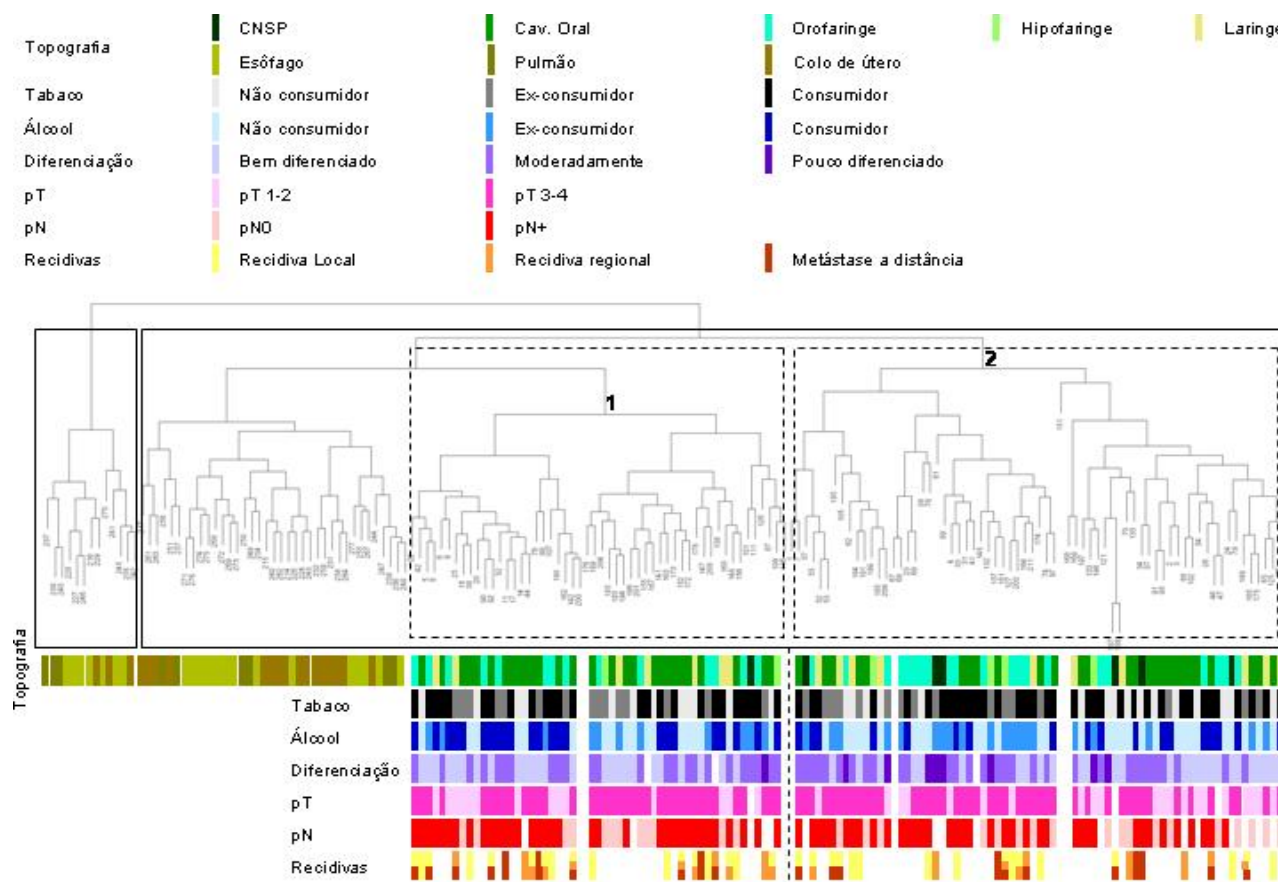
A primeira divisão do agrupamento separa um pequeno grupo de amostras de CE de esôfago, pulmão e colo de útero de um grande grupo com o restante das amostras. Esse grande grupo por sua vez também se divide em dois grupos: um braço com amostras de CECF exclusivamente (braço 2) e outro grupo que se ramifica em um braço com amostras de esôfago, pulmão e colo de útero e um braço apenas com CECF (braço 1).

A homogeneidade da distribuição dos dados clínicos e anatomopatológicos nos casos do braço 1 e 2 foi avaliada através do Teste Exato de Fisher e o Teste do Qui-quadrado de Pearson. Os dois grupos não apresentam frequências distintas de características clínicas e anatomopatológicas, com exceção de grau de diferenciação (Tabela 9). O braço 2 apresenta 7 dos 8 tumores pouco diferenciados. Para determinar as diferenças responsáveis por essa separação, foram calculados os genes

diferencialmente expressos (Tabela 10) e módulos alterados nos braços 1 e 2 de amostras de CP (Tabela 12). Os 796 genes diferencialmente expressos foram utilizados para identificar vias preferencialmente representadas através da ferramenta Pathway Express (<http://vortex.cs.wayne.edu/Projects.html>) (Tabela 11).

Tabela 9 - Homogeneidade da distribuição das variáveis clínicas dentre os casos de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço dos braços 1 e braço 2 definidos no agrupamento hierárquico não supervisionado construído com dados de expressão gênica de todos os genes representados na lâmina de *microarray* para as amostras de CECp, de esôfago, pulmão e colo de útero.

Variável	Teste Exato de Fisher (p-valor)	Teste do qui-quadrado de Pearson (p-valor)
Idade	0,100	0,113
Consumo de tabaco	1,000	0,838
Consumo de álcool	0,268	0,338
Grau de diferenciação	0,041	0,071
Invasão vascular	0,582	0,693
Invasão perineural	1,000	0,863
Comprometimento linfonodal	0,147	0,148
Extensão Extracapsular	0,236	0,238
Recidivas	0,466	0,462



Legenda - Agrupamento hierárquico não supervisionado construído com dados de expressão gênica de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço, Esôfago, Pulmão e Colo de útero. Os números se referem ao braços do *cluster* citados no texto. Abaixo do cluster estão representados os dados dos respectivos casos. (Figura também inclusa no Anexo)

Figura 13 - Expressão gênica global de Carcinoma Epidermóide e dados clínicos e anatomopatológicos dos casos de CECP.

Tabela 10 - Genes mais diferencialmente expressos entre o braços 1 e braço 2 de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço definidos no agrupamento hierárquico não supervisionado construído com dados de expressão gênica de todos os genes representados na lâmina de *microarray* para as amostras de CECp, de esôfago, pulmão e colo de útero. *Fold* representa a razão de expressão braço 1/braço 2. O p-valor se refere ao obtido através do teste de Wilcoxon e correção por FDR.

Nome	<i>Fold</i>	p-valor
ANKRD10	1,8	0
ACTR3	1,48	0
KCNJ15	1,39	1,0E-4
CIRH1A	1,39	1,0E-4
MAP2K1	1,34	1,0E-4
ILF2	1,30	1,0E-4
TMCC1	1,17	1,0E-4
CAB39	1,02	1,0E-4
PLP1	-1,25	1,0E-4
CASK	-1,27	1,0E-4
GALNT10	-1,62	1,0E-4
TFE3	-1,62	1,0E-4
HNRPA0	-1,82	1,0E-4
S100A16	1,78	2,0E-4
HDAC4	-1,31	2,0E-4
PBXIP1	-1,45	2,0E-4
DNM3	-1,50	2,0E-4
UBXD1	-1,77	2,0E-4
IL1B	1,51	3,0E-4
SCOC	1,23	3,0E-4
ATXN2	-1,25	3,0E-4
LRRC37A2	-1,30	3,0E-4
KLK2	-1,66	3,0E-4
C6orf107	-1,67	3,0E-4
MRPS17	-1,80	3,0E-4
PPP2R1A	1,41	4,0E-4
PPP4C	1,40	4,0E-4
SERINC2	1,36	4,0E-4
DHRS1	1,31	4,0E-4
STYXL1	1,28	4,0E-4
SETD3	1,19	4,0E-4

Tabela 11 - Vias preferencialmente representadas pelos genes diferencialmente expressos entre o braço 1 e braço 2 de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço definidos no agrupamento hierárquico não supervisionado construído com dados de expressão gênica de todos os genes representados na lâmina de *microarray* para as amostras de CECP, de esôfago, pulmão e colo de útero.

Grupo	Vias representadas e genes participantes	p-valor
Braço 1	Via de sinalização de ErbB AKT1, AREG, CRK, EGFR, HB-EGF, MAP2K1, MYC, SHC1	0,002
	Via de sinalização de GnRH EGFR, HB-EGF, ITPR3, MAP2K1, MAP2K3, PLD2	0,009
	Regulação de citoesqueleto de actina ARPC3, ARPC5, DOCK1, EGFR, GNG12, ITGA5, MAP2K1	0,014
	Adesão focal CRK, EGFR, DOCK1, PPP1CA, MAP2K1, SHC1, CAPN2, ITGA5	0,014
	Interações de SNARE em transporte de vesículas SNAP25, STX10, STX18	0,012

Tabela 12 - Vias e módulos funcionais ativos no braço 1 e inativos braço 2 de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço definidos no agrupamento hierárquico não supervisionado construído com dados de expressão gênica de todos os genes representados na lâmina de *microarray* para as amostras de CECP, de esôfago, pulmão e colo de útero. Versão resumida, vide versão completa em anexo.

Via	Gene	p-valor
Sinalização célula-célula (GO7267)	IL1F9	3,73E-41
	AREG	3,26E-23
	BST2	2,65E-17
Proteólise (GO6508)	KLK13	1,40E-36
	KLK6	1,11E-29
	MMP9	5,79E-7
Resposta ao stress (GO6950)	IL1F9	5,98E-43
	CCL18	3,93E-8
	CCL20	1,98E-6
	IL1B	9,56E-3
Regulação da progressão do ciclo celular (GO0074)	FOSB	1,47E-31
	INHBA	7,26E-10
	MYC	2,15E-5
	SPHK1	5,50E-2

5.4 ASPECTOS MOLECULARES DO COMPORTAMENTO DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

O banco de dados construído com dados clínicos e anatomopatológicos permite comparar grupos segundo hábitos do paciente, como consumo de tabaco e álcool, ou de acordo com características do tumores, como diferenciação, invasão vascular e perineural. Neste trabalho, as análises da biologia do CECP se concentraram em identificar alterações relacionadas a dados clínicos e anatomopatológicos que determinam o tratamento e prognóstico dos pacientes, como tamanho, comprometimento ou metástases linfonodais e recorrências após o tratamento.

5.4.1 Aspectos moleculares da metástase linfonodal em Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço

Em CECP, o tratamento cirúrgico de pacientes clinicamente diagnosticados com metástases linfonodais inclui o esvaziamento cervical, que traz diversas complicações ao paciente (SHORT et al. 1984; VAN WILGEN et al. 2003). Entretanto, após exame histológico, verifica-se que 10 a 20% dos pacientes clinicamente N+ não apresentam acometimento linfonodal detectável (WOOLGAR 1999), enquanto 20 a 50% dos pacientes cN0 possuem metástases cervicais ocultas e desenvolvem doença metastática, geralmente nos 2 primeiros anos de seguimento (KHAFIF et al. 1991; JONES et al. 1993; HIRATSUKA et al. 1997). Assim, para evitar falsos negativos, muitos pacientes N0 são submetidos a esvaziamento cervical.

Portanto, devido a limitações em detectar metástases linfonodais antes da cirurgia, pacientes N+ e N0 são hiper e hipotratados, respectivamente.

Para identificar alterações relacionadas às metástases linfonodais, foram comparados os dados de expressão gênica de amostras de CE de cavidade oral e orofaringe de pacientes que apresentaram (61 amostras) ou não (20 amostras) linfonodos comprometidos pela doença no exame anátomo-patológico das peças cirúrgicas de esvaziamento cervical.

Utilizando o teste de Wilcoxon e correção por FDR, não foram encontrados genes diferencialmente expressos, isto é, com p-valor menor que 0,05.

Os genes da assinatura de comprometimento linfonodal de ROEPMAN et al. (2005, 2006) que se encontravam na plataforma utilizada nesse estudo (119 genes) foram empregados na construção de um agrupamento hierárquico não supervisionado (Figura 14). Na casuística utilizada, estes genes não se mostraram capazes de classificar as amostras em N0 (sem acometimento linfonodal) e N+ (com acometimento linfonodal).

Foi utilizada também a metodologia de vias e módulos funcionais descrita por SEGAL et al. (2003) (Tabela 13). Dos módulos alterados, foram selecionados genes para avaliação por PCR quantitativa (Tabela 17, item 5.4.5).

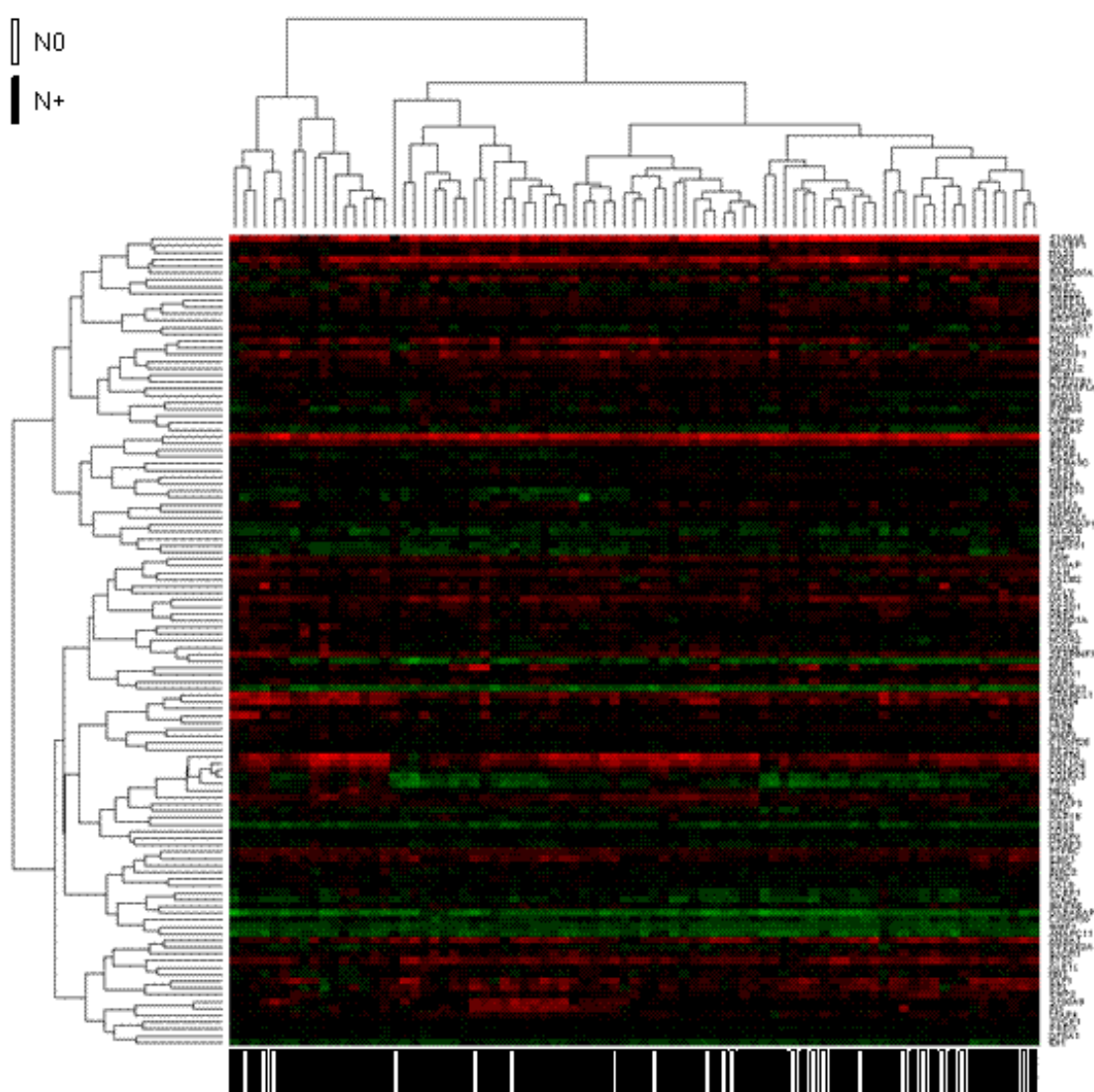


Figura 14 - Agrupamento hierárquico não supervisionado construído com os 119 genes da assinatura de comprometimento linfonodal de ROEPMAN et al. (2005, 2006) e amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço.

Tabela 13 - Vias e módulos funcionais alterados em amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço de pacientes com comprometimento linfonodal (verde representa módulo inativo e vermelho, ativo).

Grupo	Módulo	Gene	p-valor
Linfonodo positivo (61 amostras)	Via de calicreínas	KLK13	4,0E-15
		KLK7	2,8E-5
		KLK6	1,5E-2
		SERPINA3	1,7E-2
Linfonodo negativo (20 amostras)	Via de calicreínas	KLK13	4,0E-15
		KLK7	2,8E-5
		KLK6	1,5E-2
		SERPINA3	1,7E-2
	Tabela Whitfield 2 (ciclo celular)	PCNA	1,6E-2
	Protein binding (GO5515)	FOSB	4,1E-31
		KLK6	5,7E-18
		AREG	1,3E-11
		CCL20	4,0E-8
		EFNB2	9,1E-8
		IL1B	7,5E-5
		MYC	2,0E-04
		MCM2	2,0E-4
		INHBA	7,0E-3
		EGFR	1,4E-2
		AKT1	2,1E-2
	Regulação de apoptose (GO42981)	SPHK1	9,0E-9
		INHBA	9,0E-9
		AKT1	9,7E-3

5.4.2 Aspectos moleculares do Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço em estágios iniciais e avançados

Com o objetivo de estudar o perfil de expressão gênica de tumores em estágios inicial e avançado, foram comparadas 10 amostras de carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe pT1 ou pT2 N0 (estágio inicial) e 45 amostras pT3 ou pT4 N+ (estágio avançado). Não

foram identificados genes diferencialmente expressos com p-valor corrigido menor que 0,05. A análise de vias e módulos funcionais identificou alterações em tumores em estágios iniciais.

Tabela 14 - Vias e módulos funcionais alterados em amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço pT1 ou pT2 que não apresentam metástases linfonodais no exame anátomo-patológico do material obtido do esvaziamento cervical (verde representa módulo inativo e vermelho, ativo).

Grupo	Módulo	gene	p-valor
Tumores em estágios iniciais (11 amostras)	Angiogênese (GO1525)	SPHK1	2,3E-3
		MMP9	5,8E-5
	Migração do leucócito transendotelial (KEGG)	ACTN1	1,0E-3
		PIK3R3	3,5E-2
	Regulação de crescimento celular (GO1558)	SPHK1	2,3E-3
		KLK13	1,2E-10
	Via das calicreínas	KLK7	6,2E-4
		KLK6	3,3E-2
		NT5E	4,5E-4
	Metabolismo de nicotina e nicotinamida (KEGG)		

5.4.3 Aspectos moleculares do Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço com recidivas

As recidivas são as principais responsáveis pela mortalidade nos pacientes portadores de CECp tratados com intenção curativa. A ausência de acometimento linfonodal é um forte indicador de sobrevivência (LE TOURNEAU et al. 2008), porém, muitas vezes, pacientes com prognóstico reservado em função da detecção de doença em linfonodos, evoluem bem, sem apresentar recorrências. Assim, para identificar marcadores que possam diferenciar pacientes pN+ de bom ou mau prognóstico, foram comparadas 20 amostras de paciente com CE de cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe, submetidos a esvaziamento cervical, com

acometimento linfonodal, margens livres, tratados com radioterapia adjuvante e que apresentaram recidivas e 27 amostras de pacientes com mesmo tratamento mas que, ao contrário do prognóstico mais reservado, não apresentaram recidivas no período de dois anos.

A comparação de casos com ou sem recidiva independente do *status* linfonodal também foi realizada utilizando a mesma abordagem e constitui o Projeto de Mestrado de Camila Morais Melo, em andamento na Fundação Antônio Prudente. Nesse trabalho, foi destacado o gene EGLN3, que também foi utilizado para PCR quantitativa no presente estudo.

Na análise de genes diferencialmente expressos, não foram encontrados genes com p-valor menor que 0,05, utilizando o teste de Wilcoxon e correção por FDR.

RICKMAN et al. (2008) descreveram uma assinatura preditora de metástases em CECP. Os genes desta assinatura que se encontravam na plataforma utilizada no presente estudo (156 genes) foram empregados na construção de um agrupamento hierárquico não supervisionado (Figura 15), os quais não se mostraram capazes de classificar as amostras de CECP utilizadas segundo a ocorrência de recidivas.

Utilizou-se também a metodologia de vias e módulos funcionais descrita por SEGAL et al. (2003) (Tabela 15). Dos módulos alterados, foram selecionados genes para avaliação por PCR quantitativa (Tabela 17, item 5.4.5).

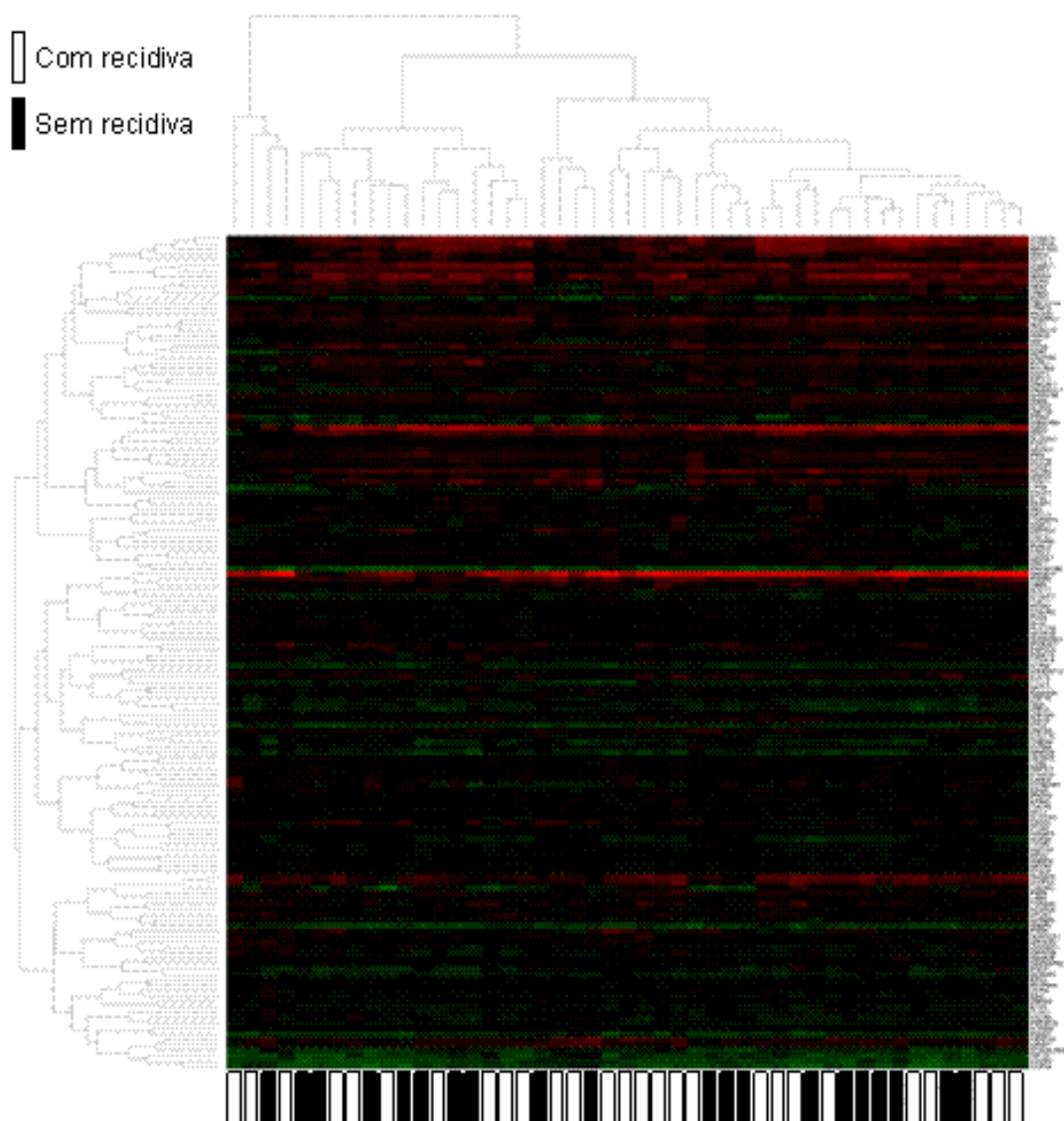


Figura 15 - Agrupamento hierárquico não supervisionado construído com os 156 genes da assinatura de metástases de RICKMAN et al. (2008) e amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço.

Tabela 15 - Vias e módulos funcionais alterados em amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço de pacientes com comprometimento linfonodal e recidivas após tratamento com cirurgia, esvaziamento cervical e radioterapia adjuvante (verde representa módulo inativo e vermelho, ativo).

Grupo	Módulo	Gene	p-valor
Com recidiva (20 amostras)	Sinalização célula-célula (GO7267)	IL1F9	4,1E-20
		AREG	5,5E-15
		INHBA	1,5E-12
		BST2	7,6E-10
		CCL20	2,1E-3
		KLK6	8,9E-3
Sem recidiva (27 amostras)	Sinalização célula-célula (GO7267)	IL1F9	4,1E-20
		AREG	5,5E-15
		INHBA	1,5E-12
		BST2	7,6E-10
		CCL20	2,1E-3
		KLK6	8,9E-3
	Região extracelular (GO5576)	INHBA	6,6E-15
		POSTN	3,0E-9
		KLK13	1,9E-6
		AREG	2,4E-6
		MMP13	7,3E-4
		KLK6	1,6E-2
	Assinatura de metástase	COL6A3	5,5E-6
		COL6A3	1,75E-3
		PLAU	1,9E-3
	Via de sinalização de TGF- β (KEGG)	INHBA	9,1E-11

5.4.4 Aspectos moleculares de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço “localizado” e “colonizador”

O acometimento linfonodal e as recidivas regionais se tratam do mesmo fenômeno, ou seja, capacidade da célula tumoral de alcançar, sobreviver e se multiplicar nos linfonodos cervicais. A diferença de nomenclatura decorre apenas da época em que ocorrem: antes ou após a

cirurgia. O comprometimento dos linfonodos pelo tumor é também um indicador de maior probabilidade de metástases a distância. Dessa forma, para comparar os tumores que se mostraram mais indolentes e os mais agressivos em qualquer tempo, foram comparadas amostras de CE de cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe considerado “localizado” (sem acometimento linfonodal, sem tratamento por radioterapia adjuvante e sem recidivas; 9 amostras) e “colonizador” (com acometimento linfonodal e/ou recidiva; 85 amostras). Mais uma vez, não foram encontrados genes diferencialmente expressos (p-valor menor que 0,05). Na análise de vias e módulos funcionais, os tumores localizados apresentaram vários módulos alterados.

Tabela 16 - Vias e módulos funcionais alterados em amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço localizadas (sem comprometimento linfonodal, sem tratamento por radioterapia adjuvante e sem recidivas) (verde representa módulo inativo e vermelho, ativo). Versão resumida, vide versão completa em anexo.

Grupo	Módulo	Gene	p-valor
Tumores localizados (9 amostras)	Espaço extracelular (GO5615)	MMP9	1,3E-5
		CCL20	3,7E-4
		MMP13	2,8E-2
	Matriz extracelular (GO5578)	POSTN	3,7E-12
		LAMA4	7,8E-4
		FOSB	1,1E-19
	<i>Protein binding</i> (GO5515)	KLK6	1,7E-11
		AREG	1,3E-10
		EFNB2	2,7E-6
		NTRK2	3,7E-4
		IL1B	3,7E-4
		MYC	5,0E-4

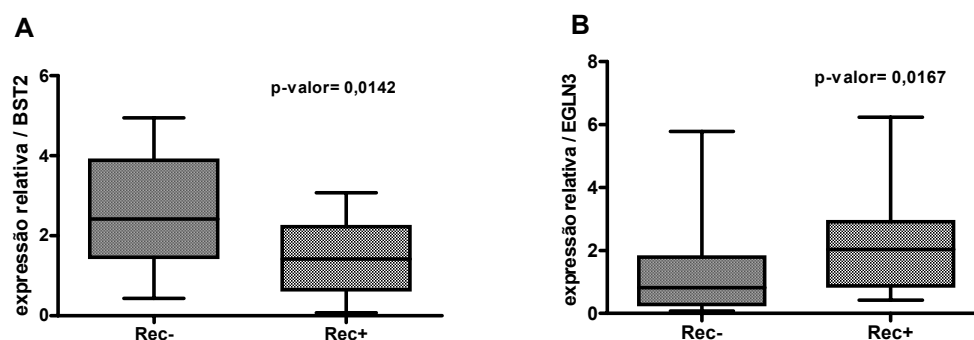
Cont/ Tabela 16

	CCL18	5,8E-4
	PAWR	9,9E-4
	MYH10	1,4E-3
	GRB7	1,7E-3
	EGFR	2,2E-3
	GPR56	2,8E-3
Ciclo celular (GeneDeck)	MCM2	3,3E-7
	CDKN1B	3,1E-6
Tabela Whitfield 2 (ciclo celular)	CCNB2	4,1E-6
Assinatura de metástase	S100P	6,6E-9
	CYR61	2,8E-7
	CCL18	2,8E-7
	PLAU	1,6E-2
Moléculas de adesão celular (KEGG)	CYR61	1,7E-6
Adesão focal (KEGG)	COL1A2	1,0E-29
	ACTN1	3,4E-4
	LAMB1	9,6E-4
	VAV3	4,7E-2
Adesão focal (GeneDeck)	THBS4	4,6E-27
	COL6A3	1,9E-21
	LAMA4	5,3E-6
	VWF	1,9E-2
	TTN	2,4E-2
Degradação de nitrobenzeno (KEGG)	PRMT2	2,7E-7
Junção intercelular (GO5911)	EVPL	3,2E-5
Via das calicreínas	KLK13	2,2E-12
	KLK7	8,9E-5
	KLK6	3,9E-3

5.4.5 PCR quantitativa

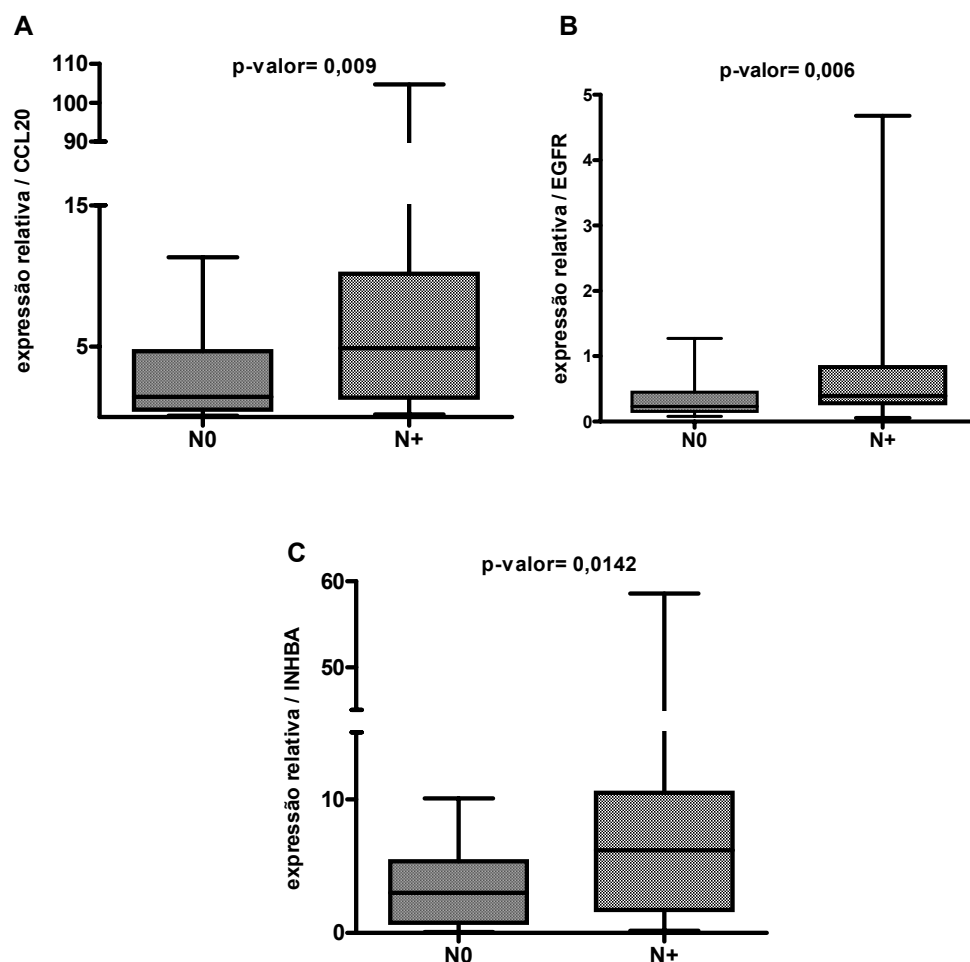
Foi calculada a expressão relativa dos genes pertencentes a módulos alterados em amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço com acometimento linfonodal (item 5.4.1) e com recidivas (item 5.4.3). A expressão relativas nos grupos estudados foi comparada através do teste de Mann-Whitney (Tabela 17).

Observa-se que, apesar de muitos não apresentarem valores significativos na comparação direta utilizando dados de *microarray* (teste de Wilcoxon), alguns genes em cada módulo foram capazes de distinguir os grupos estudados através PCR quantitativa: BST2 e EGLN3, em relação às recidivas pós-tratamento(Figura 16), e CCL20, INHBA e EGFR em relação ao acometimento linfonodal (Figura 17).



Legenda - A - Expressão relativa do gene BST2. B - Expressão relativa do gene EGLN3.

Figura 16 - Expressão gênica de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço com ou sem recidivas avaliada por PCR quantitativa.



Legenda - A - Expressão relativa do gene CCL20. B - Expressão relativa do gene EGFR. C - Expressão relativa do gene INHBA. N+ e N0 representam casos com e sem comprometimento linfonodal, respectivamente.

Figura 17 - Expressão gênica de amostras de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço com ou sem comprometimento linfonodal avaliada por PCR quantitativa.

Tabela 17 - Resumo dos resultados obtidos com a análise de dados de *microarray* e de PCR quantitativa dos genes pertencentes a vias e módulos alterados em Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço com comprometimento linfonodal e com recidivas.

Comparação	Microarray				PCR quantitativa	
	Gene	Módulos funcionais, p-valor	teste de Wilcoxon, p-valor	fold	teste de Mann-Whitney, p-valor	fold
Linfonodo Positivo (61 amostras) x Linfonodo Negativo (20 amostras)	CCL20	4,0E-8	0,17	1,32	0,009	3,40
	EGFR	0,0140	0,10	1,23	0,006	1,70
	INHBA	9,0E-9	0,41	1,20	0,014	2,05
	MCM2	0,0002	7,0E-4	1,64	0,22	1,36
	SERPINA3	0,0170	0,007	-1,84	0,07	-2,43
	AKT1	0,0097	0,19	-	0,13	-
	AREG	1,3E-11	0,92	-	0,41	-
	FOSB	4,1E-31	0,17	-	0,59	-
	IL1B	0,0001	0,31	-	0,07	-
	KLK6	5,7E-18	0,34	-	0,45	-
	MYC	0,0002	0,89	-	0,17	-
	PCNA	0,0160	0,62	-	0,43	-
Com Recidiva (20 amostras) x Sem Recidiva (27 amostras)	BST2	7,6E-10	0,048	-1,67	0,0142	-1,70
	EGLN3		3,2E-03	1,67	0,0167	2,49
	IL1F9	4,1E-20	0,051	1,80	0,061	1,91
	POSTN	3,0E-9	4,9E-3	2,20	0,058	2,47
	PLAU	0,0019	0,046	1,58	0,11	1,64
	AREG	5,5E-15	0,41	-	0,67	-
	CCL20	0,0021	0,15	-	0,19	-
	INHBA	6,6E-15	0,41	-	0,55	-
	KLK6	0,0089	0,63	-	0,76	-

6 DISCUSSÃO

Em cabeça e pescoço, o epitélio estratificado escamoso constitui o revestimento contínuo que recobre as vias aerodigestivas superiores e sua transformação origina o carcinoma epidermóide. Apesar de serem consideradas doenças clinicamente distintas, os CE de diferentes topografias de CP apresentam semelhanças como a morfologia e etiologia.

Atualmente, a escolha do tratamento do CECP leva em conta principalmente achados histo-patológicos e radiográficos, mas esse sistema pode falhar em estratificar os pacientes de acordo com o risco de recorrências (DE BREE et al. 2000), já que, de forma geral, o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço apresenta respostas bastante heterogêneas.

Portanto, estudos moleculares representam uma oportunidade de direcionar o tratamento e aperfeiçoar o seguimento, a fim de diminuir a mortalidade e morbidade em pacientes de CECP.

Com o objetivo de estudar aspectos moleculares do carcinoma epidermóide de diferentes topografias de cabeça e pescoço e identificar alterações relacionadas ao comportamento desses tumores, foi analisado o perfil de expressão gênica de amostras de CECP, principalmente no âmbito de vias metabólicas e módulos funcionais.

6.1 ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS E ANATOMO-PATOLÓGICOS DE PACIENTES DE CECP

Inicialmente foram realizadas análises para avaliar a homogeneidade dos dados clínicos frente às cinco topografias de CP. A distribuição dos dados clínicos e anátomo-patológicos mostrou-se homogênea nas cinco topografias de CP (CNSP, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe), com algumas exceções (Tabela 5). Fica assim assegurado que ao dividir e comparar estas amostras segundo esses critérios (por exemplo, com ou sem recidivas), estão sendo encontradas as diferenças relativas às recidivas e não características de um ou outra topografia que apresentasse maior ou menor frequência de recidivas.

Verificou-se, entretanto, a ocorrência de menor frequência de comprometimento linfonodal nos casos de CE em CNSP (Figura 8). Essa distribuição heterogênea era esperada pois os tumores dessa topografia têm menor probabilidade de desenvolver metástases linfonodais. Dessa forma, a fim de resguardar a confiabilidade das análises, as sete amostras de CNSP não foram utilizadas em todas as comparações do item 5.4.

6.2 ANÁLISES DE QUALIDADE DOS DADOS DE *MICROARRAY*

Na análise da qualidade dos dados de *microarray*, foi visto que, tanto na manufatura das lâminas quanto na reprodutibilidade da hibridização das duplicatas, os experimentos de *microarray* apresentaram dados confiáveis,

sendo possível prosseguir com as análises que visam estudar a biologia do tumor (Figuras 9 e 10).

6.3 ASPECTOS MOLECULARES DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE EM DIFERENTES TOPOGRAFIAS

6.3.1 Comparação do carcinoma epidermóide das cinco topografias de cabeça e pescoço

O perfil de expressão gênica de amostras de carcinoma epidermóide de cavidade nasal e seios paranasais, cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe foi obtido através da técnica de *microarray* e os dados foram empregados para estudar o CE em diferentes topografias.

Segundo o agrupamento hierárquico não supervisionado das amostras de CECP, não foi possível observar diferenças marcantes entre as cinco topografias ou outras variáveis clínico e anátomo-patológicas, pelo menos com base nos genes representados (Figura 11). Provavelmente o método mais adequado no sentido de proporcionar uma maior cobertura do transcriptoma seja o emprego de *capture arrays* que possuem todos os éxons conhecidos, seguido de sequenciamento em larga escala de terceira geração (LEDFOORD 2008), mas que ainda é muito dispendioso.

Foram analisados perfis de expressão já publicados capazes de classificar molecularmente grupos de amostras. Com o perfil de expressão descrito por CHUNG et al. (2004) não foi observada a classificação das amostras em grupos com assinatura de EGF, TEM, etc. (Figura 12),

possivelmente porque a lâmina utilizada contém apenas 67 do 582 genes descritos ou devido a diferenças metodológicas experimentais e matemáticas. Outros trabalhos observaram que amostras de CECP se separam em subgrupos que exibiam perfil de expressão genes implicados em invasão, sinalização de Ras, interação células-MEC e angiogênese (GINOS et al. 2004), sinalização de TGF- β , moléculas de transporte, metabolismo de oxigênio e processamento de RNA e tradução (BELBIN et al. 2002) ou características como pT3-4 N+ (WARNER et al. 2004) e diferenciação (RICKMAN et al. 2008). Analisando dados de *microarray* de CECP, ROEPMAN et al. (2006) concluíram que é possível determinar várias assinaturas distintas capazes de classificar amostras da mesma maneira. Dessa forma, as assinaturas moleculares devem ser interpretadas com precaução pois elas se aplicam às amostras utilizadas na construção da assinatura, e não necessariamente se aplicam a outras amostras.

Analisando as amostras de carcinoma epidermóide de diferentes topografias de cabeça e pescoço através da expressão de genes individualmente, apenas a comparação Cavidade Oral *versus* Orofaringe apresentou genes diferencialmente expressos (Tabelas 6 e 7). Nessa comparação foram identificados 6 genes diferencialmente expressos, isto é, aproximadamente 4.600 genes não são diferencialmente expressos entre nenhuma das topografias. Isso sugere, em relação ao genes estudados, que o carcinoma epidermóide de diferentes topografias de cabeça e pescoço não apresenta grandes diferenças de expressão gênica. O mesmo resultado não foi encontrado por REIS et al. (2005), que identificou 248 genes com

expressão diferencial entre cavidade oral, faringe e laringe através do estudo *in silico* de ORESTES.

A análise de vias e módulos funcionais nas diferentes topografias de CECP mostrou a ativação ou inativação de 20 de um total de 147 módulos estudados (Tabela 8). As amostras de cavidade nasal e seios paranasais parecem apresentar um perfil diferenciado dos demais pois concentra a maioria das alterações: apresentou 11 dos 20 módulos alterados. Dentre esses, Resposta ao *stress*, está inativo em CNSP e ativo em Hipofaringe; e Região extracelular está inativo em CNSP e ativo em Cavidade Oral. O módulo de Resposta ao *stress*, inativo em CNSP e ativo em Hipofaringe, corresponde às alterações de expressão gênica, produção e secreção de fatores como IL1B e quimiocinas. O módulo de Região extracelular representa características marcantes em câncer pois possui vários genes relacionados à progressão tumoral, como remodelamento de matriz extracelular (MMP9) e proliferação celular (AREG ou anfirregulina). É possível que a inativação destes módulos funcionais contribuam para a menor capacidade do carcinoma epidermóide de CNSP de desenvolver metástases linfonodais.

6.3.2 Comparação do carcinoma epidermóide das cinco topografias de cabeça e pescoço utilizando carcinoma epidermóide de esôfago, pulmão e colo de útero

Na tentativa de identificar outras maneiras de classificar o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, este foi comparado ao carcinoma

epidermóide de outras topografias. Nesse caso, as amostras de cabeça e pescoço se dividem nitidamente em dois grupos, sugerindo que a topografia onde se origina o tumor não é o principal fator que caracteriza molecularmente o CECp (Figura 13). Uma parte das amostras de cabeça e pescoço, o braço 1, se assemelha mais a um grupo de amostras de CE de esôfago, pulmão e colo de útero do que às outras amostras de CP (braço 2), sugerindo vias de sinalização comuns aos carcinomas epidermóides.

Ao comparar as amostras presentes nos dois “braços” de CECp, observa-se que o braço 1 é caracterizado por uma maior expressão de genes e ativação de módulos relacionados a sobrevivência, proliferação, motilidade e invasão celular, como AKT1, AREG, EGFR, ITGA5, MMP9, MYC e SPHK1, entre outros (Tabelas 11 e 12).

MMPs ou metalo-proteases constituem uma família de enzimas proteolíticas dependentes de zinco e cálcio. MMP9 participa na degradação de MEC em processos normais, como desenvolvimento embrionário e remodelamento de tecidos, ou em processos patológicos, como artrite e câncer. MMP9 é particularmente importante em neoplasias epiteliais porque degrada Colágeno tipo IV, principal componente da membrana basal (revisado em DERYUGINA e QUIGLEY 2006). KLK6 é uma serino-protease que cliva *in vitro* fibronectina, laminina e vitronectina (GHOSH et al. 2004), fibrinogênio e colágeno tipo I e IV (MAGKLARA et al. 2003), além de desmogleína 1 (BORGONHO et al. 2007) e portanto pode ter um papel em remodelamento de matriz.

ITGA5 codifica para uma proteína da família das integrinas. A integrina- α 5 se liga à integrina- β 1 para formar um receptor de fibronectina, mediando adesão e interações célula-MEC (HUVENEERS et al. 2008).

EGFR é um receptor de membrana tirosina-quinase que ativa as vias de MAPK, PI3K e Jak/STAT, levando à proliferação, sobrevivência celular, invasão e metástases. Mutações nesses genes não são frequentes em CECP, mas sua amplificação e/ou maior expressão estão associadas a menor sobrevida livre de doença e pior prognóstico (revisado em CHANG e CALIFANO 2008). AREG, junto com TGF- α , são considerados os mais importantes ligantes endógenos de EGFR em CECP enquanto EGF tem menor importância (HARRIS et al. 2003; ZHANG et al. 2004). MYC codifica uma fosfoproteína nuclear, um fator de transcrição que atua na progressão do ciclo celular, apoptose e transformação celular (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=gene>, MAGLOTT et al. 2005).

AKT/PKB é ativada através de PI3K, o qual pode ser ativado por EGFR. AKT fosforila e inativa componentes da maquinaria de apoptose, além de regular proliferação, invasão e expressão de proteínas relacionadas à hipóxia (para revisão, vide BUSSINK et al. 2008). SPHK1 é uma quinase que fosforila esfingosina em esfingosina-1-fosfato (S1P ou *sphingosine-1-phosphate*) (TSUKAHARA et al. 2002). Além de seu papel estrutural na membrana celular, S1P atua como efetor na transdução de sinal em vários aspectos ligados à progressão tumoral, como ativação de PI3K (LE SCOLAN et al. 2005).

6.4 ASPECTOS MOLECULARES DO COMPORTAMENTO DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CABEÇA E PESCOÇO

6.4.1 Aspectos moleculares da metástase linfonodal de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço

A detecção de linfonodos cervicais acometidos pelo tumor é um passo importante no estadiamento e escolha do tratamento de pacientes de CECP. Pacientes com metástases linfonodais detectadas no exame clínico podem ser tratados com esvaziamento cervical. Após o exame anatomopatológicos, se o comprometimento dos linfonodos é confirmado, o paciente é encaminhado para radioterapia adjuvante. Porém, o diagnóstico tanto de metástases linfonodais quanto de linfonodos livres de tumor apresenta dificuldades (KHAFIF et al. 1991; JONES et al. 1993; HIRATSUKA et al. 1997; WOOLGAR 1999).

Portanto, visando identificar alterações de expressão gênica em amostras com acometimento linfonodal, os dados de expressão gênica de amostras de pacientes de carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe com ou sem linfonodos acometimentos pelo tumor foram comparados utilizando diferentes métodos de análise.

Ao comparar os casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço que apresentam ou não acometimento linfonodal, não foram encontrados genes diferencialmente expressos. Outra abordagem muito empregada em *microarray* são as assinaturas moleculares. Em vários tipos de tumor, as assinaturas moleculares estão ainda em desenvolvimento e

apesar dos possíveis benefícios, essas ferramentas estão sendo analisadas de forma crítica (RANSOHOFF 2004; MIKLOS e MALEZKA 2004; MICHIELS et al. 2005; REID et al. 2005). No presente estudo, os 109 genes da assinatura de metástase linfonodal de ROEPMAN et al. (2005, 2006) não discriminaram os casos N0 e N+ (Figura 14). No estudo de 2006, o autor demonstra que usando grupos de 100 dos 825 genes preditores, obtinha acurácia de 80 a 90% na predição de metástases linfonodais. Novamente, tais diferenças provavelmente se devem às diferenças metodológicas ou mesmo à falta de reprodutibilidade das assinaturas moleculares.

Utilizando a estratégia de vias e módulos funcionais para comparar amostras N0 e N+, observa-se a ativação do módulo da Via das calicreínas em linfonodos negativos e sua inativação em linfonodos positivos (Tabela 13). KLK13 e KLK7 degradam os principais componentes de MEC *in vitro* (KAPADIA et al. 2004) e proteínas dos desmossomos corneodesmosina e desmocolina 1 (CAUBET et al. 2004), respectivamente. A maioria dos trabalhos descrevem calicreínas como indicadores de comportamento agressivo em vários tumores. Em Cabeça e Pescoço, entretanto, já foram descritas a expressão diminuída do mRNA de KLK7 em uma assinatura molecular preditora de metástases linfonodais (CHUNG et al. 2004) e maior expressão de KLK13 em casos N0 (TORUNER et al. 2004).

Neste módulo, há alterações também em SERPINA3 ou α -1-anti-quimiotripsina, um inibidor de serino-proteases. A ativação de SERPINA3 pode conferir menor agressividade aos tumores sem acometimento

linfonodal pois está relacionada à baixa probabilidade de metástases ósseas em câncer de próstata (KIKUCHI et al. 2006).

KLK6 está presente no módulo das calicreínas e também no de *Protein binding*, onde apresenta maior concordância com o comportamento do módulo (p-valor 1,5E-2 no módulo de calicreínas e 1,7E-18 no módulo de *Protein binding*). KLK6 parece ter um papel no perfil invasivo em câncer gástrico (NAGAHARA et al. 2005). Em carcinoma de cólon, KLK6 participa na migração celular através da ativação das vias de k-Ras e MAPK (HENKHAUS et al. 2008) e está mais expresso em amostras de pacientes com metástase hepáticas (OGAWA et al. 2005).

O módulo *Protein binding*, inativo em amostras N0, apresenta genes relacionados à progressão tumoral, como AREG (anfirregulina), EGFR e MYC, e mediadores inflamatórios, como a quimiocina CCL20 (*macrophage inflammatory protein-3 α*) e a citocina IL1B. Alguns mediadores inflamatórios também podem contribuir para a evolução do tumor. Por exemplo, em tumores hepáticos, a expressão aumentada de CCL20 e seu receptor CCR6 estão associadas à progressão tumoral (RUBIE et al. 2006). IL-1 β é uma citocina secretada após *stress* ou injúrias, promovendo sobrevivência e levando à secreção de outras citocinas pró-inflamatórias e angiogênese (AURON 1998).

Nessa comparação, o módulo de Regulação da apoptose, inativo em tumores linfonodo negativo, é representado pelos genes SPHK1, AKT1 e INHBA. A menor expressão de SPHK1 em linhagem de câncer de mama MCF-7 reduziu o crescimento estimulado por EGF e soro, além de aumentar

a sensibilidade a doxorrubicina (SARKAR et al. 2005), pois a atividade de SPHK1 pode conferir sobrevivência. Em amostras de câncer de mama, a alta expressão de SPHK1 está relacionada a pior prognóstico (RUCKHÄBERLE et al. 2007). Em relação a metástases em linfonodos, LIM et al. (2005) observou correlação positiva entre a expressão de pAkt e comprometimento linfonodal. Em ensaios clínicos, a expressão de Akt ativado está fortemente associada à falha no tratamento cirúrgico e radioterápico (LIM et al. 2005; MASSARELLI et al. 2005). INHBA codifica para as subunidades do homodímero activina A (duas subunidades de INHBA ligadas), que leva à agressividade tumoral em CE de esôfago (YOSHINAGA et al. 2008).

Em suma, os dados indicam que a biologia dos CECp N0 é caracterizada principalmente pela inativação de grupos de genes que participam de vias de proliferação e sobrevivência celular. A inativação de genes que conferem sobrevivência parece ser um fator que não proporciona a disseminação ou sobrevivência das células tumorais nos linfonodos, ressaltando que a apoptose é um processo que regula a formação de metástases (revisado em MEHLEN e PUISIEUX 2006).

CCL20, INHBA e EGFR são promissores indicadores de acometimento linfonodal utilizando PCR quantitativa (Tabela 17 e Figura 16). Em *microarray*, os três genes participam da assinatura de metástase linfonodal de O'DONNELL et al. (2005). EGFR foi muitas vezes relacionado a pior prognóstico ou menor sobrevida, mas seu poder preditor de metástases linfonodais ainda não está bem documentado (revisado em

CHANG e CALIFANO 2008). Em relação a CCL20 e INHBA, há poucos relatos destes como marcadores tumorais. A expressão protéica sérica de CCL20 era maior em pacientes com carcinoma de nasofaringe avançado ou recorrente (CHANG et al. 2008) e pacientes de CECP com maior expressão gênica de INHBA tiveram menor sobrevida livre de doença (SHIMIZU et al. 2007).

6.4.2 Aspectos moleculares de Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço em estágios iniciais e avançados

Com o objetivo de estudar o perfil de ativação de vias e módulos funcionais em tumores em estágios inicial e avançado, foram comparadas amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço T1-2 N0 e T3-4 N+ (Tabela 14). Nessa comparação, os módulos de Angiogênese e Regulação do crescimento celular estão inativos em tumores iniciais, sendo representados pelo gene SPHK1. Como já citado, a quinase codificada por SPHK1 produz fatores relacionados a vários aspectos ligados à progressão tumoral, como proliferação e sobrevivência celular.

Nos tumores iniciais, o módulo de Migração do leucócito transendotelial está inativo e contém PIK3R3 e MMP9. Essa via mostra, entre outras coisas, a ativação de MMPs através de PI3K em células endoteliais após interação com leucócitos. PIK3R3, uma subunidade regulatória de PI3K, está amplificado e mais expresso (mRNA e proteína) em câncer de ovário e o bloqueio de sua expressão por RNAi aumenta a taxa de apoptose na respectiva linhagem (ZHANG et al. 2007).

A expressão de MMP9 já foi bastante descrita em CECP. A maior expressão ou atividade de MMP9 foi significativamente relacionada à expressão de VEGF (RIEDEL et al. 2000), maior densidade de microvasos (FRANCHI et al. 2002), invasão (KURAHARA et al. 1999), recidivas regionais (KATAYAMA et al. 2004), metástases (HONG et al. 2000) e menor sobrevida em CECP (RIEDEL et al. 2000; YORIOKA et al. 2002). Além disso, já foi demonstrada relação entre níveis elevados de MMP9 detectada no plasma de pacientes com CECP e menor sobrevida livre de doença e dessa forma, MMP9 poderia se tornar um marcador sérico de prognóstico (RUOKOLAINEN et al. 2005). A inativação de MMP9 parece ser um mecanismo importante de impedir a progressão tumoral, já testado em modelo animal (KATORI et al. 2002; YAMASHITA et al. 2003).

Portanto, além da via de sobrevivência celular, a inativação de genes de remodelamento de MEC parece ser um fator importante que impede o crescimento e a progressão dos tumores “iniciais”.

6.4.3 Aspectos moleculares do Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço com recidivas

A busca de marcadores de recidivas é um processo complexo pois envolve o tipo de tratamento, tempo de seguimento, além da capacidade do tumor de invadir tecidos e de sobreviver fora do sítio primário. Por exemplo, RICKMAN et al. (2008) descreveu uma assinatura de metástases mas os 156 genes que se encontravam representados na lâmina de um total de 729 genes encontrados pelo autor não tiveram o mesmo poder preditor nas

amostras utilizadas neste estudo (Figura 15). BRAAKHUIS et al. (2006) comparou amostras de CECP com comprometimento linfonodal sem qualquer recidiva e com comprometimento linfonodal e metástase a distância exclusivamente (sem recorrência locorregional) e concluiu que expressão gênica não tem poder preditor nesse caso, pois em CECP os linfonodos são necessários para disseminação hematológica.

Através do emprego do método de vias e módulos alterados, observa-se que no grupo de casos que apresentou recidiva, o módulo de Sinalização célula-célula está ativo e inativo no grupo sem recidivas (Tabela 15). Esse módulo se refere a qualquer processo de transferência de informação de uma célula a outra e contém principalmente genes de mediadores inflamatórios (IL1F9 e CCL20) e ligantes de receptores (AREG).

IL1F9 está localizado no mesmo *locus* que IL1B (NICKLIN et al. 2002), sugerindo que surgiram do mesmo gene ancestral e foram duplicados posteriormente. IFN- γ , TNF- α e IL-1 β estimulam a expressão desta citocina em queratinócitos (MAGLOTT et al. 2005).

BST2 (bone marrow stromal cell antigen 2) é um fator presente em células estromais de medula óssea que participam no desenvolvimento de células B mas sua função não é ainda conhecida em detalhes (MAGLOTT et al. 2005). Em cabeça e pescoço, BST2 está mais expresso em relação ao tecido normal (SILVEIRA et al. 2008). Segundo dados de *microarray* e de PCR quantitativa (Tabela 17), BST2 está mais expresso nos casos sem recidiva, porém seu significado não está esclarecido.

EGLN3 foi incluído nos experimentos de PCR quantitativa e está mais expresso nos casos com recidiva. O gene codifica para a proteína PHD3, que em normóxia marca HIF-1 α para degradação via proteassomo (BRUICK e MCKNIGHT 2001). Entretanto, durante hipóxia crônica, situação que pode ocorrer em tumores, PHD3 está mais expressa e apresenta maior atividade. Nesse caso, a degradação massiva de HIF-1 α protege as células contra morte por necrose, porém o mecanismo responsável não está esclarecido (GINOUVÈS et al. 2008). Portanto, este gene pode ser um importante indicador de resistência à radioterapia já que permite as células sobreviverem em hipóxia por períodos prolongados.

Nos casos sem recidivas, o módulo Região extracelular está inativo e contém o gene POSTN, também conhecido como periostina ou fator específico de osteoblastos. POSTN é expressa pelos fibroblastos de câncer de cólon (KIKUCHI et al. 2008) e por células estromais de melanoma (TILMAN et al. 2007). Periostina pode atuar na adesão focal através de sua ligação à integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ (GILLAN et al. 2002), a qual ativa Akt e promove sobrevivência em células tumorais e endoteliais (BAO et al. 2004). Periostina pode ter um papel importante na formação de metástases. Durante esse processo, células tumorais epiteliais adquirem um fenótipo semelhante a fibroblastos, processo conhecido como transição epitelial-mesenquimal (TEM), o qual contribui para o comportamento agressivo dos tumores. YAN e SHAO (2006) descreveram que a expressão de periostina em linhagem 293T tornou o fenótipo da linhagem semelhante à TEM, com aumento de migração, invasão e adesão celular. Em linhagem celular de CECF, POSTN

promove invasão, crescimento independente de ancoragem além de metástases espontâneas em linfonodos cervicais e pulmão em modelo murino. Em amostras de CECP, a intensidade de expressão de POSTN se correlacionou à invasividade (KUDO et al. 2006). POSTN também é um fator relacionado à angiogênese. Em CE oral, a densidade de vasos é maior em casos positivos para periostina e *in vitro* periostina recombinante aumenta a formação de vasos de maneira dose-dependente. Assim, sugere-se que periostina promove invasão e angiogênese em CE oral e pode ser um forte marcador de metástases nesse pacientes (SIRIWARDENA et al. 2006). Assim, é possível também que os tumores que não apresentaram recidivas possuam uma menor interação com o estroma tumoral.

Utilizando o método de análise de vias e módulos funcionais e PCR quantitativa, foram identificados genes que se mostram potenciais marcadores do desenvolvimento de recidivas: BST2 e EGLN3 (Tabela 17 e Figura 17). Esses genes foram identificados também em trabalhos que demonstraram associação com acometimento linfonodal (O'DONNELL et al. 2005) e profundidade de infiltração (TORUNER et al. 2004), mas não com a ocorrência de recidivas pós-tratamento.

6.4.4 Aspectos moleculares do Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço localizado e colonizador

Os carcinomas são geralmente caracterizados pela invasão do tecido conjuntivo vizinho e migração das células tumorais para formar metástases em outros sítios. Esse processo requer alterações na interação célula-célula

e célula-MEC. Como as moléculas de adesão celular têm um papel central nessa interação, elas são muito estudadas no processo de invasão e metástases (revisado em ZIOBER et al. 2006).

Ao comparar amostras de CECP “localizado” (sem comprometimento linfonodal, sem tratamento com radioterapia e sem recidivas) e “colonizador” (com comprometimento linfonodal e/ou recidivas), observa-se em tumores “localizados” ocorre a inativação de módulos como Metaloenzimas, Espaço extracelular, Matriz extracelular, *Protein binding*, Ciclo celular, Moléculas de adesão celular, Adesão focal e Assinatura de metástases (Tabela 16). Sabe-se que em tecidos epiteliais, moléculas da MEC como colágenos e lamininas atuam na adesão célula-MEC ligando-se aos receptores da família das integrinas, (www.genome.jp/kegg/pathway/hsa/hsa04510.html). Assim, os dados obtidos sugerem que a inativação deste conjunto de genes parece limitar a capacidade de invadir e migrar para outros sítios.

6.4.5 Interação entre os genes e vias alterados

Utilizando o método de vias e módulos alterados para comparar as amostras de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço segundo critérios relacionados ao comportamento do tumor (metástases linfonodais, tamanho, recidivas), foram identificados um conjunto de módulos/genes alterados, alguns deles pouco estudados em CECP ou câncer de forma geral. Nos estudos de expressão gênica já publicados em CECP, os genes relacionados ao comprometimento linfonodal e metástases seriam

principalmente os ligados às junções oclusivas, integrinas, vias de sinalização de cálcio, VEGF, p53, apresentação de antígenos, quimiocinas e extravasamento de leucócitos (YU et al. 2008).

O cenário formado pelos módulos alterados no presente estudo mostra que a biologia do CECp é caracterizada por alterações consideradas clássicas ou já bem descritas (alterações em EGFR, MMP9 e PLAU) e também por alterações pouco estudadas nesse tumor (alterações em CCL20, IL1F9, SPHK1, POSTN).

As alterações identificadas podem ocorrer tanto nos passos iniciais da carcinogênese, com aumento da sinalização de proliferação epitelial (EGFR, AREG) e sinalização antiapoptótica (PI3K, AKT), quanto mais tardiamente, durante a progressão e disseminação tumoral, como aumento de genes relacionados ao perfil metastático (MMP9, POSTN). Entretanto, algumas amostras de perfil menos agressivo podem não apresentar tais alterações. Por exemplo, o gene SERPINA3 está ativo em casos N0 e se situa no *locus* 14q, que pode sofrer perda de heterozigosidade na transformação da displasia para carcinoma *in situ* e invasivo (revisado em HADDAD e SHIN 2008).

É interessante ressaltar que os resultados de diferentes comparações parecem convergir no sentido de indicarem as mesmas alterações de genes relacionadas aos grupos com perfil mais ou menos agressivo. ; e podem representar características comuns aos carcinomas epidermóide de cabeça e pescoço.

Segundo os dados da literatura citados e as vias apresentadas pelo KEGG, podem ser apontados vários pontos de sinalização entre os genes pertencentes a módulos alterado, mostrando a comunicação da célula tumoral com o microambiente (Figura 18).

A expressão de EGFR e MMP9 aumenta em resposta à expressão de POSTN em linhagem 293T (YAN e SHAO 2006). MMP9 é ativada por PLAU e inibida por SERPINA3 (HAN et al. 2008). A ligação de CCL20 ao seu receptor CCR6 acarreta na atividade de MMP, que libera moléculas de anfirregulina (AREG) que estavam embebidas na MEC; a anfirregulina liberada no meio extracelular se liga a EGFR, ativando toda a cascata clássica de EGF: fosforilação das tirosinas, ativação da via de MAP quinase, proliferação, migração e ativação do mediador de sobrevivência Akt/PKB (GSCHWIND et al. 2003; KEATES et al. 2007).

Activina A ativa Akt e estimula a expressão gênica de VEGF em carcinoma hepatocelular (WAGNER et al. 2004; DO et al. 2008). A via PI3K/Akt também é ativada através de SPHK1, conferindo sobrevivência e resistência à apoptose por um mecanismo envolvendo as vias de ERK1/2 (LE SCOLAN et al. 2005). SPHK1 pode ser ativado por IL-1 β (MASTRANDREA et al. 2005), que também desencadeia sinalização que promove sobrevivência celular através de inibição e degradação de I κ B (DI DONATO et al. 1995), seguida de translocação de NF- κ B para o núcleo (SHIRAKAWA e MIZEL 1989; STYLIANOU et al. 1992). IL1F9 desencadeia uma sinalização semelhante a IL-1, com ativação de NF- κ B (TOWNE et al. 2004).

Dessa forma, as alterações identificadas pelo método de análise de vias e módulos funcionais permitem uma melhor compreensão de uma doença complexa e heterogênea. Esses conhecimentos abrem novas perspectivas de pesquisas com ensaios funcionais para avaliar o papel desses genes em modelos, além de identificar possíveis novos marcadores moleculares e novos alvos terapêuticos.

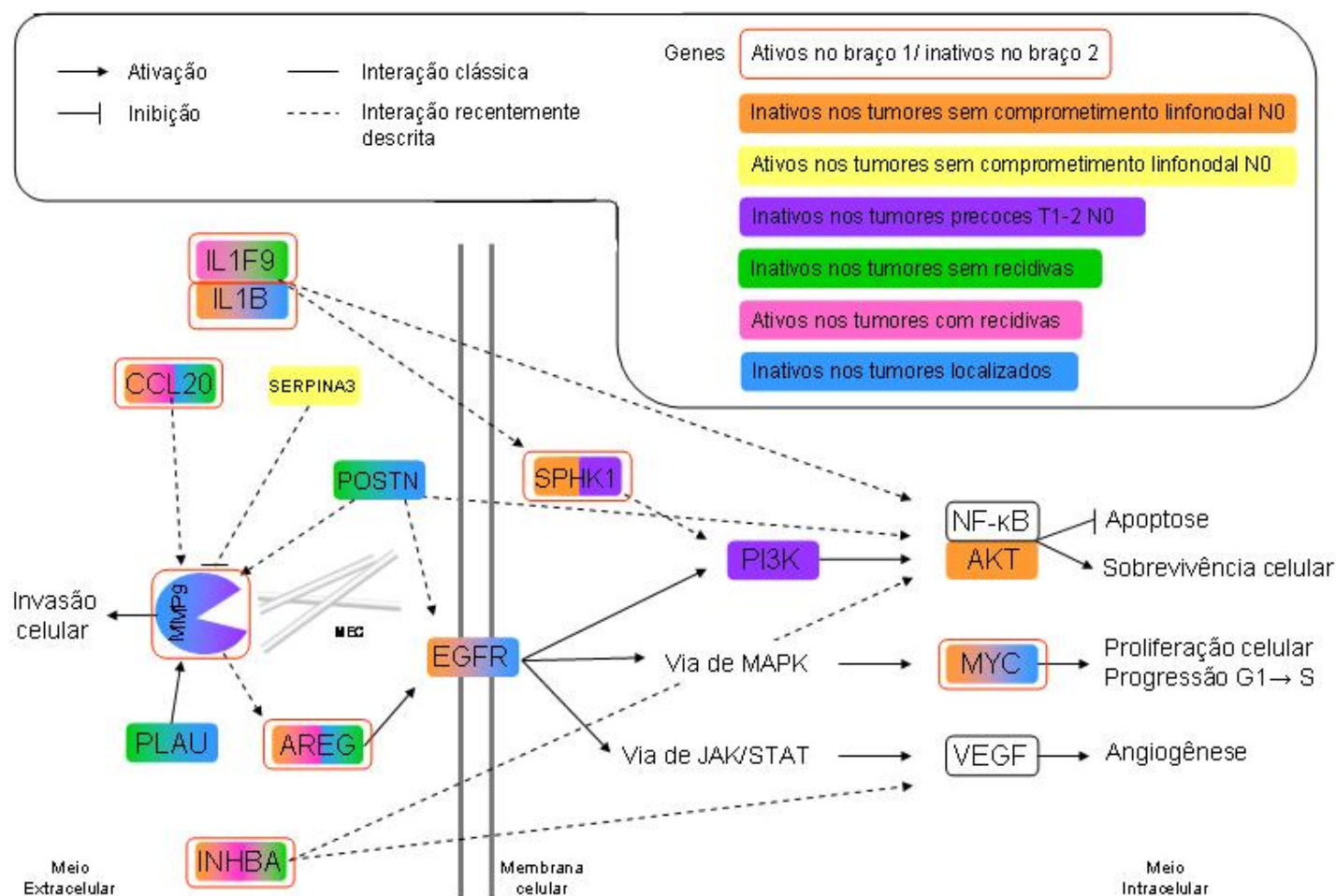


Figura 18 - Genes pertencentes a vias e módulos alterados em Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço e suas interações no contexto celular.

7 CONCLUSÃO

1. Referente ao objetivo 1

Ao comparar a expressão gênica de carcinoma epidermóide de diferentes topografias de cabeça e pescoço, observa-se que, em relação aos genes contidos na plataforma, a topografia não é o fator de maior impacto no perfil de expressão gênica global ou de genes individualmente.

Os dados de expressão gênica global de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, esôfago, pulmão e colo de útero sugerem a classificação de amostras de CECP em dois grupo, baseado na ativação de módulos funcionais e expressão aumentada de genes relacionados à agressividade e progressão tumoral, e não à topografia.

2. Referente ao objetivo 2

Em relação ao comportamento do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (comprometimento de linfonodos, tamanho do tumor e recidivas), as alterações de expressão gênica nos tumores de perfil mais agressivo foram identificados através da análise de vias e módulos funcionais. As alterações identificadas indicam que o perfil agressivo em CECP está relacionado à comunicação entre microambiente, MEC e a célula tumoral. Essa sinalização pode promover a progressão tumoral através da inibição de apoptose, estímulo de sobrevivência e proliferação celular, angiogênese, invasão e mobilidade de células tumorais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almadori G, Bussu F, Paludetti G. Should there be more molecular staging of head and neck cancer to improve the choice of treatments and thereby improve survival? **Curr Opin Otolaryng Head Neck Surg** 2008; 16:117-26.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, et al. The Gene Ontology Consortium. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nat Genet** 2000; 25:25-9.

Auron PE. The interleukin 1 receptor: ligand interactions and signal transduction. **Cytokine Growth Factor Rev** 1998; 9:221-37.

Bao S, Ouyang G, Bai X et al. Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. **Cancer Cell** 2004; 5:329-39.

Belbin TJ, Singh B, Barber I, et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinoma using cDNA microarrays. **Cancer Res** 2002; 62:1184-90.

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.

Borgoño CA, Michael IP, Komatsu N, et al. A potential role for multiple tissue kallikrein serine proteases in epidermal desquamation. **J Biol Chem** 2007; 282:3640-52.

Braakhuis BJ, Senft A, de Bree R, et al. Expression profiling and prediction of distant metástases in head and neck squamous cell carcinoma. **J Clin Pathol** 2006; 59:1254-60.

Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S, et al. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. **Crit Rev Oncol Hematol** 2005; 54:95-105.

Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. **Science** 2001; 294:1337-40.

Bussink J, van der Kogel AJ, Kaanders JH. Activation of the PI3-K/AKT pathway and implications for radioresistance mechanisms in head and neck cancer. **Lancet Oncol** 2008; 9:288-96.

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

Caubet C, Jonca N, Brattsand M, et al. Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7. **J Invest Dermatol** 2004; 122:1235-44.

Chang KP, Hao SP, Chang JH, et al. Macrophage inflammatory protein-3alpha is a novel serum marker for nasopharyngeal carcinoma detection and prediction of treatment outcomes. **Clin Cancer Res** 2008; 14:6979-87.

Chang SS, Califano J. Current status of biomarkers in head and neck cancer. **J Surg Oncol** 2008; 97:640-3.

Chung CH, Parker JS, Karaca G, et al. Molecular classification of head and neck squamous cell carcinomas using patterns of gene expression. **Cancer Cell** 2004; 5:489-500.

Chung CH, Parker JS, Ely K, et al. Gene expression profiles identify epithelial-to-mesenchymal transition and activation of nuclear factor-kappaB signaling as characteristics of a high-risk head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Res** 2006; 66:8210-8.

Cromer A, Carles A, Millon R, et al. Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray analysis. **Oncogene** 2004; 23:2484-98.

de Bree R, Deurloo EE, Snow GB, Leemans CR. Screening for distant metastases in patients with head and neck cancer. **Laryngoscope** 2000; 110:397-401.

De Risi J. Indirect fluorescent labeling of DNA with amino-allyl dyes. In: Bowtell D, Sambrook J, editores. **DNA Microarrays: a molecular cloning manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002. p.187-93.

Deryugina EI, Quigley JP. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev** 2006; 25:9-34.

DeWeese TL, Walsh JC, Dillehay LE, et al. Human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins alter cell cycle progression but not radiosensitivity of carcinoma cells treated with low-dose-rate radiation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 1997; 37:145-54.

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

Di Donato JA, Mercurio F, Karin M. Phosphorylation of I kappa B alpha precedes but is not sufficient for its dissociation from NF-kappa B. **Mol Cell Biol** 1995; 15:1302-11.

Do TV, Kubba LA, Antenos M, Rademaker AW, Sturgis CD, Woodruff TK. The role of activin A and Akt/GSK signaling in ovarian tumor biology. **Endocrinology** 2008; 149:3809-16.

Draghici S, Khatri P, Martins RP, Ostermeier GC, Krawetz SA. Global functional profiling of gene expression. **Genomics** 2003; 81:98-104.

D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, et al. Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **N Engl J Med** 2007; 356:1944-56.

Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:14863-8.

Ferris RL, Grandis JR. NF-kappaB gene signatures and p53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2007; 13:5663-4.

Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D. Head and neck cancer. **N Engl J Med** 2001; 345:1890-900.

Franchi A, Santucci M, Masini E, Sardi I, Paglierani M, Gallo O. Expression of matrix metalloproteinase 1, matrix metalloproteinase 2, and matrix metalloproteinase 9 in carcinoma of the head and neck. **Cancer** 2002; 95:1902-10.

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.

Genden EM, Ferlito A, Bradley PJ, Rinaldo A, Scully C. Neck disease and distant metastases. **Oral Oncol** 2003; 39:207-12.

Ghosh MC, Grass L, Soosaipillai A, Sotiropoulou G, Diamandis EP. Human kallikrein 6 degrades extracellular matrix proteins and may enhance the metastatic potential of tumour cells. **Tumour Biol** 2004; 25:193-9.

Gillan L, Matei D, Fishman DA, Gerbin CS, Karlan BY, Chang DD. Periostin secreted by epithelial ovarian carcinoma is a ligand for alpha(V)beta(3) and alpha(V)beta(5) integrins and promotes cell motility. **Cancer Res** 2002; 62:5358-64.

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

Gillison ML, Shah KV. Chapter 9: Role of mucosal human papillomavirus in nongenital cancers. **J Natl Cancer Inst Monogr** 2003; 31:57-65.

Ginos MA, Page GP, Michalowicz BS, et al. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Cancer Res** 2004; 64:55-63.

Ginouvès A, Ilc K, Macías N, Pouysségur J, Berra E. PHDs overactivation during chronic hypoxia "desensitizes" HIFalpha and protects cells from necrosis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105:4745-50.

Giri U, Ashorn CL, Ramdas L, et al. Molecular signatures associated with clinical outcome in patients with high-risk head-and-neck squamous cell carcinoma treated by surgery and radiation. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2006; 64:670-7.

Gomes LI, Esteves GH, Carvalho AF, et al. Expression profile of malignant and nonmalignant lesions of esophagus and stomach: differential activity of functional modules related to inflammation and lipid metabolism. **Cancer Res** 2005; 65:7127-36.

Groome PA, Schulze K, Boysen M, et al. A comparison of published head and neck stage groupings in carcinomas of the oral cavity. **Head Neck** 2001; 23:613-24.

Gschwind A, Hart S, Fischer OM, Ullrich A. TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. **EMBO J** 2003; 22:2411-21.

Haddad RI, Shin DM. Recent advances in head and neck cancer. **N Engl J Med** 2008; 359:1143-54.

Hall SF, Groome PA, Rothwell D, Dixon PF. Using the TNM system to predict survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Anticancer Res** 1998; 18:4777-8.

Halliwell B, Gutteridge JMC. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 2007a. Ethanol; p.457-60.

Halliwell B, Gutteridge JMC. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. Oxford: Oxford University Press, 2007b. Mechanisms of damage by cigarette smoke; p.469.

Han YP, Yan C, Garner WL. Proteolytic activation of matrix metalloproteinase-9 in skin wound healing is inhibited by alpha-1-antichymotrypsin. **J Invest Dermatol** 2008; 128:2334-42.

Harris R, Chung E, Coffey R. EGF receptor ligands. **Exp Cell Res** 2003; 284:2-13.

Henkhaus RS, Gerner EW, Ignatenko NA. Kallikrein 6 is a mediator of K-RAS-dependent migration of colon carcinoma cells. **Biol Chem** 2008; 389:757-64.

Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, et al. Human papillomavirus and oral cancer: The International Agency for Research on Cancer multicenter study. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:1772-83.

Hiratsuka H, Miyakawa A, Nakamori K, Kido Y, Sunakawa H, Kohama G. Multivariate analysis of occult lymph node metastasis as a prognostic indicator for patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Cancer** 1997; 80:351-6.

Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY. Expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. **Oral Oncol** 2000; 36:207-13.

Huveneers S, Truong H, Fässler R, Sonnenberg A, Danen EH. Binding of soluble fibronectin to integrin alpha5 beta1 - link to focal adhesion redistribution and contractile shape. **J Cell Sci** 2008; 121:2452-62.

Johnson NW, Warnakulasuriy S, Tavassoli M. Hereditary and environmental risk factors; clinical and laboratory risk matters for head and neck, especially oral, cancer and precancer. **Eur J Cancer Prev** 1996; 5:5-17.

Jones AS, Phillips DE, Helliwell TR, Roland NJ. Occult node metastases in head and neck squamous carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 1993; 250:446-9.

Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Res** 2000; 28:27-30.

Kanehisa M, Goto S, Hattori M, et al. From genomics to chemical genomics: new developments in KEGG. **Nucleic Acids Res** 2006; 34:D354-7.

Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment. **Nucleic Acids Res** 2008; 36:D480-4.

Kapadia C, Ghosh MC, Grass L, Diamandis EP. Human kallikrein 13 involvement in extracellular matrix degradation. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 323:1084-90.

Katayama A, Bando N, Kishibe K, et al. Expressions of matrix metalloproteinases in early-stage oral squamous cell carcinoma as predictive indicators for tumor metastases and prognosis. **Clin Cancer Res** 2004; 10:634-40.

Katori H, Baba Y, Imagawa Y, et al. Reduction of in vivo tumor growth by MMI-166, a selective matrix metalloproteinase inhibitor, through inhibition of tumor angiogenesis in squamous cell carcinoma cell lines of head and neck. **Cancer Lett** 2002; 178:151-9.

Keates S, Han X, Kelly CP, Keates AC. Macrophage-inflammatory protein-3 α mediates epidermal growth factor receptor transactivation and ERK1/2 MAPK signaling in Caco-2 colonic epithelial cells via metalloproteinase-dependent release of amphiregulin. **J Immunol** 2007; 178:8013-21.

Khafif RA, Rafla S, Tepper P, Attie JN, Gelbfish GA. Effectiveness of radiotherapy with radical neck dissection in cancers of the head and neck. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 1991; 117:196-9.

Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. **J Clin Oncol** 2007; 25:3230-7.

Khatri P, Draghici S, Ostermeier GC, Krawetz SA. Profiling gene expression using onto-express. **Genomics** 2002; 79: 266-70.

Kikuchi E, Nakashima J, Ishibashi M, et al. Usefulness of alpha1-antichymotrypsin-PSA complex for predicting bone metastases of prostate cancer. **Urology** 2006; 68:371-5.

Kikuchi Y, Kashima TG, Nishiyama T et al. Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon. **J Histochem Cytochem** 2008; 56:753-64.

Knudsen KE, Diehl JA, Haiman CA, Knudsen ES. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk. **Oncogene** 2006; 25:1620-8.

Kowalski LP, Nishimoto IN, Carvalho AL, et al. Looking beyond tobacco and alcohol: the role of lifestyle and other environmental risk factors for laryngeal cancer. **Appl Cancer Res** 2005; 25:10-9.

Kudo Y, Ogawa I, Kitajima S, et al. Periostin promotes invasion and anchorage-independent growth in the metastatic process of head and neck cancer. **Cancer Res** 2006; 66:6928-35.

Kumar V, Abbas A, Fausto N. **Robbins and Contran pathologic basis of disease**. 7 ed. Philadelphia: Elsevier; 2005. Neoplasia; p.269-342.

Kurahara S, Shinohara M, Ikebe T, et al. Expression of MMPs, MT-MMP, and TIMPs in squamous cell carcinoma of the oral cavity: correlations with tumor invasion and metastasis. **Head Neck** 1999; 21:627-38.

Ledford H. The death of microarrays? **Nature** 2008; 455:847.

Le Scolan E, Pchejetski D, Banno Y, et al. Overexpression of sphingosine kinase 1 is an oncogenic event in erythroleukemic progression. **Blood** 2005; 106:1808-16.

Le Tourneau C, Velten M, Jung GM, Bronner G, Flesch H, Borel C. Prognostic indicators for survival in head and neck squamous cell carcinomas: analysis of a series of 621 cases. **Head Neck** 2005; 27:801-8.

Le Tourneau C, Jung GM, Borel C, Bronner G, Flesch H, Velten M. Prognostic factors of survival in head and neck cancer patients treated with surgery and postoperative radiation therapy. **Acta Otolaryngol** 2008; 128:706-12.

Lièvre A, Bachet JB, Le Corre D, et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. **Cancer Res** 2006; 66:3992-5.

Lim J, Kim JH, Paeng JY, et al. Prognostic value of activated Akt expression in oral squamous cell carcinoma. **J Clin Pathol** 2005; 58:1199-205.

Magklara A, Mellati AA, Wasney GA, et al. Characterization of the enzymatic activity of human kallikrein 6: Autoactivation, substrate specificity, and regulation by inhibitors. **Biochem Biophys Res Commun** 2003; 307:948-55.

Maglott D, Ostell J, Pruitt KD, Tatusova T. Entrez Gene: gene-centered information at NCBI. **Nucleic Acids Res** 2005; 33:D54-8.

Massarelli E, Liu DD, Lee JJ, et al. Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. **Cancer** 2005; 104(11):2430-6.

Mastrandrea LD, Sessanna SM, Laychock SG. Sphingosine kinase activity and sphingosine-1 phosphate production in rat pancreatic islets and INS-1 cells: response to cytokines. **Diabetes** 2005; 54:1429-36.

Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:449-58.

Michiels S, Koscielny S, Hill C. Prediction of cancer outcome with microarrays: a multiple random validation strategy. **Lancet** 2005; 365:488-92.

Miklos GL, Maleszka R. Microarray reality checks in the context of a complex disease. **Nature Biotechnol** 2004; 22:615-21.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas/2008: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Mootha VK, Lindgren CM, Eriksson KF, et al. PGC-1 α -responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. **Nat Genet** 2003; 34:267-73.

Munger K, Scheffner M, Huibregtse JM, Howley PM. Interactions of HPV E6 and E7 oncoproteins with tumour suppressor gene products. **Cancer Surv** 1992; 12:197-217.

Munger K, Howley PM. Human papillomavirus immortalization and transformation functions. **Virus Res** 2002; 89:213-28.

Nagahara H, Mimori K, Utsunomiya T, et al. Clinicopathologic and biological significance of kallikrein 6 overexpression in human gastric cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11:6800-6.

Nagata M, Fujita H, Ida H, et al. Identification of potential biomarkers of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma by cDNA microarray analysis. **Int J Cancer** 2003; 106:683-9.

Nicklin MJ, Barton JL, Nguyen M, FitzGerald MG, Duff GW, Kornman K. A sequence-based map of the nine genes of the human interleukin-1 cluster. **Genomics** 2002; 79:718-25.

Nunes DN, Kowalski LP, Simpson AJ. Circulating tumor-derived DNA may permit the early diagnosis of head and neck squamous cell carcinomas. **Int J Cancer** 2001; 92:214-9.

O'Donnell RK, Kupferman M, Wei SJ, et al. Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Oncogene** 2005; 24:1244-51.

Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, et al. Clinical significance of human kallikrein gene 6 messenger RNA expression in colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11:2889-93.

Ogi K, Toyota M, Ohe-Toyota M, et al. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2002; 8:3164-71.

Ohta S, Uemura H, Matsui Y, et al. Alterations of p16 and p14ARF genes and their 9p21 locus in oral squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2009; 107:81-91.

Olshan AF, Weissler MC, Pei H, et al. Alterations of the p16 gene in head and neck cancer: frequency and association with p53, PRAD-1 and HPV. **Oncogene** 1997; 14:811-8.

Palka KT, Slebos RJ, Chung CH. Update on molecular diagnostic tests in head and neck cancer. **Semin Oncol** 2008; 35:198-210.

Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:448-56.

Partridge M, Emilion G, Falworth M, et al. Patient-specific mutation databases for oral cancer. **Int J Cancer** 1999; 84:284-92.

Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1999; 96:9212-7.

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 406:747-52.

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

Pollack JR. RNA common reference sets. In: Bowtell D, Sambrook J, editores. **DNA microarrays: a molecular cloning manual**. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2002. p.168-72.

Ransohoff DF. Rules of evidence for cancer molecular-marker discovery and validation. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:309-14.

Rasmussen R. Quantification on the lightcycler. In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K, editors. **Rapid cycle real time PCR, methods and applications**. Heidelberg: Springer Press; 2001. p.21-34.

Reid JF, Lusa L, De Cecco L, et al. Limits of predictive models using microarray data for breast cancer clinical treatment outcome. **J Natl Cancer Inst** 2005; 7:927-30.

Rickman DS, Millon R, De Reynies A, et al. Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays. **Oncogene** 2008; 27:6607-22.

Riedel F, Götte K, Schwalb J, Bergler W, Hörmann K. Expression of 92-kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Oncol** 2000; 17:1099-105.

Ries LAG, Eisner MP, Kosary CL, et al. Cancer Statistics Review 1975-2000. **USA National Cancer Institute** 2006.

Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, et al. Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. **Int J Cancer** 2003; 104:336-44.

Roepman P, Wessels LF, Kettelarij N, et al. An expression profile for diagnosis of lymph node metastases from primary head and neck squamous cell carcinomas. **Nat Genet** 2005; 37:182-6.

Roepman P, Kemmeren P, Wessels LF, Slootweg PJ, Holstege FC. Multiple robust signatures for detecting lymph node metastasis in head and neck cancer. **Cancer Res** 2006; 66:2361-6.

Ron S, Strichman-Almashanu L, Shmoish M, et al. GeneDecks: A systems biology facilitator with combinatorial genecards outlook. In: **Annual Meeting of the International Society for Computational Biology**, Michigan, EUA, 25-20 de Junho de 2005; Pôster E-66.

Ross DT, Scherf U, Eisen MB, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. **Nat Genet** 2000; 24:227-35.

Rubie C, Frick VO, Wagner M, et al. Enhanced expression and clinical significance of CC-chemokine MIP-3 alpha in hepatocellular carcinoma. **Scand J Immunol** 2006; 63:468-77.

Ruckhäberle E, Rody A, Engels K, et al. Microarray analysis of altered sphingolipid metabolism reveals prognostic significance of sphingosine kinase 1 in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2007; 112:41-52.

Ruokolainen H, Pääkkö P, Turpeenniemi-Hujanen T. Serum matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma is a prognostic marker. **Int J Cancer** 2005; 116:422-7.

Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. **Cancer Res** 2000; 60:892-5.

Sankaranarayanan R, Masuyer E, Swaminathan R, Ferlay J, Whelan S. Head and neck cancer: a global perspective on epidemiology and prognosis. **Anticancer Res** 1998; 18:4779-86.

Sarkar S, Maceyka M, Hait NC, et al. Sphingosine kinase 1 is required for migration, proliferation and survival of MCF-7 human breast cancer cells. **FEBS Lett** 2005; 579:5313-7.

Schiffman M, Khan MJ, Solomon D, et al. A study of the impact of adding HPV types to cervical cancer screening and triage tests. **J Natl Cancer Inst** 2005; 7:147-50.

Schmalbach CE, Chepeha DB, Giordano TJ et al. Molecular profiling and the identification of genes associated with metastatic oral cavity/pharynx squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2004; 130:295-302.

Segal E, Shapira M, Regev A, et al. Module networks: identifying regulatory modules and their condition-specific regulators from gene expression data. **Nat Genet** 2003; 34:166-76.

Segal E, Friedman N, Koller D, Regev A. A module map showing conditional activity of expression modules in cancer. **Nat Genet** 2004; 36:1090-8.

Shimizu S, Seki N, Sugimoto T, et al. Identification of molecular targets in head and neck squamous cell carcinomas based on genome-wide gene expression profiling. **Oncol Rep** 2007; 18:1489-97.

Shirakawa F, Mizel SB. In vitro activation and nuclear translocation of NF-kappa B catalyzed by cyclic AMP-dependent protein kinase and protein kinase C. **Mol Cell Biol** 1989; 9:2424-30.

Short SO, Kaplan JN, Laramore GE, Cummings, CW. Shoulder pain and function after neck dissection with or without preservation of the spinal accessory nerve. **Am J Surg** 1984; 148:478-82.

Sidransky D. Cancer of the head and neck. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. **Cancer: principles and practice of oncology**. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams e Wilkins; 2008. p.799-886.

Silveira NJ, Varuzza L, Machado-Lima A, et al. Searching for molecular markers in head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC) by statistical and bioinformatic analysis of larynx-derived SAGE libraries. **BMC Med Genomics** 2008; 1:56.

Siriwardena BS, Kudo Y, Ogawa I, et al. Periostin is frequently overexpressed and enhances invasion and angiogenesis in oral cancer. **Br J Cancer** 2006; 95:1396-403.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. **Cancer** 1953; 6:963-8.

Smith BD, Haffty BG. Molecular markers as prognostic factors for local recurrence and radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. **Radiat Oncol Investig** 1999; 7:125-44.

Sok JC, Coppelli FM, Thomas SM, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. **Clin Cancer Res** 2006; 12:5064-73.

Stylianou E, O'Neill LA, Rawlinson L, Edbrooke MR, Woo P, Saklatvala J. Interleukin 1 induces NF-kappa B through its type I but not its type II receptor in lymphocytes. **Biol Chem** 1992; 267:15836-41.

Tilman G, Mattiussi M, Brasseur F, van Baren N, Decottignies A. Human periostin gene expression in normal tissues, tumors and melanoma: evidences for periostin production by both stromal and melanoma cells. **Mol Cancer** 2007; 6:80.

Toruner GA, Ulger C, Alkan M, et al. Association between gene expression profile and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet** 2004; 154:27-35.

Towne JE, Garka KE, Renshaw BR, Virca GD, Sims JE. Interleukin (IL)-1F6, IL-1F8, and IL-1F9 signal through IL-1Rrp2 and IL-1RAcP to activate the pathway leading to NF-kappaB and MAPKs. **J Biol Chem** 2004; 279:13677-88.

Tsukahara T, Mizuno H, Igarashi Y. Molecular diversity of sphingosine kinase [abstract]. **Tanpakushitsu Kakusan Koso** 2002; 47(4 Suppl):509-13.

Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1990; 87:1663-7.

van Wilgen CP, Dijkstra PU, Nauta JM, Vermey A, Roodenburg JL. Shoulder pain and disability in daily life, following supraomohyoid neck dissection: a pilot study. **J Craniomaxillofac Surg** 2003; 31:183-6.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol** 2002; 3:RESEARCH0034.

Yamashita T, Fujii M, Tomita T, et al. The inhibitory effect of matrix metalloproteinase inhibitor ONO-4817 on lymph node metastasis in tongue carcinoma. **Anticancer Res** 2003; 23:2297-302.

Yan W, Shao R. Transduction of a mesenchyme-specific gene periostin into 293T cells induces cellinvasive activity through epithelial-mesenchymal transformation. **J Biol Chem** 2006; 281:19700-8.

Yorioka CW, Coletta RD, Alves F, Nishimoto IN, Kowalski LP, Graner E. Matrix metalloproteinase-2 and-9 activities correlate with the disease-free survival of oral squamous cell carcinoma patients. **Int J Oncol** 2002; 20:189-94.

Yoshinaga K, Yamashita K, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Mori M. Activin a causes cancer cell aggressiveness in esophageal squamous cell carcinoma cells. **Ann Surg Oncol** 2008; 15:96-103.

Yu YH, Kuo HK, Chang KW. The evolving transcriptome of head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. **PLoS ONE** 2008; 3:e3215.

Wagner K, Peters M, Scholz A, et al. Activin A stimulates vascular endothelial growth factor gene transcription in human hepatocellular carcinoma cells. **Gastroenterology** 2004; 126:1828-43.

Warner GC, Reis PP, Jurisica I, et al. Molecular classification of oral cancer by cDNA microarrays identifies overexpressed genes correlated with nodal metastasis. **Int J Cancer** 2004; 110:857-68.

Woolgar JA. Pathology of the N0 neck. **Br J Oral Maxillofac Surg** 1999; 37:205-9.

Wynder EL, Stellman SD. Comparative epidemiology of tobacco-related cancers. **Cancer Res** 1977; 37:4608-22.

Zhang L, Huang J, Yang N, et al. Integrative genomic analysis of phosphatidylinositol 3'-kinase family identifies PIK3R3 as a potential therapeutic target in epithelial ovarian cancer. **Clin Cancer Res** 2007; 13:5314-21.

Zhang Q, Thomas SM, Xi S, et al. SRC family kinases mediate epidermal growth factor receptor ligand cleavage, proliferation, and invasion of head and neck cancer cells. **Cancer Res** 2004; 64:6166-73.

Ziober AF, Falls EM, Ziober BL. The extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma: friend or foe? **Head Neck** 2006; 28:740-9.

Anexo 1

Topografia

Tabaco

Álcool

Diferenciação

pT

pN

Recidivas

Braço do cluster com todas as topografias

CNSP

Não consumidor

Não consumidor

Bem diferenciado

pT 1-2

pN0

Recidiva Local

Cav. Oral

Ex-consumidor

Ex-consumidor

Moderadamente

pT 3-4

pN+

Recidiva regional

Braço 1 (mais semelhantes a esôfago, pulmão e colo de útero)

Orofaringe

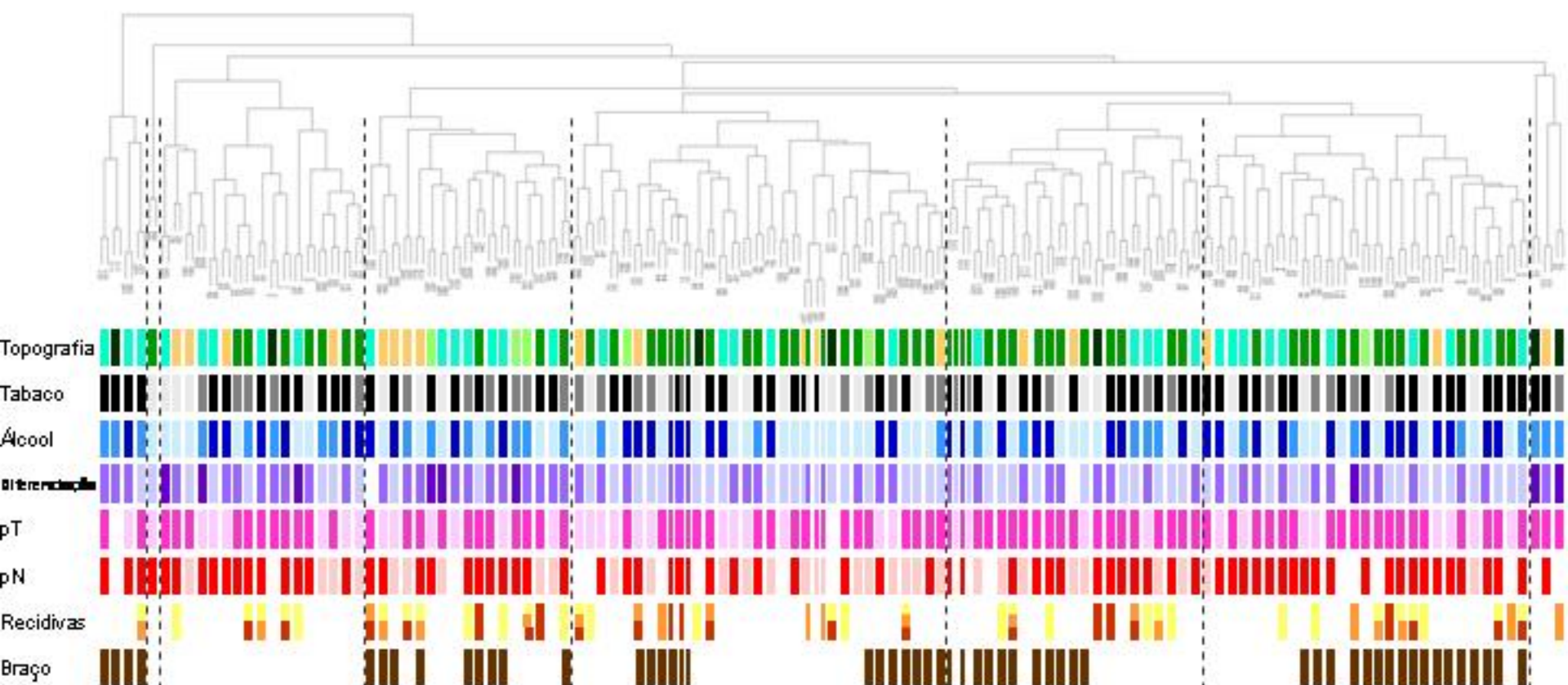
Consumidor

Consumidor

Pouco diferenciado

Hipofaringe

Laringe



Anexo 2 – (Tabela 8) Vias e módulos funcionais alterados nas cinco topografias de CECP (verde representa módulo inativo e vermelho, ativo).

Topografia	Módulo	Gene	p-valor
Cavidade Nasal e Seios Paranasais	Via de calicreínas	KLK13	2,4E-18
		KLK7	2,8E-7
		KLK6	4,2E-5
	Desenvolvimento (GO7275)	FOSB	3,5E-50
		KLK7	3,3E-37
		KLK6	7,2E-31
		POSTN	6,1E-28
		BST2	8,0E-24
		INHBA	4,2E-20
		EVPL	3,5E-7
	Desenvolvimento da epiderme (GO8544)	KLK7	4,2E-10
		EVPL	1,0E-2
	Região extracelular (GO5576)	POSTN	3,4E-25
		KLK13	3,1E-17
		INHBA	1,1E-14
		KLK6	1,4E-13
		AREG	8,9E-11
		MMP9	1,0E-6
	Espaço extracelular (GO5615)	AREG	4,6E-10
		MMP9	6,3E-9
		CCL20	3,0E-4
		MMP13	4,5E-2
	Sinalização célula-célula (GO7267)	IL1F9	3,7E-41
		AREG	3,2E-23
		KLK6	3,3E-19
		INHBA	1,3E-17
		BST2	2,6E-17
		CCL18	1,5E-5
		CCL20	2,2E-3
	Atividade de fatores de crescimento (GO8083)	AREG	3,1E-9
		INHBA	3,9E-8
	Interação MEC-receptor (GeneDeck)	COL6A3	2,3E-22
		COL6A3	9,5E-17

	Ligantes de cálcio (GO5509)	S100P	6,6E-11
	Resposta ao <i>stress</i> (GO6950)	IL1F9	5,9E-43
		INHBA	3,9E-15
		BST2	2,9E-14
		KLK6	1,2E-11
		CCL18	3,9E-8
		CCL20	1,9E-6
		IL1B	9,5E-3
		Atividade de transdução de sinal (GO4871)	AKT1
Cavidade Oral	Região extracelular (GO5576)	POSTN	3,4E-25
		KLK13	3,1E-17
		INHBA	1,1E-14
		KLK6	1,4E-13
		AREG	8,9E-11
	Proteólise (GO6508)	MMP9	1,0E-6
		KLK13	1,4E-36
		KLK6	1,1E-29
	Via de IGF2/IGFBP4	MMP9	5,7E-7
		MMP9	8,2E-2
PLAU	2,3E-10		
Orofaringe	Via de Wnt (GeneDeck)	MYC	2,6E-10
	Via de sinalização de Toll-like Receptor (GeneDeck)	IL1B	1,3E-2
	Regulação de transcrição (GO6355)	FOSB	1,5E-29
		MYC	3,3E-11
Hipofaringe	Transporte para o núcleo (GO6606)	FAF1	9,6E-3
	Resposta ao <i>stress</i> (GO6950)	IL1F9	5,9E-43
		INHBA	3,9E-15
		BST2	2,9E-14
		KLK6	1,2E-11
		CCL18	3,9E-8
		CCL20	1,9E-6
		IL1B	9,5E-3
		Laringe	Ciclo celular GO7049
MYC	3,9E-17		
INHBA	1,7E-5		

Anexo 3

Topografia

Tabaco

Álcool

Diferenciação

pT

pN

Recidivas

CNSP

Esôfago

Não consumidor

Não consumidor

Bem diferenciado

pT 1-2

pN0

Recidiva Local

Cav. Oral

Pulmão

Ex-consumidor

Ex-consumidor

Moderadamente

pT 3-4

pN+

Recidiva regional

Orofaringe

Colo de útero

Consumidor

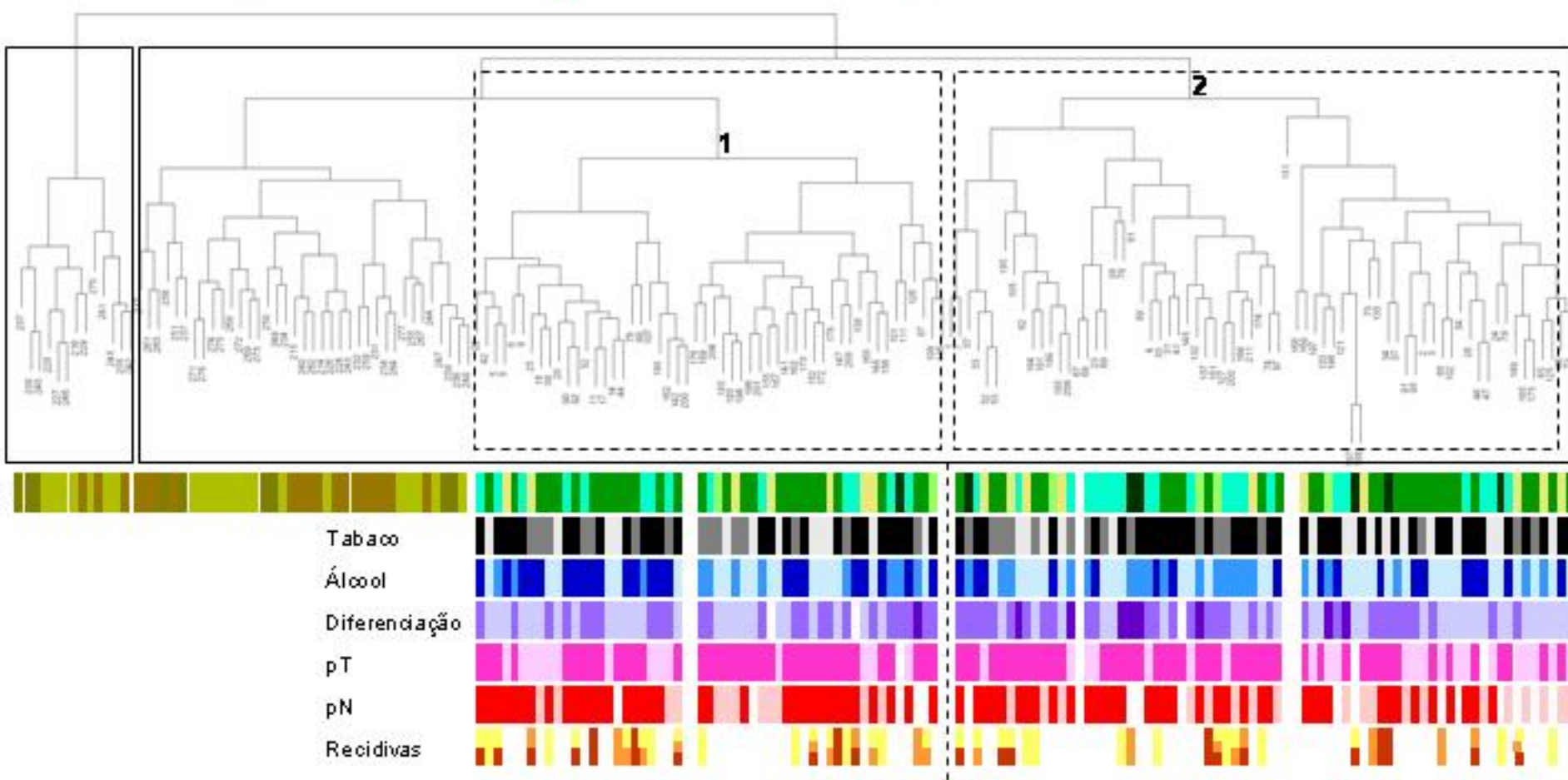
Consumidor

Pouco diferenciado

Hipofaringe

Laringe

Topografia



Anexo 4 – (Tabela 12) Vias e módulos funcionais alterados no braço 1 e braço 2 de CECF definidos no agrupamento hierárquico não supervisionado construído com dados de expressão gênica de todos os genes representados na lâmina de *microarray* para as amostras de CECF, de esôfago, pulmão e colo de útero (verde representa módulos inativos e vermelho, ativo).

Grupo	Via	Gene	p-valor
Ativo no Braço 1 e inativo no Braço 2	Sinalização célula-célula (GO7267)	IL1F9	3,73E-41
		AREG	3,26E-23
		KLK6	3,38E-19
		INHBA	1,33E-17
		BST2	2,65E-17
		CCL18	1,54E-5
	Atividade de fatores de crescimento (GO8083)	CCL20	2,21E-3
		AREG	3,11E-9
		INHBA	3,93E-8
	Proteólise (GO6508)	KLK13	1,40E-36
		KLK6	1,11E-29
		MMP9	5,79E-7
	Desenvolvimento (GO7275)	FOSB	3,52E-50
		KLK7	3,33E-37
		KLK6	7,25E-31
		POSTN	6,14E-28
		BST2	8,03E-24
		INHBA	4,25E-20
		CYR61	2,48E-8
		MTSS1	3,63E-8
		FXD5	1,01E-7
		EVPL	3,53E-7
	Resposta ao stress (GO6950)	ETS2	2,59E-5
		GPR56	1,47E-4
		EMP1	3,17E-4
		IL1F9	5,98E-43
		INHBA	3,98E-15
		BST2	2,90E-14
		KLK6	1,23E-11
		CCL18	3,93E-8

Braço 1	Regulação da progressão do ciclo celular (GO0074)	CCL20	1,98E-6
		VWF	5,18E-3
		IL1B	9,56E-3
		AHSA1	9,68E-3
		NR4A2	1,20E-2
		CAPG	4,12E-2
		FOSB	1,47E-31
		INHBA	7,26E-10
		MYC	2,15E-5
	Parada do ciclo celular (GO7050)	SPHK1	5,50E-2
		MYC	4,60E-3
		INHBA	4,60E-3
	Regulação negativa da progressão do ciclo celular (GO45786)	MYC	4,60E-3
		INHBA	4,60E-3
	Metabolismo de prostaglandinas e leucotrienos (GeneDeck)	PTGS1	3,85E-7
	Região extracelular (GO5576)	POSTN	3,45E-25
		KLK13	3,16E-17
		INHBA	1,18E-14
		KLK6	1,42E-13
		AREG	8,90E-11
		MMP9	1,08E-6
		FSTL1	1,26E-4
	Espaço extracelular (GO5615)	AREG	4,66E-10
		MMP9	6,39E-9
		FSTL1	8,50E-5
		CCL20	3,03E-4
	Moléculas CD (KEGG)	MMP13	4,55E-2
		BST2	1,32E-18
		TNFSF10	6,13E-8
		CD82	7,00E-8
		PLAUR	2,33E-5
		ITGA5	4,01E-4
		IL1R2	4,70E-4
		PVRL1	9,36E-3
		CD151	9,99E-3

Adesão celular (GO7155)	NT5E	1,12E-2
	TACSTD1	1,25E-2
	POSTN	4,00E-25
Proliferação celular (GO8283)	MTSS1	7,55E-9
	FXYD5	1,98E-3
	GPR56	1,54E-2
	AREG	2,81E-20
	BST2	3,10E-16
	MYC	3,59E-12
	CYR61	2,94E-7
	EMP1	6,59E-3
	SHC1	3,36E-2
	KLF4	3,65E-2
Atividade metaloendopeptidase (GO04222)	IL1B	4,44E-2
	MMP9	8,58E-6
Linhagem de células hematopoéticas (KEGG)	IL1R2	3,72E-5
	IL6	1,99E-2
	IL1B	3,11E-2
Via de sinalização de Toll-like receptor (KEGG)	ITGA5	3,11E-2
	MAP2K6	6,32E-25
	CXCL9	8,40E-24
Ciclo celular (GO7049)	FOSB	3,67E-21
	MYC	3,96E-17
	MCM2	1,53E-12
Protein binding (GO5515)	INHBA	1,77E-5
	FOSB	8,51E-25
	AREG	1,62E-22
	KLK6	6,53E-18
	MCM2	5,92E-13
	CCL18	2,77E-10
	MYC	1,08E-9
	EFNB2	1,20E-8
	MYH10	1,28E-8
	CCL20	4,37E-6
	INHBA	9,92E-6
	NTRK2	3,65E-4

		IL1B	7,20E-4
		PRKDC	8,12E-4
		PAWR	2,80E-2
		E2F1	3,30E-2
		FXYD5	3,79E-2
		LBR	4,03E-2
		DHX9	4,03E-2
		GRB7	4,60E-2
		EGFR	4,60E-2
		PLP2	4,98E-2
		AKT1	4,98E-2
		CCL20	1,81E-3
	Resposta inflamatória (GO6954)		
Braço 2	Ciclo de uréia e metabolismo de grupos amino (KEGG)	ODC1	2,90E-13
	Desenvolvimento da epiderme (GO8544)	KLK7	4,27E-10
		EVPL	1,01E-2
	Ligação ao receptor de TGF- β (GO5160)	INHBA	9,87E-10
	Cascata do complemento e coagulação (GeneDeck)	PLAU	3,49E-09
		PLAUR	1,71E-3
	Fosforilação oxidativa (KEGG)	UQCRC1	2,25E-14
		COX6B1	1,84E-6
	Junções oclusivas (GeneDeck)	INADL	3,59E-10
		MYH10	1,65E-9
		PPP2R2C	4,35E-6
		TJP2	9,92E-5
		AKT1	1,85E-2
		SPTAN1	4,13E-2
	Junção intercelular (GO5911)	EVPL	8,10E-7
	Tabela Whitfield 2 (ciclo celular)	MCM2	1,88E-14
		CCNB2	1,51E-7
		PCNA	4,82E-2
	Moléculas de adesão celular (KEGG)	COL1A2	6,95E-37
		THBS4	7,41E-29
		COL6A3	9,79E-22
		COL6A3	2,34E-14
		CYR61	1,61E-7
		NTN4	2,02E-4

Processamento e apresentação de antígenos (KEGG)	LAMA4	1,61E-3
	LAMB1	1,85E-3
	HLA-DMB	6,21E-5
	RFX5	1,65E-2
	IFI30	1,65E-2

Anexo 5 - (Tabela 16) Vias e módulos funcionais alterados em amostras de CECF localizadas (sem comprometimento linfonodal, não realizou radioterapia adjuvante e não apresentou recidivas) (verde representa módulo inativo e vermelho, ativo).

Grupo	Módulo	Gene	p-valor
Tumores localizados (9 amostras)	Metaloenzima (GO4222)	MMP9	2,7E-7
	Espaço extracelular (GO5615)	MMP9	1,3E-5
		AREG	2,9E-4
		CCL20	3,7E-4
		MMP13	2,8E-2
	Matriz extracelular (GO5578)	POSTN	3,7E-12
		LAMA4	7,8E-4
	<i>Protein binding</i> (GO5515)	FOSB	1,1E-19
		KLK6	1,7E-11
		AREG	1,3E-10
		MCM2	2,5E-7
		EFNB2	2,7E-6
		NTRK2	3,7E-4
		IL1B	3,7E-4
		CCL20	3,7E-4
		MYC	5,0E-4
		CCL18	5,8E-4
		PAWR	9,9E-4
		MYH10	1,4E-3
		GRB7	1,7E-3
		EGFR	2,2E-3
		GPR56	2,8E-3
	Ciclo celular (GeneDeck)	MCM2	3,3E-7
		CDKN1B	3,1E-6
	Tabela Whitfield 2 (ciclo celular)	CCNB2	4,1E-6
	Assinatura de metástase	S100P	6,6E-9
		CYR61	2,8E-7
		CCL18	2,8E-7
		COL6A3	1,7E-5
		COL6A3	2,0E-4
		PLAU	1,6E-2

Moléculas de adesão celular (KEGG)	COL1A2	2,1E-18
	THBS4	5,8E-15
	COL6A3	6,1E-13
	COL6A3	7,3E-11
	CYR61	1,7E-6
	LAMA4	1,2E-2
Adesão focal (KEGG)	COL1A2	1,0E-29
	COL6A3	1,9E-18
	COL6A3	8,9E-16
	THBS4	4,7E-15
	LAMA4	4,5E-5
	ACTN1	3,4E-4
Adesão focal (GeneDeck)	LAMB1	9,6E-4
	VAV3	4,7E-2
	THBS4	4,6E-27
	COL6A3	1,9E-21
	COL6A3	1,9E-21
	LAMA4	5,3E-6
Cancer de pulmão de pequenas células (hsa05222)	VWF	1,9E-2
	TTN	2,4E-2
	LAMA4	1,3E-5
	CDKN1B	2,6E-3
Degradação de nitrobenzeno (KEGG)	PRMT2	2,7E-7
Metabolismo de aminofosfonato (KEGG)	PRMT2	1,1E5
Metabolismo de andrógenos (KEGG)	PRMT2	5,4E-05
Junção intercelular (GO5911)	EVPL	3,2E-5
Via das calicreínas	KLK13	2,2E-12
	KLK7	8,9E-5
	KLK6	3,9E-3